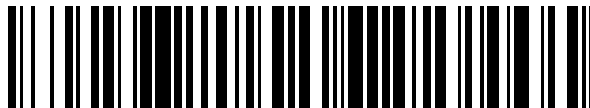


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 595**

51 Int. Cl.:

C12N 15/32	(2006.01)
C12N 5/14	(2006.01)
C12N 1/20	(2006.01)
A01H 5/00	(2006.01)
C07K 14/325	(2006.01)
A01N 37/46	(2006.01)
A01N 63/02	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)
C07K 16/12	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 15171477 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2937419**

54 Título: **Genes delta-endotoxina AXMI221Z, AXMI222Z, AXMI223Z, AXMI224Z, y AXMI225Z y métodos para su uso**

30 Prioridad:

18.02.2010 US 305802 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2017

73 Titular/es:

**ATHENIX CORP. (100.0%)
3500 Paramount Parkway
Morrisville, NC 27560, US**

72 Inventor/es:

**SAMPSON, KIMBERLY S. y
TOMSO, DANIEL JOHN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 647 595 T3

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

DESCRIPCIÓN

Genes delta-endotoxina AXMI221Z, AXMI222Z, AXMI223Z, AXMI224Z, y AXMI225Z y métodos para su uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. Se proporcionan nuevos genes que codifican proteínas plaguicidas. Dichas proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican son útiles en la preparación de formulaciones de plaguicidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a las plagas.

10

Antecedentes de la invención

Bacillus thuringiensis es una espora Gram-positiva que forma bacterias del suelo caracterizadas por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de insectos, pero que son inofensivas para las plantas y otros organismos no dirigidos. Por esta razón, es posible utilizar las composiciones que incluyen cepas de *Bacillus thuringiensis*, o sus proteínas insecticidas, como insecticidas aceptables desde el punto de vista medioambiental para controlar plagas de insectos en agricultura o vectores de insectos para diversas enfermedades humanas o de animales.

15

20

25

30

Las proteínas del cristal (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen una potente actividad insecticida predominantemente contra las larvas de lepidópteros, hemípteros, dípteros y coleópteros. Se ha demostrado asimismo la actividad de estas proteínas contra órdenes de plagas de *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga*, y *Acari*, así como otros órdenes de invertebrados como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes*, y *Sarcocystis* (Feitelson (1993) The *Bacillus thuringiensis* family tree. In *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY). Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV principalmente sobre la base de su actividad insecticida. Las clases principales estaban constituidas por (I) específicas de lepidópteros, (II) específicas de lepidópteros y dípteros, (III) específicas de coleópteros, (IV) específicas de dípteros y (V) y (VI) específicas de nematodos. Las proteínas estaban clasificadas además en subfamilias; se asignaron letras de división a las proteínas más cercanamente relacionadas dentro de cada familia, como por ejemplo *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. A las proteínas más íntimamente relacionadas aún dentro de cada división se les dio nombres como *cry1C1*, *Cry1C2*, etc.

40

45

Recientemente, se ha descrito una nueva nomenclatura para los genes Cry basada en la homología de la secuencia de aminoácidos en lugar de en la especificidad de la diana del insecto (Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). En la nueva clasificación, se asigna a cada toxina un nombre único incorporando un rango primario (un número arábigo), un rango secundario (una letra mayúscula), un rango terciario (una letra minúscula) y un rango cuaternario (otro número arábigo). En la nueva clasificación, los números romanos se cambian por números arábigos en el rango primario. Las proteínas que tienen menos del 45 % de identidad de secuencia tienen diferentes rangos primarios y los criterios para los rangos secundario y terciario son 78 % y 95 %, respectivamente.

La proteína de cristal no presenta actividad insecticida hasta no haber sido ingerida y solubilizada en el intestino medio del insecto. La protoxina ingerida es hidrolizada por proteasas en el tracto digestivo del insecto para dar una molécula tóxica activa (Höfte y Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Esta toxina se une a receptores de borde en capillo apicales en el intestino medio de las larvas e insectos y en la membrana apical creando canales iónicos o poros que tienen como resultado la muerte de la larva.

50

Las delta-endotoxinas tienen generalmente cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consiste en siete hélices alfa y está relacionado con la inserción de membrana y la formación de poro. El Dominio II consiste en tres láminas beta dispuestas en una configuración de clave griega y el Dominio III consiste en dos láminas beta antiparalelas en formación en "remolino" (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los Dominios II y III participan en el reconocimiento y unión de receptor y, por tanto, se consideran determinantes de la especificidad de toxina.

55

Dada la devastación que pueden producir los insectos y la mejora para la producción que supone el control de las plagas de insectos, existe una continua necesidad de descubrir nuevas formas de toxinas plaguicidas.

Sumario de la invención

60

65

Se proporcionan composiciones y métodos para conferir actividad plaguicida a bacterias, plantas, células de la planta, tejidos y semillas. Dichas composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos plaguicidas e insecticidas, vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones incluyen asimismo, las secuencias del polipéptido plaguicida y anticuerpos para dichos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos se pueden utilizar en construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, incluyendo microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que han

sido diseñadas para expresión en un organismo incluyendo, pero sin limitarse a ellos, un microorganismo o una planta. Las composiciones comprenden también bacterias, plantas, células de la planta, tejidos y semillas transformadas.

5 En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aislado que codifican una proteína plaguicida. Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

10 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28.
15 Asimismo, se abarca la secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína plaguicida. En particular, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante con actividad plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:

20 a) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, preferentemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas. Se hace referencia también secuencias de nucleótidos que son complementarias para una secuencia de nucleótidos de la invención, o que se hibridan con una secuencia de la invención. Las secuencias de nucleótidos sintética que codifican los polipéptidos divulgados
25 en el presente documento se exponen también en las SEQ ID NO: 8, 13 y 18.

La presente invención proporciona también:

- un vector que comprende a molécula de ácido nucleico recombinante de la invención;
- una célula huésped que contiene dicho vector;
- una planta transgénica que comprende dicha célula huésped,
- una semilla transgénica que comprende una molécula del ácido nucleico de la invención; y
- una composición que comprende un polipéptido de la invención.

35 Se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de la invención, así como el uso de dichos polipéptidos para controlar o eliminar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros. Según esto, la presente invención proporciona asimismo:

- un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar una célula huésped de la invención en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido; y
- un método para controlar una población de plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros o para eliminar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, consistiendo el método en el contacto de dicha población o plaga con una cantidad eficaz como plaguicida de un polipéptido de la invención. Se hace referencia asimismo a métodos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

La invención proporciona además una planta en cuyo genoma se ha incorporado establemente una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

50 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, preferentemente, en la que dicha planta es una célula de la planta.

La invención proporciona asimismo un método para aumentar la producción de una planta que comprende cultivar en un campo una planta, o una semilla de la misma, en cuyo genoma se ha incorporado establemente una construcción de ADN que comprende a secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

60 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que

tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y

en la que dicho campo está infestado con una plaga contra la que dicho polipéptido tiene actividad plaguicida.

- 5 Las composiciones y métodos de la invención son útiles para la producción de organismos con una potenciación de la resistencia o tolerancia a las plagas. Dichos organismos y composiciones que comprenden los organismos son deseables para fines agrícolas. Las composiciones de la invención son útiles también para generar proteínas alteradas o mejoradas que tienen actividad plaguicida o para detectar la presencia de ácidos nucleicos o proteínas plaguicidas en productos u organismos.

10

Descripción detallada

15 La presente invención está dirigida a composiciones y métodos para regular la resistencia o tolerancia a las plagas en organismos, en particular plantas o células de la planta. Se entiende por "resistencia" que se elimina la plaga (p.ej., un insecto) tras la ingestión u otro tipo de contacto con los polipéptidos de la invención. Se entiende por "tolerancia" un deterioro o reducción del movimiento, desarrollo, reproducción u otra función de la plaga. Los métodos implican la transformación de los organismos con una secuencia de nucleótidos que codifican y una proteína plaguicida de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que poseen actividad plaguicida. Por tanto, se hace referencia a bacterias, 20 plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas transformadas. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas plaguicidas de *Bacillus* u otras especies. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para la subsiguiente transformación en los organismos de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes homólogos (o parcialmente homólogos) y para la generación de proteínas plaguicidas alteradas a través de métodos conocidos en la técnica, tales como intercambio de dominios o barajado de ADN, por ejemplo, con miembros de las familias de endotoxinas Cry1, Cry2, y Cry9. Las proteínas encuentran uso en el control y 25 eliminación de poblaciones de plagas lepidópteros, hemípteros, coleópteros, dípteros y nematodos y para producir composiciones con actividad plaguicida.

30 Se entiende por "toxina plaguicida" o "proteína plaguicida" una toxina que tiene actividad tóxica contra una o más plagas, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, miembros de los órdenes de los *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o *Nematoda phylum*, o una proteína que tiene homología con dicha proteína. La proteína plaguicida de la invención tiene actividad plaguicida. Se han aislado proteínas plaguicidas de organismos, entre los que se incluyen por ejemplo, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifementans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas plaguicidas incluyen las 35 secuencias de aminoácidos deducidas de la secuencia de nucleótidos de longitud completa divulgada en el presente documento y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, ya sea como consecuencia del uso de un sitio de inicio en dirección 3' alterna o como consecuencia de un procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad plaguicida. El procesamiento puede tener lugar en el organismo en el que se expresa la proteína o en la plaga tras la ingestión de la proteína.

40 Las proteínas plaguicidas abarcan delta-endotoxinas. Las delta-endotoxinas incluyen proteínas identificadas como *cry1* a *cry43*, *cyt1* t *cyt2* y toxina de tipo Cyt. Actualmente, existen más de 250 especies conocidas de delta-endotoxinas con un gran abanico de especificidades y toxicidades. Para tener una lista más exhaustiva, véase Crickmore et al. (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813 y para las actualizaciones regulares, véase Crickmore et al. (2003) "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature," en www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

45 Por lo tanto, se proporciona en el presente documento una nueva secuencia de nucleótidos aislada que confiere actividad plaguicida. Dicha secuencia de nucleótidos aislada codifica polipéptidos con homología con delta-endotoxinas o toxinas binarias. Se proporciona asimismo, la secuencia de aminoácidos de proteínas plaguicidas. La proteína obtenida de la traducción de este gen permite a las células controlar o eliminar las plagas que la infestan.

50

Moléculas de ácido nucleicos aisladas y variantes y fragmentos de las mismas.

55 En un aspecto de la invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
- 60 c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28. Se hace referencia asimismo a moléculas de ácidos nucleicos suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácidos nucleicos que codifican proteínas con regiones de homología de secuencia. Tal como se utiliza en el presente documento, se pretende que la expresión "molécula de ácido nucleico" incluya 65 moléculas de ADN (p.ej., ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p.ej., ARNm) y análogos de ADN o ARN generados mediante el empleo de análogos de nucleótido. La molécula de ácido

nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

Una secuencia de ácido nucleico (o ADN) "aislada" o "recombinante", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos (o ADN) que deja de estar en su entorno natural, por ejemplo, en *in vitro* o en una bacteria recombinante o una célula de la planta huésped. En algunas realizaciones, un ácido nucleico aislado o recombinante está desprovisto de secuencias (preferentemente, secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural el ácido nucleico (es decir, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se deriva el ácido nucleico. Para los fines de la invención "aislado" cuando se utiliza para referirse a las moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislado que codifica delta-endotoxina puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, o 0.1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. En varias realizaciones, una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente desprovista de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (peso en seco) de la proteína que no es delta-endotoxina (denominada también en el presente documento "proteína contaminante").

La secuencia de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluye la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18.

Se entiende por "complemento" una secuencia de nucleótidos suficientemente complementaria para una secuencia de nucleótidos dada, tal que se puede hibridar con una secuencia de nucleótidos dada para formar así un híbrido estable.

La correspondiente secuencia de aminoácidos para la proteína plaguicida codificada por esta secuencia de nucleótidos se expone en las SEQ ID NO: 27 o 28.

La presente invención abarca también moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas plaguicidas siempre y cuando codifiquen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28, que tiene actividad plaguicida. Según esto, se entiende por "fragmento" una porción de la secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida que tiene actividad plaguicida. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos codifica una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida. Se hace referencia también a un fragmento que se puede utilizar como sonda de hibridación o cebador de PCR aplicando los métodos divulgados más adelante. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en el presente documento, dependiendo del uso pretendido, siempre y cuando codifique un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, que tiene actividad plaguicida. Se entiende por "nucleótidos contiguos" restos de nucleótidos que están inmediatamente adyacentes unos con respecto a otros. Los fragmentos de la secuencia de nucleótidos de la presente invención codificarán fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína plaguicida y, por tanto, retienen la actividad plaguicida. Se entiende por "retiene la actividad" que el fragmento tendrá al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de actividad plaguicida de la proteína plaguicida. En una realización, la actividad plaguicida es actividad coleopterocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad lepidopterocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad nematocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad dípterocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad hemiptericida. Los métodos para medir la actividad plaguicida son conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; y la patente estadounidense No. 5.743.477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará al menos aproximadamente 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 aminoácidos contiguos y hasta el número total de aminoácidos presentes en la proteína plaguicida de longitud completa de la invención, siempre y cuando codifiquen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, que tiene actividad plaguicida. En algunas realizaciones, el fragmento es un fragmento de escisión proteolítica. Por ejemplo, el fragmento de escisión proteolítica puede ser un truncamiento N-terminal o C-terminal de al menos aproximadamente 100 aminoácidos, aproximadamente 120, aproximadamente 130, aproximadamente 140, aproximadamente 150 o aproximadamente 160 aminoácidos en relación con las SEQ ID NO: 27 o 28 que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con cualquiera de dichas secuencias y actividad plaguicida. Se hace referencia asimismo a fragmentos que son el resultado de la retirada del dominio de cristalización C-terminal, p.ej., por proteólisis o por inserción de un codón de parada en la secuencia codificante. Véase, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos truncadas expuestas en las SEQ ID NO: 22, 25, 26

y 32. Debe entenderse que el sitio de truncamiento puede variar en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos a cada lado del sitio de truncamiento representado por el término de las SEQ ID NO: 27 o 28 (en comparación con la correspondiente secuencia de longitud completa).

5 Las proteínas plaguicidas preferentes de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18. Se entiende por "suficientemente idéntica" una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia utilizando uno o más programas de alineamiento descritos en el presente documento utilizando los parámetros normales. Las personas especializadas en la técnica reconocerán que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la correspondiente identidad de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codón, la similitud de aminoácidos, la ubicación del marco de lectura y similares.

15 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias con el fin de su comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas / número total de posiciones (p.ej., posiciones solapadas) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, se calcula el porcentaje de identidad a través de la secuencia de referencia en su totalidad (es decir, la secuencia divulgada en el presente documento como cualquiera entre las SEQ ID NO: 1-20). Se puede determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias aplicando técnicas similares a las que se describen más adelante, permitiendo huecos o no. Al calcular el porcentaje de identidad, normalmente, se hace el recuento de los apareamientos exactos.

25 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar aplicando un algoritmo matemático. Un ejemplo no exhaustivo de un algoritmo matemático utilizado para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87:2264, modificado según Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener la secuencia de nucleótidos homóloga a la molécula de ácido nucleicos de tipo plaguicida de la invención. Se pueden realizar las búsquedas de proteína BLAST con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener la secuencia de aminoácidos homóloga a las moléculas de la proteína plaguicida de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) tal como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Alternativamente, se puede utilizar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte las relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden emplear los parámetros predeterminados de los correspondientes programas (p.ej., BLASTX y BLASTN). Se puede realizar también el alineamiento manualmente por inspección.

40 Otro ejemplo no exhaustivo de un algoritmo matemático utilizado para comparar las secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW compara secuencias y alinea la secuencia de ADN o aminoácidos entera y de esta forma puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencia de la secuencia de aminoácidos en su totalidad. El algoritmo de ClustalW se utiliza en diversos paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el mercado, como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Tras el alineamiento de la secuencia de aminoácidos con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no exhaustivo de programa de software útil para el análisis de alineamientos ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud de aminoácidos (o ADN) y la identificación entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no exhaustivo de un algoritmo matemático utilizado para comparar secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, Versión 10 (distribuido por Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, Estados Unidos). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de restos de pesos PAM120, una penalización de longitud del hueco 12 y una penalización del hueco 4.

55 A no ser que se afirme de otro modo, se utilizará GAP, Versión 10, que emplea el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48(3):443-453, para determinar la identidad o similitud de secuencia empleando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando un peso del hueco de 50 y un peso de la longitud de 3 y la puntuación de la matriz nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos utilizando un peso de hueco 8 y un peso de longitud 2 y el programa de puntuación BLOSUM62. Se pueden utilizar también programas equivalentes. Se entiende por "programa equivalente" cualquier programa de comparación de secuencias que genere para las dos secuencias cualquiera en cuestión un alineamiento que tiene apareamientos de restos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el correspondiente alineamiento generado por GAP Versión 10.

65

- La invención abarca también una variante de molécula de ácido nucleico. Las "Variantes" de la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína plaguicida incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento, pero difieren desde el punto de vista conservador por la degeneración del código genético, así como aquellas que son suficientemente idénticas, tal como se ha explicado. En particular, son variantes siempre y cuando codifiquen un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28, que tiene actividad plaguicida. Las variantes alélicas de origen natural se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación, tal como se describen más adelante. La variante de la secuencia de nucleótidos incluye también una secuencia de nucleótidos derivada sintéticamente que ha sido generada por ejemplo por mutagénesis dirigida a sitio, pero que sigue codificando la proteína plaguicida divulgada en la presente invención, tal como se explica más adelante. Las variantes de las proteínas que abarca la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, actividad plaguicida. Se entiende por "retiene la actividad" que la variante, seguirá teniendo al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 70 % o al menos aproximadamente 80 % de la actividad plaguicida de la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos dentro de la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; y la patente estadounidense No. 5.743.477.
- Las personas especializadas en la técnica apreciarán asimismo que es posible introducir cambios por mutación de la secuencia de nucleótidos de la invención que conduzcan así a cambios de la secuencia de aminoácidos de la proteína plaguicida codificada, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. Por tanto, se puede crear una variante de la molécula de ácido nucleico aislada introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótido en la correspondiente secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento, de tal modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones, o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir a través de técnicas convencionales, como mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. Dicha variante de la secuencia de nucleótidos también queda abarcada en la presente invención.
- Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácido conservadoras en uno o más restos de aminoácido no esenciales previstos. Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo silvestre de la proteína plaguicida sin alterar la actividad biológica, en cambio se requiere un resto de aminoácido "esencial" para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácido conservadora" es aquella en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Dentro de la técnica, se han definido las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Dichas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).
- Las delta-endotoxinas tienen generalmente cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo, de Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consiste en siete hélices alfa y está relacionado con la inserción de membrana y la formación de poro. El Dominio II consiste en tres láminas beta dispuestas en una configuración de clave griega y el Dominio III consiste en dos láminas beta antiparalelas en formación de "remolino" (de Maagd et al., 2001, supra). Los dominios II y III participan en el reconocimiento y unión de receptor y por lo tanto se consideran determinantes de la especificidad de toxina.
- Se pueden realizar las sustituciones de aminoácido en regiones no conservadas que retiene la función. En general, dichas sustituciones no se realizarían para restos de aminoácidos conservados o para restos de aminoácidos que residen dentro del motivo conservado, en el que los restos son esenciales para la actividad de proteína. Entre los ejemplos de restos que se conservan y que pueden ser esenciales para la actividad de proteína se incluyen, por ejemplo, restos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento de toxinas similares o relacionadas para las secuencias de la invención (p.ej., restos que son idénticos en el alineamiento de proteínas homólogas). Entre los ejemplos de restos que están conservados, pero que pueden permitir sustituciones de aminoácido conservadoras y que siguen reteniendo la actividad se incluyen por ejemplo restos que tienen solamente sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en una alineación de toxinas similares o relacionadas a las secuencias de la invención (p.ej., restos que solamente tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en las proteínas homólogas del alineamiento). Sin embargo, las personas especializadas en la técnica podrán entender que las variantes funcionales pueden tener alteraciones conservadas o no conservadas menores en los restos conservados.
- Alternativamente, se puede introducir una variante de la secuencia de nucleótidos introduciendo mutaciones al azar a lo largo de toda la secuencia codificante, o en parte de ella, por ejemplo por mutagénesis de saturación, y se pueden rastrear los mutantes resultantes para determinar su capacidad para conferir actividad plaguicida para

identificar mutantes que retengan la actividad. Tras la mutagénesis, se puede expresar la proteína codificada por recombinación y se puede determinar la actividad de la proteína aplicando las técnicas de ensayo convencionales.

5 Se pueden identificar las secuencias plaguicidas correspondientes aplicando métodos como PCR, hibridación y similares, teniendo dichas sustancias una sustancial identidad con las secuencias de la invención. Véase por ejemplo, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) y Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Métodos and Applications* (Academic Press, NY).

10 En un método de hibridación, se puede utilizar parte o toda la secuencia de nucleótidos plaguicida para rastrear las genotecas ADNc o genómicas. Los métodos para la construcción de dichas genotecas de ADNc y genómicas son conocidos por lo general en la especialidad y se divulgan en Sambrook and Russell, 2001, *supra*. Las llamadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos genómicos de ADN, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos y se pueden marcar con un grupo detectable como ³²P o cualquier otro marcador detectable, como
15 por ejemplo otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un co-factor de enzima. Las sondas para hibridación se pueden obtener por marcado de oligonucleótidos sintéticos sobre la base de la secuencia de nucleótidos conocida que codifican la proteína plaguicida divulgada en el presente documento. Se pueden utilizar asimismo cebadores degenerados diseñados sobre la base de los nucleótidos conservados o restos de aminoácido de la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende normalmente una
20 región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Los métodos para la preparación de sondas para la hibridación son conocidos por lo general dentro de la técnica y se divulgan en Sambrook and Russell, 2001, *supra*.

25 Por ejemplo, se puede utilizar una secuencia de proteína plaguicida entera, divulgada en el presente documento, o una o más porciones de la misma, como sonda capaz de hibridarse específicamente con la correspondiente secuencia de tipo proteína plaguicida y ARN mensajeros. Para conseguir una hibridación específica en distintas condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y son preferentemente de al menos
30 aproximadamente 10 nucleótidos de longitud o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas se pueden utilizar para amplificar las correspondientes secuencias de plaguicida desde un organismo seleccionado por PCR. Esta técnica se puede emplear para aislar secuencias codificantes adicionales desde un organismo deseado o como ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificantes en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen detección por hibridación de genotecas de ADN en placas (ya sea
35 placas o colonias, véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La hibridación de dichas secuencias se puede llevar a cabo en condiciones rigurosas. Se entiende por “condiciones rigurosas” o “condiciones de hibridación rigurosas” condiciones en las cuales se hibrida una sonda con su secuencia
40 diana en un grado más detectable con respecto a otras secuencias (p.ej., al menos 2 veces más con respecto al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Al controlar la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, puede identificarse las secuencias diana que son 100 % complementarias de la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, se pueden ajustar las condiciones de rigurosidad para permitir algún mal apareamiento en las secuencias de manera que se detecten menores grados
45 de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda es de menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es menos de
50 aproximadamente 1,5 M de ion Na, normalmente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de concentración de ion Na (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y una temperatura de al menos aproximadamente 30° C para sondas cortas (p.ej., de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (p.ej., más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas se pueden conseguir también por adición de agentes desestabilizantes como formamida. Entre los ejemplos de condiciones poco rigurosas se incluyen hibridación con una solución de tampón de 30 a 35 %
55 de formamida, 1 M NaCl, 1 % SDS (dodecil sulfato sódico) a 37 °C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M citrato trisódico) a entre 50 y 55 °C. Entre los ejemplos de condiciones de rigurosidad moderada se incluyen de 40 a 45 % formamida, 1,0 M NaCl, 1 % SDS a 37 °C y un lavado en 0,5X a 1X SSC a entre 55 y 60 °C. Entre los ejemplos de condiciones muy rigurosas se incluyen hibridación en 50 % de formamida, 1 M NaCl, 1 % SDS a 37 °C y lavado en 0,1X SSC a entre 60 y 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender
60 aproximadamente de 0,1 % a aproximadamente 1 % SDS. La duración de la hibridación es generalmente menos de aproximadamente 24 horas, habitualmente aproximadamente de 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es normalmente en función de los lavados tras la hibridación, siendo los factores críticos la
65 concentración iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN-ADN, la T_m se puede aproximar a partir de la ecuación de Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de cationes monovalentes; % GC es el porcentaje de nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % form es el porcentaje de formamida en la solución de

hibridación y L es la longitud el híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (en la concentración iónica y el pH definidos) en el que se hibrida un 50 % de la secuencia diana complementaria con una sonda perfectamente apareada. T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1 % de mal apareamiento; por tanto, las condiciones de T_m , hibridación y/o lavado pueden ajustarse para la hibridación con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con un ≥ 90 % de identidad, la T_m puede disminuirse 10 °C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmico T_m de la secuencia específica y su complemento a una concentración iónica y un pH definidos. Sin embargo, unas condiciones muy rigurosas pueden emplear una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C más bajos que el punto de fusión térmico T_m ; las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, o 10 °C menos que el punto de fusión térmico T_m ; las condiciones de poca rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, o 20 °C menos que el punto de fusión térmico T_m . Al aplicar la ecuación, las condiciones de hibridación y lavado y el T_m deseado, las personas especializadas en la técnica entenderán que las variaciones de la rigurosidad de hibridación y/o la solución de lavado están descritas inherentemente. Si el grado de mal apareamiento deseado tiene como resultado un T_m de menos de 45 °C (solución acuosa) o 32 °C (solución de formamida), es preferente aumentar la concentración SSC para que se pueda emplear una temperatura más alta. Se puede encontrar una extensa guía de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hibridación with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York)

Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

La presente invención abarca también proteínas plaguicidas. Se entiende por "proteína plaguicida" una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuestos en las SEQ ID NO: 27 o 28. Se proporcionan también los fragmentos, porciones biológicamente activas y variantes de los mismos y se pueden utilizar para poner en práctica los métodos de la presente invención, siempre y cuando tengan al menos 95 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 27 o 28 y tengan actividad plaguicida. Por tanto, la presente invención proporciona a polipéptido recombinante con actividad plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, preferentemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas. "Proteína aislada" se utiliza para referirse a una proteína que no es más larga que en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una bacteria recombinante o una célula huésped de la planta. Se utiliza una "proteína aislada" o una "proteína recombinante" para referirse a una proteína deja de estar en su entorno natural, por ejemplo *in vitro* o en una bacteria recombinante o una célula de la planta huésped.

"Fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos de polipéptido que comprenden aminoácidos que tienen al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 27 o 28 y que presentan actividad plaguicida. Una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida puede ser un polipéptido que por ejemplo, es de 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 o más aminoácidos de longitud. Dichas porciones biológicamente activas se pueden preparar a través de técnicas de recombinación y evaluarse en cuanto a su actividad plaguicida. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véase por ejemplo Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; y la patente Estadounidense No. 5.743.477.

Se entiende por "variantes" proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28. Las variantes incluyen también polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 27 o 28, o un complemento de la misma en condiciones rigurosas siempre y cuando tenga al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28 y que tiene actividad plaguicida. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las variantes de proteínas que abarca la presente invención son biológicamente activas, es decir, siguen teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, se retiene la actividad plaguicida. En algunas realizaciones, las variantes tienen una mejor actividad en relación con la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; y la patente estadounidense No. 5.743.477.

Los genes bacterianos, como los genes *axmi* genes, de la presente invención, muy a menudo poseen múltiples codones de iniciación de metionina en proximidad con el inicio del marco de lectura abierto. Frecuentemente, la iniciación de la traducción en uno o más de dichos codones de inicio conducirá a la generación de una proteína funcional. Dichos codones de inicio pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias como *Bacillus sp* reconocen también el codón GTG como codón de inicio y proteínas que inician la traducción en codones GTG

contienen metionina en el primer aminoácido. En ocasiones menos frecuentes, la traducción en sistemas bacterianos puede iniciarse en el codón TTG, si bien en este caso, el TTG codifica una metionina. Asimismo, no se suele determinar *a priori* cuál de estos codones se utiliza de forma natural en la bacteria. Por lo tanto, debe entenderse que el uso de uno de los codones de metionina alternativos puede conducir también a la generación de proteínas plaguicidas. Véase por ejemplo, el sitio de inicio alternativo para la proteína AXMI223z expuesta en la SEQ ID NO: 28. Estas proteínas plaguicidas quedan abarcadas en la presente invención y se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. Debe entenderse que cuando se expresan en plantas, será necesario alterar el codón de inicio alternativo para ATG para una traducción apropiada.

Se hace referencia también a anticuerpos para los polipéptidos de la presente invención, o variantes o fragmentos de los mismos. Los métodos para producir anticuerpos son conocidos dentro de la técnica (véase, por ejemplo, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; patente estadounidense No. 4.196.265).

15 Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de ADN de la proteína plaguicida se pueden alterar a través de diversos métodos y dichas alteraciones pueden tener como resultado secuencias de ADN que codifican una proteína con una secuencia de aminoácidos diferente que la codificada por una proteína plaguicida de la presente invención. Dicha proteína se puede alterar de diversas formas, incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos e inserciones de uno o más aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28, incluyendo hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30 o aproximadamente 35 siempre y cuando tengan al menos al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28 y tengan actividad plaguicida. Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína plaguicida se pueden preparar por mutaciones del ADN. Esto se puede llevar a cabo a través de una entre varias formas de mutagénesis y/o evolución directa. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectan sustancialmente a la función de la proteína. Dichas variantes poseerán la actividad plaguicida deseada. Sin embargo, debe entenderse que la capacidad de una proteína plaguicida de conferir actividad plaguicida se puede mejorar mediante el uso de dichas técnicas en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, es posible expresar una proteína plaguicida en células huésped que presenten altos índices de incorporación errónea de bases durante la replicación de ADN, como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Tras la propagación en dichas cepas, es posible aislar el ADN (por ejemplo, preparando ADN de plásmido, o por amplificación por PCR y clonando el fragmento de la PCR resultante en un vector), cultivo de las mutaciones de proteína plaguicida en una cepa no mutagénica e identificar los genes mutados con actividad plaguicida, por ejemplo, realizando un ensayo para determinar la actividad plaguicida. Generalmente, se mezcla la proteína y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir el contacto de plantas con una o más placas y la determinación de la capacidad de la planta para sobrevivir y/o causar la eliminación de las plagas. En Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806, se pueden encontrar ejemplos de mutaciones que tienen como resultado una mayor toxicidad

Alternativamente, se pueden realizar alteraciones en la secuencia de proteína de muchas proteínas en el término amino o carboxi sin afectar sustancialmente a la actividad. Éstas pueden incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas a través de métodos moleculares modernos, tales como PCR, incluyendo amplificaciones por PCR, que alteran o extienden la secuencia de codificación de proteína en virtud de la inclusión de secuencias que codifican el aminoácido en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteína añadidas pueden incluir secuencias de codificación de proteína completas, como las utilizadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteína. Dichas proteínas de fusión se utilizan generalmente para (1) aumentar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítipo para facilitar la purificación de la proteína o la detección de la proteína o para otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) secreción diana o traducción de una proteína de un orgánulo subcelular, como por ejemplo el espacio periplásmico de bacterias Gram-negativas o el retículo endoplásmico de células eucariotas, resultando éstas últimas frecuentemente en glucosilación de la proteína.

Las variantes de nucleótido y la secuencia de aminoácidos de la presente invención también abarca secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos como barajado de ADN. Con dicho procedimiento, se puede utilizar una o más proteínas plaguicidas diferentes que codifican regiones para crear una nueva proteína plaguicida que posee las propiedades deseadas. De esta manera, se generaran genotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de la población de los polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tienen una sustancial identidad de secuencia y se pueden recombinar homológamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, al emplear este enfoque, se pueden barajar los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifica una proteína con una mejor propiedad de interés, como pueda ser una mayor actividad insecticida. Las estrategias para dicho barajado de ADN son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) *Proc.*

Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; y la patente estadounidense Nos. 5.605.793 y 5.837.458.

5 El intercambio o barajado de dominio es otro mecanismo para generar proteínas plaguicidas alteradas. Se pueden intercambiar los dominios entre las proteínas plaguicidas, con el resultado de toxinas híbridas o químicas con mejor actividad plaguicida o espectro diana. Los métodos para generar proteínas recombinantes y someterlas a ensayo para determinar su actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

15 Vectores

Se puede proporcionar una secuencia plaguicida de la invención en un casete de expresión para su expresión en una planta de interés. Se entiende por "casete de expresión en una planta" una construcción de ADN que es capaz de tener como resultado la expresión de una proteína desde un marco de lectura abierta en una célula de la planta. Normalmente, contienen un promotor y una secuencia codificante. Frecuentemente, dichas construcciones contendrán también una región sin traducir 3'. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia de señal" o una "secuencia líder" para facilitar el transporte de co-traducción o post-traducción del péptido para ciertas estructuras intracelulares, como cloroplastos (u otros plásticos), retículo endoplásmico o aparato de Golgi.

Se entiende por "señal de secuencia" una secuencia conocida o que supuestamente tiene como resultado el transporte del péptido de co-traducción o post-traducción a través de la membrana celular. En las eucariotas, esto implica normalmente la secreción en el aparato de Golgi, con cierta glucosilación resultante. Las toxinas insecticidas de la bacteria se sintetizan frecuentemente como protoxinas, que se activan proteolíticamente en el intestino de la plaga diana (Chang (1987) Methods Enzymol. 153:507-516). En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia de señal está localizada en la secuencia nativa o puede derivarse de una secuencia de la invención. Se entiende por "secuencia líder" cualquier secuencia que, cuando se traduce, tiene como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte de co-traducción de la cadena de péptido a un orgánulo subcelular. Por lo tanto, esto incluye secuencias líder dirigidas al transporte y/o glucosilación a través de su paso al retículo endoplásmico, el paso a vacuolas, plástidos, incluyendo cloroplastos, mitocondrias y similares.

Se entiende por "vector de transformación de planta" una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente de una célula de la planta. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión en la planta y puede organizarse en más de una molécula de ADN "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de plantas en los que se utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones de activación cis- y trans- para la transformación de células vegetales (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). "Vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para transferirse entre células huésped diferentes. "Vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. El casete incluirá secuencias reguladoras 5' y 3' unidas operativamente a una secuencia de la invención. Se entiende por "operativamente unido" una unión funcional entre una secuencia promotora y una segunda secuencia, en la que la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN que corresponde una segunda secuencia. Generalmente, operativamente unido significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen están contiguas y, cuando es necesario juntar dos regiones que codifican proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener además al menos un gen adicional para so co-transformación en el microorganismo. Alternativamente, el (los) gen(es) adicional(es) puede(n) proporcionarse sobre casetes de expresión múltiple.

"Promotor" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia de codificación en dirección 3'. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción o traducción (también denominadas "secuencias de control") son necesarias para la expresión de la secuencia de ADN de interés.

Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia plaguicida que está bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción una región de iniciación de la transcripción o traducción (es decir, promotor), una secuencia de ADN de la invención y una región de terminación de la transcripción o traducción (es decir una región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo para el huésped de la planta y/o la secuencia de ADN de la invención. Asimismo, el promotor puede ser la secuencia natural o, alternativamente, una secuencia sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" para la planta huésped, se pretende que el promotor se encuentre en la planta nativa en la que se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" para la secuencia de ADN de la invención,

se pretende que el promotor no sea el promotor nativo o natural para la secuencia de ADN de la invención unida operativamente.

La región de terminación puede ser nativa con la región de iniciación de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN unida operativamente de interés, puede ser nativa con el huésped de la planta o puede derivarse de otra fuente (es decir extraña o heteróloga para el promotor, la secuencia de ADN de interés, el huésped de la planta o una combinación de ellos). Las regiones de terminación convenientes están disponibles en el Ti-plásmido de *A. tumefaciens*, como por ejemplo las regiones de terminación octopina sintasa o nopalina sintasa. Véase también Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262:141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen et al. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe et al. (1990) Gene 91:151-158; Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi et al. (1987) Nucleic Acid Res. 15:9627-9639.

Cuando sea apropiado, se puede optimizar el gen(es) para aumentar la expresión en la célula huésped transformada. Es decir, se pueden sintetizar los genes utilizando los codones preferentes para la célula huésped para una mejor expresión o se pueden sintetizar utilizando codones en la frecuencia de uso del codón preferente del huésped. Generalmente, el contenido en GC del gen aumentará. Véase por ejemplo, Campbell and Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11 sobre una explicación del uso del codón preferente de huésped. En la técnica se dispone de métodos para sintetizar genes preferentes para plantas. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.380.831 y 5.436.391 y Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, la proteína plaguicida se dirige a cloroplasto para expresión. De esta manera, cuando no se inserta directamente la proteína plaguicida en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito para dirigir la proteína plaguicida a los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. commun. 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) Science 233:478-481.

El gen plaguicida que se dirige al cloroplasto se puede optimizar para la expresión en el cloroplasto para contabilizar las diferencias en el uso del codón entre el núcleo de la planta y sus orgánulos. De esta manera, se pueden sintetizar los ácidos nucleicos de interés utilizando codones preferentes para cloroplasto. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.380.831.

Transformación de planta

Los métodos de la invención implican la introducción de una construcción de nucleótido en una planta. Se entiende por "introducir" presentar a la planta la construcción de nucleótido de manera que la construcción accede al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren el uso de un método en particular para introducir una construcción de nucleótido en una planta, únicamente que la construcción de nucleótido acceda al interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir construcciones de nucleótido en las plantas son conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

Se entiende por "planta" plantas enteras, órganos de la planta (p.ej., hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células de la planta, propágulos, embriones, células de la hoja, células de la raíz, células del floema, polen).

"Planta transgénica" o "plantas transformadas" o plantas o células o tejidos "establemente transformados" se refiere a plantas en las que se ha incorporado o integrado en la célula de la planta secuencias de ácido nucleico o fragmentos de ADN exógenos. Dichas secuencias de ácido nucleico incluyen las que son exógenas, o no están presentes en una célula de la planta sin transformar, así como aquellas que pueden ser endógenas o están presentes en la célula de la planta sin transformar. "Heterólogo" se refiere generalmente a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas para la célula o parte del genoma nativo en el que están presentes y se ha añadido a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similar.

Las plantas transgénicas de la invención expresan una o más de las nuevas secuencias de toxina divulgadas en el presente documento. En diversas realizaciones, la planta transgénica comprende además uno o más genes adicionales para resistencia a insectos (p.ej., cry1 como los miembros de las familias Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E y Cry1F; Cry2, como los miembros de la familia cry2A; Cry9, como los miembros de las familias Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E y Cry9F; etc.). Las personas especializadas en la técnica podrán deducir que la planta transgénica puede comprender cualquier gen que imparta una característica agronómica de interés.

La transformación de las células de la planta se puede llevar a cabo a través de una entre las distintas técnicas conocidas en la técnica. El gen plaguicida de la invención se puede modificar para obtener o potenciar la expresión en las células de la planta. Normalmente, la construcción que expresa dicha proteína contendrá un promotor para activar la transcripción del gen, así como una región sin traducir 3' para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de dichas construcciones es muy conocida en la técnica. En algunos casos, puede ser útil obtener por ingeniería genética el gen, de manera que el péptido resultante se segrega o se dirige de

otra forma dentro de la célula de la planta. Por ejemplo, se puede obtener por ingeniería genética un gen para que contenga un péptido de señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplásmico. Puede ser asimismo preferente obtener por ingeniería genética el casete de expresión de la planta para que contenga un intrón, de manera que se requiera el procesamiento de ARNm del intrón para la expresión.

5 Normalmente, se insertará dicho “casete de expresión de la planta” en un “vector de transformación de la planta”. Dicho vector de transformación de la planta puede constar de uno o más vectores de ADN necesarios para conseguir la transformación de la planta. Por ejemplo, dentro de la práctica habitual de la técnica se suele utilizar
10 vectores de transformación de la planta que comprenden más de un segmento de ADN contiguo. Dichos vectores suelen denominarse en la técnica “vectores binarios”. Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos auxiliares, se utilizan sobre todo para la transformación mediada por *Agrobacterium*, en la que el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para conseguir una transformación eficiente son considerables y resulta ventajoso separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios contienen normalmente un vector de plásmido que contiene las secuencias que actúan en cis- requeridas para la transferencia de ADN-T (como el borde de la izquierda y el borde de la derecha), un marcador genético que se obtiene por
15 ingeniería genética para que sea capaz de expresión en una célula de la planta y un “gen de interés” (un gen obtenido por ingeniería genética para que sea capaz de la expresión en una célula de la planta para la que se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en dicho vector de plásmido secuencias necesarias para replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis- están dispuestas de modo que permiten una transferencia eficiente en las células de la planta y la expresión en ellas. Por ejemplo, el gen marcador genético y el gen plaguicida están localizados entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo el segundo vector de plásmido contiene factores que actúan en trans- que median la transferencia de ADN-T desde *Agrobacterium* a células de la planta. Este plásmido contiene a menudo las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de células vegetales por *Agrobacterium* y la transferencia de ADN por escisión en secuencias del borde y la transferencia de
20 ADN mediada por vir, tal como se entiende en la técnica (Hellens and Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Se pueden utilizar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (p.ej. LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación de la planta. El segundo vector de plásmido no es necesario para transportar las plantas a través de otros métodos como microproyección, microinyección, electroporación, polietilén glicol, etc.

30 En general, los métodos de transformación de la planta implican la transferencia de ADN heterólogo a las células de la planta diana (p.ej., embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callo no diferenciado, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiada (dependiendo del gen marcador genético) para recuperar las células de la planta transformadas de un grupo de masa celular sin transformar. Normalmente se transfieren explantes a un suministro nuevo del mismo medio y se cultivan según lo habitual. A continuación, se diferencian las células transformadas en los brotes después de colocarlos en medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. A continuación, se transfieren los brotes a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar el brote de la raíz o la plántula. A continuación, la plántula transgénica crece en una planta madura y produce semillas fértiles (p.ej. Hiei et al. (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Normalmente, se transfieren los explantes a un
35 suministro nuevo del mismo medio y se cultivan según lo habitual. En Ayres and Park (1994) critical Reviews in Plant Science 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) Maydica 42:107-120 se ofrece una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas. Dado que el material transformado contiene muchas células, tanto las células transformadas como no transformadas están presentes en cualquier pieza del callo o tejido o grupo de células diana sujetado. La capacidad para eliminar células no transformadas y permitir que proliferen las células transformadas tiene como resultado cultivos de plantas transformadas. A menudo, la capacidad para separar las células no transformadas limita la rápida recuperación de las células vegetales transformadas y la generación con éxito de plantas transgénicas.

50 Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir la secuencia de nucleótidos en plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula de la planta, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea, a la que se dirige la transformación. La generación de plantas transgénicas puede realizarse a través de uno entre varios métodos, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, microinjerto, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo a través de *Agrobacterium* en las células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de las células de la planta con ADN extraño heterólogo adherido a partículas, aceleración balística de partículas, transformación de haz con aerosol (solicitud estadounidense publicada No. 20010026941; patente estadounidense No. 4,945,050; publicación internacional No. WO 91/00915; publicación estadounidense publicada No. 2002015066), transformación Lec1 y otros métodos de transferencia de ADN diversos sin la mediación directa de partículas.

60 Los métodos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87:8526-8530; Svab y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90:913-917; Svab y Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. El método se basa en el suministro por pistola de partículas de ADN que contienen un marcador genético y dirigir el ADN al genoma del plástido por recombinación homóloga. Asimismo, se puede llevar a cabo la transformación del plástido por transactivación de un transgen soportado en un plástido silente por expresión preferente de tejido de una ARN polimerasa codificada por el núcleo dirigida a plástido. Dicho sistema ha sido notificado por McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos
65

91:7301-7305.

Tras la integración del ADN extraño heterólogo en las células vegetales, se aplica entonces el nivel umbral máximo de selección apropiado en el medio para eliminar las células sin transformar y separar y hacer proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven del tratamiento de selección transfiriéndolas regularmente a un medio nuevo. Gracias al paso continuo y al desafío con la selección apropiada, se identifica y se hace proliferar las células que están transformadas con el vector de plásmido. Los métodos moleculares y bioquímicos se pueden utilizar entonces para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

Las células que han sido transformadas se pueden desarrollar en plantas de acuerdo con los modos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. A continuación, se puede desarrollar estas plantas y polinizarlas o bien con la misma cepa transformada o bien con diferentes cepas e identificar el híbrido resultante que tiene la expresión constitutiva de la característica fenotípica. Se pueden desarrollar dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene establemente y que se hereda, y recoger las semillas después para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se ha conseguido. Según esto, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominada "semilla transgénica") que tienen una construcción de nucleótido de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado establemente en su genoma.

Evaluación de la transformación de la planta

Una vez introducido el ADN extraño heterólogo en las células de la planta, se confirma la transformación e integración del gen heterólogo en el genoma de la planta a través de diversos métodos, tales como análisis de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos asociados con el gen integrado.

El análisis por PCR es un método rápido para explorar las células, tejidos y brotes transformados en presencia de un gen incorporado en un estadio temprano antes de trasplantarlos en el suelo (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo utilizando cebadores de oligonucleótido específicos para el gen de interés o fondo de vector de *Agrobacterium*, etc.

La transformación de la planta se puede confirmar por análisis de transferencia de Southern del ADN genómico (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). En general, se extrae el total de ADN del transformante se digiere con enzimas de restricción apropiadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nilón. A continuación se sondea la membrana o "transferencia", por ejemplo, con fragmento de ADN diana radiomarcado con ³²P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de acuerdo con las técnicas convencionales (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

En el análisis de transferencia de Northern, se aísla ARN desde tejidos específicos de transformante, se fracciona en un gel de agarosa formaldehído sobre un filtro de nilón de acuerdo con los procedimientos convencionales que se utilizan de forma habitual en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). A continuación, se somete a ensayo la expresión de ADN codificado por el gen plaguicida por hibridación del filtro con una sonda radioactiva derivada del gen plaguicida a través de los métodos conocidos en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

Se pueden llevar a cabo la transferencia de Western, ensayos bioquímicos y similares en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de proteína codificada por el gen plaguicida a través de los procedimientos convencionales (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) utilizando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína plaguicida.

Actividad plaguicida en las plantas

En otro aspecto de la invención, es posible generar plantas transgénicas que expresan una proteína plaguicida que tiene actividad plaguicida. Se pueden utilizar los métodos descritos anteriormente a modo de ejemplo para generar plantas transgénicas, si bien la manera en la que se generan las células de la planta transgénica no es crítica para la presente invención. Se pueden aplicar los métodos conocidos o descritos en la técnica, como transformación medida por *Agrobacterium*, transformación biobalística y métodos que no están mediados por partículas, según el criterio del experimentador. Se pueden aislar las plantas que expresan una proteína plaguicida a través de los métodos habituales descritos en la técnica, por ejemplo, por transformación de callo, selección de callo transformado y regeneración de plantas fértiles a partir de dicho callo transgénico. En dicho proceso, es posible utilizar cualquier gen como marcador genético siempre y cuando su expresión en las células vegetales confiera la capacidad para identificar o seleccionar células transformadas.

Se ha desarrollado una serie de marcadores para su uso en células vegetales, tales como resistencia a cloranfenicol, el aminoglucósido G418, higromicina o similares. Se pueden utilizar también otros genes que codifican un producto relacionado con el metabolismo del cloroplasto como marcadores genéticos. Por ejemplo, genes que proporcionan resistencia a herbicidas para las plantas como glifosato, bromoxinil, o imidazolinona pueden encontrar

uso en particular. Dichos genes han sido notificados (Stalker et al. (1985) J. Biol. Chem. 263:6310-6314 (bromoxynil resistance nitrilase gene); y Sathasivan et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18:2188 (AHAS imidazolinone resistance gene). Asimismo, los genes divulgados en el presente documento son útiles como marcadores para evaluar la transformación de bacterias o células vegetales. Los métodos para detectar la presencia de un transgen en una planta, órgano de la planta (p.ej., hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, célula de la planta, propágulo, embrión o progenie de la misma, son muy conocidos dentro de la técnica. En una realización, se detecta la presencia del transgen sometiendo a ensayo la actividad plaguicida.

Es posible someter a ensayo las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida para determinar su actividad plaguicida y seleccionarse las plantas que presentan una actividad óptima para seguir cultivándolas. En la técnica se dispone de métodos para determinar la actividad ante las plagas. Generalmente, se mezcla la proteína y se utiliza en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

La presente invención se puede utilizar para transformar cualquier especie de planta, incluyendo, sin limitarse a ellas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Entre los ejemplos de plantas de interés se incluyen, sin limitarse a ellas, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuete, batata, mandioca, café, coco, piña, cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higos, guayaba, mango, oliva, papaya, anacardo, macadamia, almendra, nueces, verduras, ornamentales y coníferas.

Entre las verduras se incluyen, sin limitarse a ellas, tomates, lechuga, judías verdes, frijoles de lima, guisantes y miembros del género *Curcumis* como pepino, cantalupo y melón. Entre las ornamentales se incluyen, sin limitarse a ellas, azalea, hortensias, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, poinsetia y crisantemo. Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa, etc.).

Uso en el control plaguicida

Los métodos generales para emplear las cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una variante de la misma en el control plaguicida o la obtención por ingeniería genética de otros organismos como agentes plaguicidas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.039.523 y la patente europea EP 0480762A2.

Las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que han sido alterados genéticamente para contener un gen y una proteína plaguicida se pueden utilizar para proteger cultivos y productos agrícolas contra las plagas. En un aspecto de la invención, se tratan células enteras, es decir, sin lisar, de un organismo que produce toxina (plaguicida) con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando se aplica la célula en el entorno de la(s) plaga(s) diana.

Alternativamente, se produce el plaguicida introduciendo un gen plaguicida en un huésped celular. La expresión del gen plaguicida tiene como resultado de forma directa o indirecta la producción intracelular y el mantenimiento del plaguicida. En un aspecto de la presente invención, estas células se tratan después en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando se aplica la célula en el entorno de la(s) plaga(s) diana. El producto resultante retiene la toxicidad de la toxina. Estos plaguicidas encapsulados de forma natural se pueden formular entonces de acuerdo con las técnicas convencionales para su aplicación en el entorno que alberga la plaga diana, p.ej. suelo, agua y follaje de las plantas. Véase por ejemplo la solicitud de patente europea EPA 0192319 y las referencias que se citan en ella. Alternativamente, es posible formular las células que expresan un gen de la presente invención para permitir la aplicación del material resultante como un plaguicida.

Los principios activos de la presente invención se aplican normalmente en forma de composiciones y se pueden aplicar sobre el área del cultivo o la planta que se va a tratar, simultáneamente o de forma sucesiva con otros compuestos. Dichos compuestos pueden ser fertilizantes, agentes de eliminación de malas hierbas, crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites inactivantes, polímeros y/o formulaciones vehículos de liberación en el tiempo o biodegradables que permiten la dosificación a largo plazo de un área diana tras una única aplicación de la formulación. Pueden ser asimismo herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virucidas, microbicidas, amebicidas, plaguicidas, fungicidas, bacteriocidas, nematocidas, moluscocidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, en combinación con otros vehículos, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación agrícolamente aceptables, empleados habitualmente en la técnica de la formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos en correspondencia con las sustancias empleadas normalmente en la tecnología de la formulación, p.ej. sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes de humectación, agentes de pegajosidad, aglutinantes y fertilizantes. De igual modo, se pueden preparar las formulaciones en "cebos" comestibles o configurarlas como "trampas" para plagas que den cabida a que la plaga diana se alimente o digiera la formulación plaguicida.

Los métodos de aplicación de un principio activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas plaguicidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención incluye la aplicación de las hojas, el recubrimiento de las semillas y la aplicación en el suelo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependerán de la intensidad de la infestación de la plaga en cuestión.

La composición se puede formular como un polvo, un pulverizado, conglomerado, gránulo, aspersión, emulsión, coloide, solución o similar y se puede preparar a través de medios convencionales, tales como desecación, liofilizado, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células que comprende el polipéptido. En dichas composiciones que contiene al menos un polipéptido plaguicida, el polipéptido puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso.

Es posible eliminar plagas de lepidópteros, hemípteros, dípteros o coleópteros, o reducir su número, en un área dada a través de los métodos de la invención o se puede aplicar profilácticamente en una zona del entorno para prevenir la infestación con una plaga susceptible. Preferentemente, la plaga ingiere o entra en contacto con una cantidad eficaz como plaguicida de polipéptido. Se entiende por "cantidad eficaz como plaguicida" una cantidad del plaguicida capaz de provocar la eliminación de al menos una plaga o de reducir notablemente el crecimiento de una plaga, su avivamiento o su desarrollo fisiológico normal. Dicha cantidad puede variar dependiendo de factores como por ejemplo la plaga diana específica que se vaya a controlar, la localización en el entorno en concreto, el emplazamiento agrícola, la planta o el cultivo que se va a tratar, las condiciones y el método del cultivo, el índice, concentración estabilidad y cantidad de aplicación de la composición de polipéptido eficaz contra la plaga. Las formulaciones pueden variar en relación con las condiciones climáticas, consideraciones sobre el entorno y/o la frecuencia de aplicación y/o gravedad de la infestación de la plaga.

Las composiciones plaguicidas descritas se pueden obtener formulando la célula, cristal y/o suspensión de esporas de la bacteria o el componente de proteína aislado con un vehículo agrícolamente aceptable deseado. Se pueden formular las composiciones antes de la administración en un liofilizado, deshidratado por congelación, desecado o en un vehículo, un medio acuoso o un diluyente adecuado, como por ejemplo solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden presentarse en forma de un material en polvo o granulado, una suspensión en aceite (vegetal o mineral) o agua o emulsiones aceite/agua, o un polvo humectable, o en combinación con cualquier material vehículo adecuado para aplicaciones agrícolas. Los vehículos agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son muy conocidos en la técnica. El término "vehículo agrícolamente aceptable" cubre todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes de pegajosidad, aglutinantes, etc. que se utilizan habitualmente en la tecnología de las formulaciones plaguicidas; son muy conocidos entre las personas especializadas en la formulación de plaguicidas. Es posible mezclar las formulaciones con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse a través de diferentes medios, p.ej., mezclado por homogeneización, combinación y/o triturado de la composición plaguicida con los adyuvantes adecuados utilizando técnicas de formulación convencionales. En la patente estadounidense No. 6.468.523. se describen formulaciones adecuadas y los métodos de aplicación.

"Plaga" incluye, sin limitarse a ellos, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, pulgas y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., en particular *Coleoptera*, *Lepidoptera* y *Diptera*.

El orden de los *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* y *Curculionoidea*. La superfamilia *caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae* y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye las familias *Cantharidae* y *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *Dermestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias *elateridae* y *Buprestidae*. La superfamilia *Cucujoidea* incluye la familia *Coccinellidae*. La superfamilia *Meloidea* incluye la familia *Meloidea*. La superfamilia *Tenebrionoidea* incluye la familia *Tenebrionidae*. La superfamilia *Scarabaeoidea* incluye las familias *Passalidae* y *Scarabaeidae*. La superfamilia *Cerambycoidea* incluye la familia *Cerambycidae*. La superfamilia *chrysomeloidea* incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia *Curculionoidea* incluye las familias *Curculionidae* y *Scolytidae*.

El orden de los *Diptera* incluye los subórdenes *Nematocera*, *Brachycera* y *Cyclorrhapha*. El suborden *Nematocera* incluye las familias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* y *cecidiomyiidae*. El suborden *Brachycera* incluye las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *bomblyidae* y *Dolichopodiidae*. El suborden *Cyclorrhapha* incluye las divisiones *Aschiza* y *Aschiza*. La división *Aschiza* incluye las familias *Phoridae*, *Syrphidae* y *Conopidae*. La división *Aschiza* incluye las secciones *Acalypterae* y *calypterae*. La sección *Acalypterae* incluye las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *calypterae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.

El orden de los *Lepidoptera* incluye las familias *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* y *Tineidae*.

- 5 Las plagas de insectos de la invención para cultivos principales incluyen Maíz: *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusanos grises; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, barrenador del maíz del suroeste; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del maíz; *Diatraea saccharalis*, barrenador del tallo de la caña de azúcar; *diabrotica virgifera*, gusano alfilerillo del maíz; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Melanotus* spp., gusanos del alambre; *Cyclocephala borealis*, escarabajo roedor enmascarado del norte (escarabajo blanco); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo roedor enmascarado del sur (escarabajo blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja del maíz; *anuraphis maidiradicis*, pulgón de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, langosta migratoria; *Hylemya platura*, mosca de los sembrados; *Agromyza parvicornis*, laminador de la hoja del maíz; *Anaphothrips obscurus*, mosquito relámpago; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, ácaro de dos puntos; Sorgo: *Chilo partellus*, barrenador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del maíz; *Feltia subterranea*, gusano cortador de gránulo; *Phyllophaga crinita*, escarabajo blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus* spp., gusanos del alambre; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de la hoja de maíz; *Sipha flava*, pulgón de la caña de azúcar amarillo; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquita del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, arañita roja carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro de dos puntos; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, oruga militar; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador del oeste; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del maíz; *Oulema melanopus*, babosilla del trigo; *Hypera punctata*, gorgojo de la alfalfa; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; pulgón del trigo ruso; *Schizaphis graminum*, pulgón verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón del grano inglés; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, langosta migratoria; *Mayetiola destructor*, mosca de Hessian; *Sitodiplosis mosellana*, mosquita del trigo; *Meromyza americana*, gusanos del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca de bombilla del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca sierra del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro de los bulbos; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla del brote de girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murfeldtiana*, mosquito de la semilla del girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano del brote del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Spodoptera exigua*, oruga militar de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado; *Anthonomus grandis*, gorgojo del algodón; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomo scelis seriatus*, pulga saltona del algodonoero; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca; *Lygus lineolaris*, chinche Lygus; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamonte diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, arañita roja carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro de dos puntos; Arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Colaspis brunnea*, colapsis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, gorgojo acuático del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, pulga saltona del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chiche apestosa verde; Soja: *Pseudoplusia includens*, falsa medidora; *Anticarsia gemmatilis*, oruga de las leguminosas; *Plathypena scabra*, gusano verde de la soja; *Ostrinia nubilalis*, barrenador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, oruga militar de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano del brote de algodón; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo del frijol mejicano; *Myzus persicae*, pulgón del melocotón verde; *Empoasca fabae*, pulga saltadora de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche hedionda verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, mosca de los sembrados; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña roja de las fresas; *Tetranychus urticae*, ácaro de dos puntos; Cebada: *Ostrinia nubilalis*, barrenador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, pulgón verde de los cereales; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinches; *acrosternum hilare*, chinches verdes comunes; *Euschistus servus*, chinche café apestosa; *Delia platura*, mosca de los sembrados; *Mayetiola destructor*, mosca de Hessian; *Petrobia latens*, ácaro tetraníquido; Colza oleaginosa: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la calabaza; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo pulga; *Mamestra configurata*, oruga militar de Bertha; *Plutella xylostella*, palomilla de dorso de diamante; *delia* spp., gusanos de las raíces.

60 Los nematodos incluyen nematodos parásitos como nematodos de nódulo en la raíz, quísticos y de lesión, entre los que se incluyen *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. y *Globodera* spp.; en particular miembros de los nematodos quísticos incluyendo, pero sin limitarse a ellos *Heterodera glycines* (nematodo quístico de la soja); *Heterodera schachtii* (nematodo quístico de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodo quístico del cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos quísticos de la patata). Entre los nematodos de lesión se incluye *Pratylenchus* spp.

65

Métodos para aumentar el rendimiento de la planta

Se proporciona métodos para aumentar el rendimiento de la planta. Los métodos comprenden proporcionar una planta o célula de la planta que expresa un polinucleótido que codifica la secuencia del polipéptido plaguicida divulgado en el presente documento y el desarrollo de la planta o una semilla de la misma en un campo infestado con una plaga contra la que dicho plaguicida tiene actividad. En algunas realizaciones, el polipéptido tiene actividad plaguicida contra plagas de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nematodos y dicho campo está infestado con plagas de lepidópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros o nematodos. Tal como se define en el presente documento, el “rendimiento” de la planta se refiere a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Se entiende por “biomasa” cualquier producto de la planta medido. Un aumento en la producción de la biomasa es cualquier mejora del rendimiento del producto de la planta medido. El aumento del rendimiento de la planta tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, aumentar la biomasa de la hoja de la planta puede aumentar la producción de verduras con hoja para el consumo humano y animal. Asimismo, aumentar la biomasa de la hoja puede emplearse para aumentar la producción de productos industriales o farmacéuticos derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento significativo, incluyendo, sin limitarse a ellos, un aumento de al menos 1 %, un aumento de al menos 3 %, un aumento de al menos 5 %, un aumento de al menos 10 %, un aumento de al menos 20 %, un aumento de al menos 30 %, al menos 50 %, al menos 70 %, al menos 100 % o un aumento mayor del rendimiento en comparación con la planta que no expresa la secuencia plaguicida.

Se puede tratar las plantas también con una o más composiciones químicas, incluyendo uno o más herbicidas, insecticidas o fungicidas. Entre los ejemplos de composiciones químicas se incluyen: herbicidas de frutales/verduras: Atrazina, Bromacil, diuron, Glifosato, Linuron, Metribuzina, Simazina, Trifluralina, Fluazifop, Glufosinato, Halosulfuron Gowan, Paraquat, Propizamida, Setoxidim, Butafenacil, Halosulfuron, Indaziflam; Insecticidas para frutales y hortalizas: Aldicarb, *Bacillus thuriangiensis*, carbaril, Carbofuran, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Diazinon, Malation, Abamectina, Ciflutrián/ beta-ciflutrina, Esfenvalerato, Lambda-cihalotrina, Acequinocil, Bifenazato, Metoxifenoza, Novaluron, cromafenoza, Tiacloprid, Dinotefuran, Fluacripirim, Tolfenpirad, Clotianidina, espirodiclofen, Gamma-cihalotrina, espiromesifen, spinosad, Rynaxypyr, Ciazipir, Spinoteram, Triflumuron, Espirotetramat, Imidacloprid, Flubendiamida, Tiodicarb, Metaflumizona, Sulfoxaflor, Ciflometofen, Cianopirafen, Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, Spinotoram, Tiodicarb, Flonicamid, Metiocarb, Emamectina-benzoato, Indoxacarb, Foztiazoato, Fenamifos, Cadusafos, Piriproxifen, Fenbutatin-óxido, Hextiazox, Metomil, 4-[[[6-Clorpiridin-3-il]metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona; Fungicidas para frutas y hortalizas: Carbendazim, Clorotalonil, EBDCs, azufre, Tiofanato-metilo, Azoxistrobina, cimoxanil, Fluazinam, Fosetil, Iprodiona, Kresoxim-metilo, Metalaxil/mefenoxam, Trifloxistrobina, Etaboxam, Iprovalicarb, Trifloxistrobina, Fenhexamid, Oxpoconazol fumarato, Ciazofamid, Fenamidona, Zoxamida, Picoxistrobina, Piraclostrobina, Cliflufenamid, Boscalid; Herbicidas para cereales: Isoproturon, Bromoxinil, Ioxinil, Fenoxis, Clorsulfuron, clodinafop, Diclofop, Diflufenican, Fenoxaprop, Florasulam, Fluroxipir, Metsulfuron, Triasulfuron, Flucarbazona, Iodosulfuron, Propoxicarbazona, Picolinafen, Mesosulfuron, Beflbutamid, Pinoxaden, Amidosulfuron, Tifensulfuron, Tribenuron, Flupirsulfuron, Sulfosulfuron, Pirasulfotol, Piroxsulam, Flufenacet, Tralkoxididim, Piroxasulfon; Fungicidas para cereales: Carbendazim, Clorotalonil, Azoxistrobina, Ciproconazol, Ciprodinil, Fenpropimorfo, Epoxiconazol, Kresoxim-metilo, Quinoxifen, Tebuconazol, Trifloxistrobina, Simeconazol, Picoxistrobina, Piraclostrobina, Dimoxistrobina, Protiocanazol, Fluoxastrobin; Insecticidas para cereales: Dimetoato, Lambda-cihaltrina, Deltametrina, alfa-Cipermetrina, beta-ciflutrina, Bifentrina, Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotefuran, clorifrifos, Metamidofos, Oxidemeton-metilo, Pirimicarb, Metiocarb; Herbicidas del maíz: Atrazina, Alaclor, Bromoxinil, acetoclor, Dicamba, Clopiralid, (S-Dimetenamid, Glufosinato, Glifosato, Isoxaflutol, (S-)Metolaclor, Mesotriona, Nicosulfuron, Primisulfuron, Rimsulfuron, Sulcotriona, Foramsulfuron, Topramezona, Tembotriona, Saflufenacil, Tiencarbazona, Flufenacet, Piroxasulfon; Insecticidas del maíz: Carbofuran, Clorpirifos, Bifentrina, Fipronil, Imidacloprid, Lambda-Cihalotrina, Teflutrina, Terbufos, Tiametoxam, Clotianidina, Spiromesifen, Flubendiamida, Triflumuron, Rynaxypyr, Deltametrina, Tiodicarb, beta-Ciflutrina, Cipermetrina, Bifentrina, Lufenuron, Triflumuron, Teflutrina, Tebupirimfos, Etiprol, Ciazipir, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotefuran, Avermectina, Metiocarb, espirodiclofen, Espirotetramat; Fungicidas del maíz: Fenitropan, Tiram, Protiocanazol, Tebuconazol, Trifloxistrobin; Herbicidas del arroz: butaclor, Propanil, Azimsulfuron, Bensulfuron, Cihalofop, Daimuron, Fentrazamida, Imazosulfuron, Mefenacet, Oxaziclomefona, Pirazosulfuron, Piributicarb, Quinclorac, Tiobencarb, Indanofan, Flufenacet, Fentrazamida, Halosulfuron, Oxaziclomefona, Benzobiclon, Pirifitalid, Penoxsulam, Bispiribac, Oxadiargil, Etoxisulfuron, Pretilaclor, Mesotriona, Tefuriltriona, Oxadiazona, Fenoxaprop, Pirimisulfan; Insecticidas del arroz: Diazinon, Fenitropan, Fenobencarb, Monocrotofos, Benfuracarb, Buprofezina, Dinotefuran, Fipronil, Imidacloprid, Isoproturon, Tiacloprid, Cromafenoza, Tiacloprid, Dinotefuran, Clotianidina, Etiprole, Flubendiamida, Rynaxypyr, Deltametrina, Acetamiprid, Tiametoxam, ciazipir, Spinosad, Spinotoram, Emamectin-Benzoato, Cipermetrina, Clorpirifos, Cartap, Metamidofos, etofenprox, Triazofos, 4-[[[6-Clorpiridin-3-il]metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on, Carbofuran, Benfuracarb; Fungicidas del arroz: Tiofanato-metil, Azoxistrobina, Carpropamid, Edifenfos, Ferimzona, Iprobenfos, Isoprotolan, Pencicuron, Probenazol, Piroquilon, Triciclazol, Trifloxistrobina, Diclocimet, Fenoxanil, Simeconazol, Tiadinil; Herbicidas del algodón: Diuron, Fluometuron, MSMA, Oxifluorfen, Prometrina, Trifluralina, Carfentrazona, Cletodim, fluazifop-butilo, Glifosato, Norflurazon, Pendimetalina, Piritiobac-sódica, Trifloxisulfuron, Tepraloxidim, Glufosinato flumioxazina, Tiazuron; Insecticidas del algodón: Acefato, Aldicarb, Clorpirifos, Cipermetrina, Deltametrina, Malation, Monocrotofos, Abamectina, Acetamiprid, Emamectin Benzoato, Imidacloprid, Indoxacarb, Lambda-Cihalotrina, Spinosad, Tiodicarb, Gamma-Cihalotrina, Spiromesifen, Piridail, Flonicamid, Flubendiamida, Triflumuron,

Rynaxypyr, Beta-Ciflutrina, Espirotetramat, clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Dinotofuran, Flubendiamida, Ciazipir, Spinosad, Spinotoram, gamma Cihalotrina, 4-[[[(6-Clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on, Tiodicarb, Avermectina, Flonicamid, Piridalil, Spiromesifen, Sulfoxaflor, Profenofos, Triazofos, Endosulfan; Fungicidas del algodón: Etridiazol, Metalaxil, Quintozeno; Herbicidas de la soja: Alaclor, Bentazona, Trifluralina, Clorimuron-Etil, Cloransulam-metilo, Fenoxaprop, fomesafen, Fluazifop, Glifosato, Imazamox, Imazaquina, Imazetapir, (S-)Metolaclor, Metribuzina, Pendimetalina, Tepraloxidim, Glufosinato; Insecticidas de la soja: Lambda-cihalotrina, Metomil, Paration, Tiocarb, Imidacloprid, clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotofuran, Flubendiamida, Rynaxypyr, Ciazipir, Spinosad, Spinotoram, Emamectin-Benzoato, Fipronil, Etiprole, Deltametrina, β -Ciflutrina, gamma y lambda Cihalotrina, 4-[[[(6-Clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on, Espirotetramat, Spinodiclofen, Triflumuron, Flonicamid, Tiodicarb, beta-Ciflutrina; Fungicidas de la soja: Azoxistrobina, Ciproconazol, Epoxiconazol, Flutriafol, Piraclostrobin, Tebuconazol, Trifloxistrobina, Protiocconazol, Tetraconazol; Herbicidas de la remolacha azucarera: Cloridazon, Desmedifam, etofumesato, Fenmedifam, Triallato, Clopiralid, Fluazifop, Lenacil, Metamitron, Quinmerac, Cicloxidim, Triflusalufuron, Tepraloxidim, Quizalofop; Insecticidas de la remolacha azucarera: Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, Tiacloprid, Acetamiprid, Dinotofuran, Deltametrina, β -Ciflutrina, gamma/lambda Cihalotrina, 4-[[[(6-Clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on, Teflutrina, Rynaxypyr, Ciazipir, Fipronil, Carbofuran; Herbicidas de canola: clopiralid, Diclofop, Fluazifop, Glufosinato Glifosato, Metazaclor, Trifluralin Etametsulfuron, Quinmerac, Quizalofop, cletodim, Tepraloxidim; Fungicidas de canola: Azoxistrobina, Carbendazim, Fludioxonil, Iprodiona, Procloraz, Vinclozolin; Insecticidas de canola:

carbofuran, Organofosfatos, Piretroides, Tiacloprid, Deltametrina, Imidacloprid, Clotianidina, Tiametoxam, acetamiprid, Dinotofuran, β -Ciflutrina, gamma y lambda Cihalotrina, tau-Fluvalerato, Etiprol, Spinosad, Spinotoram, flubendiamida, Rynaxypyr, Ciazipir, 4-[[[(6-Clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-on.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar y no limitan en ningún modo.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

Ejemplo 1: Descubrimiento de nuevos genes plaguicidas de *Bacillus thuringiensis*

Se identificaron nuevos genes plaguicidas de la cepa bacteriana Zj22 siguiendo las siguientes etapas:

- Preparación de ADN extracromosómico de la cepa. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos entre los siguientes: plásmidos de diversos tamaños; cromosomas del fago; fragmentos genómicos de ADN no separados a través del protocolo de purificación; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.
- Cizallamiento mecánico o enzimático del ADN extracromosómico para generar fragmentos distribuidos por tamaños.
- Secuenciación del ADN fragmentado a través de métodos de pirosecuenciación de alta producción.
- Identificación de supuestos genes de toxina por homología y/u otros análisis de computación.
- Cuando se requiere, finalización de secuencia del gen de interés por una de las varias estrategias de clonación o PCR (p.ej., TAIL-PCR).

Tabla 1. Nuevos genes identificados desde la cepa Zj22

Nombre de gen	Peso molecular (kD)	Homólogo más próximo	Nucleótido SEQ NO	Aminoácido SEQ ID NO
Axmi221z	138.3	62,1 % Cry9Aa 60,1 % Cry1Aa 84,0% Cry9Aa (truncada)	1	21 22 (truncada) 23 (truncada)
Axmi222z	141.1	86,5 % Cry1Bf 86,4 % Cry1Ba 76,2 % Cry1Bf (truncada) 76,2 % Cry1Ba (truncada)	2	24 25 (truncada) 26 (truncada)
axmi223z	80.9	84,7 % Cry1Ia 82,1 % Cry1If 81,9 % Cry1Id 81,8 % Cry1Ie 81,2 % Cry1Ib 78,2 % Cry1Ic	3	27 28 (sitio de inicio alternativo)

Nombre de gen	Peso molecular (kD)	Homólogo más próximo	Nucleótido SEQ ID NO	Aminoácido SEQ ID NO
axmi224z	75	98,9 % Cry2Af 93,5 % Cry2Ab1 93,0% Cry2Ae1 91,2 % Cry2Ad1	4	29 30 (sitio de inicio alternativo)
Axmi225z	133.2	98,6 % Cry1Ab18 94,8 % Axmi112 94,8 % Cry1Ae1 94,8 % Cry1Ab1 98,6 % Cry1Ab18 (truncada) 98,0% Cry1Ab1 (truncada) 95,6 % Cry1Ae1 (truncada) 95,4 % Axmi112 (truncada)	5	31 32 (truncada)

Se amplifica el gen de toxina divulgado en el presente documento por PCR a partir de pAX980 y se clona el producto de PCR en el vector de expresión de *Bacillus* pAX916, u otro vector adecuado a través de métodos conocidos en la técnica. Se cultiva la cepa de *Bacillus* resultante que contiene el vector con el gen *axmi* en un medio de cultivo convencional, como por ejemplo medio CYS (10 g/l Bacto-casitona; 3 g/l extracto de levadura; 6 g/l KH₂PO₄; 14 g/l K₂HPO₄; 0,5 mM MgSO₄; 0,05 mM MnCl₂; 0,5 mM FeSO₄), hasta que es evidente la esporulación según el examen microscópico. Se preparan muestras y se determina su actividad en bioensayos.

10 Ejemplo 2. Ensayos de actividad plaguicida

Se pueden someter a ensayo las secuencias de nucleótidos de la invención para determinar su capacidad para producir proteínas plaguicidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como plaguicida sobre las plagas se suele evaluar de diversas formas. Una manera muy conocida dentro de la técnica consiste en realizar un ensayo de alimentación. En dicho ensayo de alimentación, se expone la plaga a una muestra que contiene o bien los compuestos que se van a analizar o bien muestras de control. A menudo, esto se realiza colocando el material que se va a analizar, o una dilución adecuada de dicho material, sobre un material que vaya a ingerir la plaga, como por ejemplo una dieta artificial. El material sometido a ensayo puede estar compuesto de un líquido, un sólido o una suspensión espesa. El material que se somete a ensayo puede colocarse sobre una superficie y dejarlo secar a continuación. Alternativamente, se puede mezclar el material que se va a someter a ensayo con una dieta artificial fundida, que se dispensa después en la cámara de ensayo. Dicha cámara de ensayo puede consistir por ejemplo en un vaso, un plato, un pocillo o una placa de microtitulación.

Los ensayos para las plagas succionadoras (por ejemplo pulgones) pueden incluir la separación del material de ensayo del insecto mediante una división, idealmente una porción que pueda ser perforada por las piezas succionadoras de la boca del insecto succionador para permitir la ingestión del material de ensayo. A menudo se mezcla el material de ensayo con un estimulante de la alimentación como sacarosa para promover la ingestión del compuesto de ensayo.

Otros tipos de ensayos pueden incluir la microinyección del material de ensayo en la boca o el intestino de la plaga, así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido de un análisis para determinar la capacidad de la plaga para alimentar la planta transgénica. El análisis de la planta puede implicar el aislamiento de las partes de la planta que se consumen normalmente, por ejemplo, en cajas pequeñas con las hojas o el aislamiento de plantas enteras en cajas que contienen los insectos.

Dentro de la técnica se conocen otros métodos y enfoques para someter a ensayo las plagas y se pueden encontrar, por ejemplo en Robertson y Preisler, eds. (1992) *Pesticide bioassays with arthropods*, CRC, Boca Raton, FL. Alternativamente, se describen ensayos de forma habitual en las publicaciones *Arthropod Management Tests* y *Journal of Economic Entomology* o y también las explicaciones que facilita la Sociedad Entomológica de América (ESA).

En algunas realizaciones, las regiones de ADN que codifican los dominios de toxina de las delta-toxinas divulgadas en el presente documento se clonan en el vector de expresión de *E. coli* pMAL-C4x tras el gen *malE* que codifica proteína de unión a maltosa. (MBP). Estas fusiones dentro del marco tienen como resultado la expresión de proteínas de fusión MBP-Axmi en *E. coli*.

Para la expresión en *E. coli*, se transforman BL21*DE3 con plásmidos individuales. Se inoculan colonias simples en LB suplementado con carbenicilina y glucosa y se cultivan durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se inocula

en el medio nuevo 1% del medio de cultivo de toda la noche y se deja crecer a 37 °C en fase logarítmica. A continuación, se inducen los cultivos con 0,3 mM IPTG durante toda la noche a 20 °C. Se suspende cada aglomerado de células en 20 mM de tampón Tris-Cl, pH 7,4 + 200 mM NaCl + 1 mM DTT + inhibidores de proteasa y se somete a sonicación. Se puede emplear el análisis por SDS-PAGE para confirmar la expresión de las proteínas de fusión.

A continuación, se hace correr el total de los extractos sin células sobre una columna de amilosa unida a cromatografía de líquidos de la proteína rápida (FPLC) para la purificación por afinidad de las proteínas de fusión MBP-axmi. Se eluyen las proteínas de fusión unidas desde la resina con 10 mM de solución de maltosa. A continuación, se escinden las proteínas de fusión purificadas con Factor Xa o tripsina para eliminar la etiqueta MBP amino terminal de la proteína Axmi. La escisión y la solubilidad de las proteínas se pueden determinar por SDS-PAGE.

Ejemplo 3. Expresión y purificación de genes axmiz

Se clonaron versiones truncadas de axmi221z y axmi222z en el vector de expresión de proteína unida a maltosa (MB) con el resultado de pAX5092 y pAX5093, respectivamente. Se indujo por IPTG la expresión de la proteína de fusión resultante. A continuación, se purificó la proteína a través de una columna de maltosa y se escindió con Factor Xa de proteasa para generar una proteína purificada sin etiquetado. Se purificaron también las proteínas truncadas 6-his axmi221z y axmi222z sobre una columna de cobalto y se sometieron a bioensayos.

Se clonaron las versiones de longitud completa y truncada de algunos genes en el vector pRSF-1b tal como se muestra en la Tabla 2. En virtud de la clonación en este vector, la proteína expresada resultante contiene seis restos de histidina N-terminal adicionales.

Se clonaron por separado las regiones de ADN que codifica los dominios de toxina de algunos genes en un vector de expresión de *E. coli* pMAL-C4x por detrás del gen malE que codifica la proteína de unión a maltosa (MBP) tal como se muestra en la Tabla 2. Estas fusiones dentro del marco tuvieron como resultado proteínas de fusión MBP-AXMI. Se sometió a ensayo cada una de las proteínas producidas a partir de las construcciones anteriores en bioensayos como un aglomerado concentrado 10x.

Tabla 2. Construcciones Axmiz

gen	nombre de la construcción	vector principal	SEQ ID NO: de proteína codificada por la construcción
Axmi221z (longitud completa)	pAX5095	pRSF-1b	21
Axmi221z (longitud completa)	pAX7611	pAX916	21
axmi221z (trun2)	pAX5092	pMAL-C4x	23
axmi221z (trun2)	pAX5094	pRSF-1b	23
axmi221z (trun2)	pAX7610	pRSF-1b	23
axmi222z (longitud completa)	pAX5097	pRSF-1b	24
axmi222z (longitud completa)	pAX7613	pAX916	24
axmi222z (trun2)	pAX5093	pMAL-C4x	26
axmi222z (trun2)	pAX5096	pRSF-1b	26
axmi222z (trun2)	pAX7612	pAX916	26
axmi223z (longitud completa)	pAX6887	pMAL-C4x	27
axmi223z (sitio de inicio alternativo)	pAX6888	pMAL-C4x	28
axmi224z (sitio de inicio alternativo)	pAX7634	pRSF-1b	30
axmi224z (sitio de inicio alternativo)	pAX6890	pMAL-C4x	30
axmi225z (trun)	pAX6891	pMAL-C4x	32

Para la expresión de la proteína en *E. coli*, se transformó BL21*DE3 con plásmidos individuales. Se inoculó una sola colonia en medios LB suplementados con carbenicilina y glucosa y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se inoculó un medio nuevo 1 % del cultivo de toda la noche y se cultivó a 37 °C en fase logarítmica. A continuación, se indujeron los cultivos con 0,3 mM de IPTG durante toda la noche a 20 °C. Se suspendió cada aglomerado celular en 20 mM de tampón Tris-Cl, pH 7,4 + 200 mM NaCl + 1 mM DTT + inhibidores de proteasa y se sometieron a sonicación. El análisis por SDS-PAGE confirmó la expresión de proteínas de fusión.

Se cargó el total de extractos sin células en FPLC equipada con una columna de amilosa y se purificaron las proteínas de fusión MBP-AXMI por cromatografía de afinidad. Se eluyó la proteína de fusión unida desde la resina con solución de maltosa 10 mM. A continuación, se escindieron las proteínas de fusión purificadas con Factor Xa o tripsina para separar la etiqueta MBP amino terminal de la proteína AXMIz. Se determinó la escisión y la solubilidad de las proteínas por SDS-PAGE.

Ejemplo 4. Actividad de proteínas expresadas desde genes axmiz en bioensayos.

El bioensayo de los genes Axmiz expresados tuvo como resultado la observación de las siguientes actividades sobre las plagas de insectos:

5

Tabla 3. Actividad de proteínas expresadas en bioensayo

Plásmidos	Gen	BCW	CPB	DBM	ECB	FAW
pAX5095	axmi221z longitud completa					Detención ligera, sin mortalidad
pAX7611	axmi221z longitud completa			Detención fuerte, >75 % mortalidad		
pAX5092	axmi221z trun2			Detención fuerte >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	
pAX5094	axmi221z trun2		Detención		Detención fuerte, sin mortalidad	
pAX7610	axmi221z trun2			Detención fuerte, >75 % mortalidad		
pAX5097	axmi222z longitud completa					
pAX7613	axmi222z longitud completa	Detención ligera, sin Mortalidad		Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	
pAX5093	axmi222z trun2					
pAX5096	axmi222z trun2					
pAX7612	axmi222z trun2			Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, sin mortalidad
pAX6887	axmi223z longitud completa	Detención, sin mortalidad	Detención fuerte	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, sin mortalidad
pAX6888	axmi223z inicio alt	Detención, sin mortalidad	Detención fuerte	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, sin mortalidad
pAX7634	axmi224z inicio alt				Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, sin mortalidad
pAX6890	axmi224z inicio alt	Detención ligera, <<5 sin mortalidad % mortalidad 5 % mortalidad		Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención, sin mortalidad
pAX6891	axmi225z trun		Detención ligera, sin mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención fuerte, >75 % mortalidad	Detención, sin mortalidad

Tabla 4. Actividad de proteínas expresadas en bioensayo

Plásmido	Gen	Hv	Hz	SCB	SWCB	VBC
pAX5095	Axmi221z longitud completa				Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, <25 % Mortalidad
pAX7611	Axmi221z longitud completa	Detención intensa, sin Mortalidad		Detención intensa, <25 % Mortalidad		
pAX5092	Axmi221z trun2	Detención intensa, <25 % Mortalidad		Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX5094	Axmi221z trun2	Detención intensa, sin Mortalidad			Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, <25 % Mortalidad

Plásmido	Gen	Hv	Hz	SCB	SWCB	VBC
pAX7610	Axmi221z trun2			Detención intensa, <25 % Mortalidad		
pAX5097	Axmi222z longitud completa				Detención fuerte, >75 % Mortalidad	
pAX7613	Axmi222z longitud completa	Detención fuerte, >75 % Mortalidad		Detención fuerte, >75 % Mortalidad		Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX5093	Axmi222z trun2	Detención fuerte, >75 % Mortalidad		Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX5096	Axmi222z trun2	Detención fuerte, >75 % Mortalidad				Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX7612	Axmi222z trun2			Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	
pAX6887	axmi223z longitud completa	Detención, sin mortalidad	Detención, sin mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención intensa, sin mortalidad
pAX6888	axmi223z inicio alt	Detención fuerte, <25 % Mortalidad	Detención intensa, <75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención intensa, No Mortalidad
pAX7634	Axmi224 inicio alt	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, <25 % Mortalidad	Detención intensa, sin mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX6890	axmi224z inicio alt	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, sin mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad
pAX6891	axmi225z trun	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad	Detención fuerte, >75 % Mortalidad

BCW: *gusano cortador negro*
 CPB: *escarabajo colorado de la patata*
 5 DBM: *Palomilla de dorso de diamante*
 ECB: *barrenador del maíz europeo*
 FAW: *Cogollero del maíz*
 Hv: *Heliothis virescens*
 Hz: *Heliothis zea*
 10 SCB: *barrenador del maíz del sur*
 SWCB: *barrenador del maíz del suroeste*
 VBC: *Oruga de las leguminosas*

Ejemplo 5. Vectorización de genes para expresión en plantas

15 Se conectan las regiones codificantes de la invención con secuencias promotoras y de terminación adecuadas para la expresión en plantas. Dichas secuencias son muy conocidas dentro de la técnica y pueden incluir el promotor de actina del arroz o el promotor de ubiquitina del maíz para expresión en monocotiledóneas, el promotor UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor CaMV 35S para la expresión en dicotiledóneas y los terminadores nos o PinII. Las técnicas para producir y confirmar las construcciones promotor-gen-terminador son muy conocidas en la técnica.

20 En un aspecto de la invención, se designan y se generan las secuencias de ADN sintéticas. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de nucleótidos alterada en relación con la secuencia parental, pero codifica proteínas que son esencialmente idénticas para la secuencia parental. Véase, por ejemplo, la Tabla 4.

Tabla 4. Genes sintéticos que codifican proteínas AXMIz

Secuencia de síntesis	Nucleótido SEQ ID NO:
<i>axmi221zv02.02</i>	6
<i>axmi222zv02.02</i>	7
<i>axmi223zv03.02</i>	8
<i>axmi224zv03.02</i>	9
<i>axmi225zv02.02</i>	10
<i>axmi221zv02.03</i>	11
<i>axmi222zv02.03</i>	12
<i>axmi223zv03.03</i>	13
<i>axmi224zv03.03</i>	14
<i>axmi225zv02.03</i>	15
<i>axmi221zv02.04</i>	16
<i>axmi222zv02.04</i>	17
<i>axmi223zv03.04</i>	18
<i>axmi224zv03.04</i>	19
<i>axmi225zv02.04</i>	20

En otro aspecto de la invención, se diseñan versiones modificadas de genes sintéticos de manera que el péptido resultante se dirige a un orgánulo de la planta, como el retículo endoplásmico o el apoplasto. Las secuencias de péptidos conocidas por resultar para dirigir proteínas de fusión a orgánulos de plantas son conocidas dentro de la técnica. Por ejemplo, dentro de la técnica se sabe que la región N-terminal del gen de fosfatasa ácida de lupino blanco *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127: 594-606) tiene resultado para dirigir al retículo endoplásmico proteínas heterólogas. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención de retículo endoplásmico que comprende el péptido N-termino lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir el motivo "KDEL", SEQ ID NO: 33) en el término C, la proteína de fusión se dirigirá al retículo endoplásmico. Si la proteína carece de una secuencia de dirección a retículo endoplásmico en el término C, la proteína se dirigirá al retículo endoplásmico pero, en definitiva, será secuestrada en el apoplasto.

Por lo tanto, este gen codifica una proteína de fusión que contiene treinta y un aminoácidos N-terminales del gen ácido fosfatasa de lupino blanco *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI: 14276838, Miller et al., 2001, *supra*) fusionado con el N-término de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia KDEL en el C-término. Por lo tanto, se prevé que la proteína resultante se dirija al retículo endoplásmico de la planta tras la expresión en una célula de la planta.

Los casetes de expresión de la planta descritos anteriormente se combinan con un marcador genético de la planta apropiado para facilitar la selección de células y tejidos transformados y ligados en los vectores de transformación de la planta. Éstos pueden incluir vectores primarios de transformación mediada por *Agrobacterium* o vectores de plásmido simples para transformación por aerosol o biobalística.

Ejemplo 6. Transformación de células de maíz con los genes de proteína plaguicida descritos en el presente documento

Las mazorcas de maíz se recogen preferiblemente 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las mazorcas y, preferentemente, se utilizan en la transformación los embriones con un tamaño de 0,8-1,5 mm. Se colocan los embriones en placas con los escutelos hacia arriba en un medio de incubación adecuado como, por ejemplo, medio DN62A5S (3,98 g/l sales N6; 1 ml/l (de 1000 x de reserva) N6 vitaminas; 800 mg/l L-Asparagina; 100 mg/l Mio-inositol; 1,4 g/l L-Prolina; 100 mg/l Casaminoácidos; 50 g/l sacarosa; 1 ml/l (of 1 mg/ml reserva) 2,4-D). No obstante, pueden ser adecuados otros medios y sales diferentes a DN62A5S, que son conocidos dentro de la técnica. Se incuban los embriones durante toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario en sí incubar los embriones durante toda la noche.

Se transfieren los explantes resultantes a cuadrados de malla 830-40 por placa), se transfieren a un medio osmótico durante aproximadamente 30-45 minutos, a continuación, se transfieren a una placa de haces (véase por ejemplo la publicación PCT No. WO/0138514 y la patente estadounidense No. 5.240.842).

Se acelera la construcción de los ADN diseñados para los genes de la invención en células vegetales en un tejido vegetal utilizando un acelerador de haces de aerosol, utilizando las condiciones esenciales descritas en la publicación PCT No. WO/0138514. Después de los destellos con haces, se incuban durante aproximadamente 30 minutos en medios osmóticos y se colocan en un medio de incubación durante toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Para evitar explantes irradiados indebidamente, se incuban durante al menos 24 horas antes de transferirlos al medio de recuperación. A continuación, se extienden los embriones en un medio de período de recuperación durante aproximadamente 5 días, a 25 °C en la oscuridad, y después se transfieren a medio de selección. Se incuban los explantes en medio de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la sección utilizada. Después del período de selección, se transfiere el callo

resultante al medio de maduración de embrión, hasta observar la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, se colocan los embriones somáticos maduros bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración a través de métodos conocidos en la técnica. Se deja que los brotes resultantes enraícen en un medio de enraizamiento y se transfieren las plantas resultantes a tientos de incubadora y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medios DN62A5S

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla de sal basal de Chu N6 (Prod. No. C 416)	3,98 g/l	Phytotechnology Labs
Solución de vitaminas de Chu N6 (Prod. No. C 149)	1 ml/l (de 1000x reserva)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/l	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/l	Sigma
L-Prolina	1,4 g/l	Phytotechnology Labs
Casaminoácidos	100 mg/l	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/l	Phytotechnology Labs
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 ml/l (de 1 mg/ml reserva)	Sigma

Se ajusta el pH de la solución a un pH 5,8 con 1N KOH/1N KCl, se añade Gelrite (Sigma) a una concentración de hasta 3g/l, y se introduce el medio en autoclave. Después de enfriar a 50 °C, se añaden 2 ml/L de una solución de reserva de 5 mg/ml de nitrato de plata (Phytotechnology Labs).

Ejemplo 7. Transformación de los genes de la invención en células de la planta por transformación mediada con *Azrobacterium*

Las mazorcas de maíz se recogen preferiblemente 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las mazorcas y, preferentemente, se utilizan en la transformación los embriones con un tamaño de 0,8-1,5 mm. Se colocan los embriones en placas con los escutelos hacia arriba y se incuban durante toda la noche a 25 °C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario en sí incubar los embriones durante toda la noche. Se ponen en contacto los embriones con una cepa *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia plásmido ti durante aproximadamente 5-10 minutos y después se colocan en un medio de co-cultivo durante aproximadamente 3 días (25 °C en la oscuridad). Después del co-cultivo, se transfieren los explantes a un medio de período de recuperación durante aproximadamente cinco días (a 25 °C en la oscuridad). Se incuban los explantes en medio de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección utilizadas. Después del período de selección, se transfiere el callo resultante al medio de maduración de embrión hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. A continuación, se colocan los embriones somáticos maduros resultantes bajo luz tenue y se inicia el proceso de regeneración tal como se conoce en la técnica.

Aunque la invención expuesta se ha descrito con detalle a modo de ilustración y con ejemplos para mayor claridad, es evidente que son posibles cambios y modificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kimberly Sampson Daniel Tomso

<120> GENES DELTA-ENDOTOXINA AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z Y AXMI225z Y MÉTODOS PARA SU USO

<130> 045600/385630

<160> 33

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 3687

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 1

ES 2 647 595 T3

atgaatcaaa ataaacacgg aattattggc gcttccaatt gtggttgtag gtcagataat 60
 gttgcgaaat atccttttagc caacaatcca tattcatctg ctttaaattt aaattcctgt 120
 caaaatagta gtattctcaa ctggattaac ataataggcg atgcagcaaa agaagcagta 180
 tctattggga caacaatagt ctctcttacc acagcacctt ctcttactgg attaatttca 240
 atagtatatg accttatagg taaagtacta ggaggtagta gtggccaatc catatcagat 300
 ttgtctatat gtgaacttatt atctattatt gatttgcggg taaatcagag tgttttaaat 360
 gatgggattg cagattttaa tggttctgta ctcttataca ggaactattt agaggctctg 420
 gatagctgga ataagaatcc taattctgct tctgctgaag aactccgtac tctgtttaga 480
 atcgcgtgact cagaatttga tagaatttta acacgagggg ctttaacgaa tgggtggctcg 540
 ttagctagac aaaatgcccc aatattatta ttaccttctt ttgcgagtgc tgcatttttc 600
 catttattac tactaagggg tgctactaga tatggcacta attgggggct atacaatgct 660
 acacctttta taaattatca atcaaaacta gtagagctta ttgaactata tactgattat 720
 tgcgtacatt ggtataatcg aggtttcaac gaactaaggc aacgaggcac tagtgctaca 780
 gcttgggttag aatttcatag atatcgtaga gagatgacat tgatggattt agatatagta 840
 gcatcatttt caagtcttga tattactaat tacccaatag aaacagattt tcagttgagt 900
 agggtcattt atacagatcc aattggtttt gtacatcgta gtagtcttag ggggaaagt 960
 tggtttagct ttgttaatag agctaatttc tcagatttag aaaatgcaat acctaatcct 1020
 agaccgtctt ggttttttaa taatatgatt atactactg gttcacttac attgccogtt 1080
 agtccaaata ctgatagagc gagagtatgg tatgggagcc gagatagaat ttcccctgct 1140
 aattcacaag taatttctga gctgatttct gggcaacata cgaattctac acaaactatt 1200
 ttagggcgaa atatatctag aatagattct caagcatgta atttaaatga taccacatat 1260
 ggagtaaaaca gggctgtatt ttatcatgat gctagtgaag gttctcaaag atcagtgtac 1320
 gaagggttta ttagaacaac tggaaatagat aatcctagag ttcagaatat taatacttat 1380
 tttcctggag aaaattcaaa tatcccaact ccagaagact atactcattt attaagtaca 1440
 acagtaaatt taacaggagg tcttagacaa gtagcaata atcgtcgttc atctatagta 1500
 atttatgggt ggacacataa agtctaact cgtaacaata ctattaatcc aggtattatt 1560
 acacaaatcc caatggttaa attatccaat ctcccttcag gtactaatgt tggtagaggg 1620
 ccaggattta caggtggaga tatccttcgt agaacgaatg ctggtaactt tggagatgta 1680
 cgagtcaata ttgctggatc attatcccaa agatatcgcg taaggattcg ttatgcttct 1740
 actacaaatt tacaattcca cacatcaatt aacggaagag ctattaatca agcgaatttt 1800
 ccagcaacta tgaatatagg tgctagctta aactatagaa cctttagaac tgtaggattt 1860
 acaactccat ttactttttc agaagcatca agcatattta cattaagtac tcattccttc 1920
 agttcaggca atgcagttta tatagatcga attgaatttg tcccggcaga agtaacattc 1980
 gaggcagaat ctgatctaga aagagcacag aaggcgggtga atgcgctgtt tacttcttcc 2040
 aatcaaatcg gcttaaaaaac agatgtgacg gactatcata ttgatcaagt ttccaattta 2100
 gttgcgtggt tatcggatga attttgtctg gatgaaaagc gagagttgtc cgagaaagtc 2160
 aaacatgcga agcgactcag tgatgagcga aatttacttc aagatccaaa cttcagaggc 2220
 atcaatagac aactagaccg tggttggaga ggaagtacgg atattacat ccaaggtgga 2280
 gatgacgtat tcaaagagaa ttacgtcaca ctgccgggta cctttgatga gtgctatcca 2340
 acatatttat atcaaaaaat agatgagtcg aaattaaaag cctatacccg ctatgaatta 2400

ES 2 647 595 T3

```

agagggtata ttgaagatag tcaagactta gaagtctatt tgatcogtta caatgcaaaa 2460
cacgaaacgt taaatgtgcc aggtacgggt tccttatggc cacttgcagc cgaaagtcca 2520
atcgggaggt gcggcgaacc gaatcgatgc gcgccacata ttgaatggaa tcctgaccta 2580
gattgttcgt gtagggatgg agaaaaatgt gcacatcatt ctcatcattt ctcttggat 2640
attgatgttg gatgtacaga cttaaagatg gatttaggtg tatgggtgat attcaagatt 2700
aagacgcaag atggccacgc aagacttggg aatctagagt ttctcgaaga gaaaccatta 2760
ttaggagaag cgctagctcg tgtgaagaga gcggagaaaa aatggagaga caaacgcgac 2820
aaattggaat tggaaacaaa tattgtttat aaagaggcaa aagaatctgt agatgcttta 2880
ttcgtagatt ctcaatataa tagattacaa acggatacga acattgcgat gattcatgcg 2940
gcagataaac gcgttcacgc aatccgagaa gcgtatctgc cagagttgtc tgtaattccg 3000
gggtgtcaatg cggctatatt cgaagaatta gaaggtctta ttttcactgc attctcccta 3060
tatgatgcga gaaatgtcat taaaaacgga gatttcaatc atggtttatc atgctggaac 3120
gtgaaagggc atgtagatgt agaagaacaa aataaccacc gttcggctct tgttgtcccg 3180
gaatgggagg cagaagtgtc acaagaagtc cgcgatgtc caggacgtgg ctatatcctg 3240
cgtgtcacag cgtacaaaga gggctacgga gaaggatgcg taacgatcca tgaaattgaa 3300
gatcatacag acgaactgaa atttagaaac tgtgaagaag aggaagggta tccaaataac 3360
acggtaacgt gtaatgatta tactgcgaat caagacgaat acaaggggtc gtacccttct 3420
cgtaatggtg gatatgagga tacatatgac acttcagcat ctgttcatta caacacacca 3480
acgtacgaag aagaaatagg aacagatcta cagagatata atcagtgtga aaataacaga 3540
ggatatggaa attacacacc actaccagca ggttatgtaa caaaagaatt agagtacttc 3600
ccagaaacag ataaagtatg gatagagatt ggcgaaacgg aaggaacatt catcgtagac 3660
agtgtggaat tactcctcat ggaggaa 3687

```

- <210> 2
- <211> 3711
- <212> ADN
- <213> *Bacillus thuringiensis*
- <400> 2

5

ttgaattcaa	ataggaaaa	tgagaacgaa	attatagatg	cttcatttat	tcccgcagta	60
tccaatgagt	ctgttacaat	ctctaaagaa	tatgcacaaa	caaatcaatt	acaaaacaat	120
agcattgagg	atggtttgtg	tatagccgaa	ggggaatata	ttgatccatt	tgtagcgca	180
tcaacagtcc	aaacgggat	tagtatcgct	ggtagaatat	tgggtgtatt	aggtgtgccc	240
tttgcggac	aattagctag	tttttatagt	tttattgttg	gtgaattatg	gcctaaaggc	300
agagaccaat	gggaaatfff	tatggaacat	gtagaacaac	ttgtaagaca	acaaataaca	360
gcaaatgcta	ggaatacggc	cottgctoga	ttacaagggt	taggagattc	ctttagagcc	420
tatcaacagt	cacttgaaga	ttggctagag	aacogtaatg	atgcaagaac	gagaagtgtt	480
ctttatactc	aatatatagc	cttagagctt	gattttctaa	atgcatgccc	gcttttcgca	540
ataagagagc	aagaggttcc	cttattaatg	gtatacgctc	aagctgcaaa	cttgcaccta	600
ttattattga	gagacgcctc	cctttatggt	cgtgaatttg	ggcttaacct	ccaagaaatt	660
caacgttatt	atgaacgcca	agttagaaaga	acgagggact	attctgacca	ttgctgcaa	720
tggataata	cgggtctaaa	taacttaaga	gggacaaatg	ctgaaagttg	ggtgcggtat	780
aatcaattcc	gtagagacct	aacattaggg	gtattagatc	tagtggcact	attcccaagc	840
tatgacactc	gcacttatcc	aataaatagc	agtgtcagc	taacaagggg	agtttataca	900
gacgcaattg	gagcaacagg	ggtaaatatg	gcaagtatga	attggtataa	taataatgca	960
ccttcgtttt	ccgctataga	gactgcggtt	atccgaagcc	cgcatctact	tgattttcta	1020
gaacaactta	aaatfffftag	cgcttcatca	cgatggagta	atactaggca	tatgacttat	1080
tggcgggggc	acacgattca	atctcggcca	ataagagggg	cattaattac	ctcgacacac	1140
ggaaatacca	atacttctat	taaccctgta	acattocagt	tcccgcccg	agaagtttat	1200
aggactgaat	catatgcagg	agtgttctta	tggggaattt	acottgaacc	tattcatggt	1260
gttcctactg	ttagatttaa	ttttaggaac	cctcagaata	cttttgaaag	aggtactgct	1320
aactatagtc	aaccctatga	gtcacctggg	cttcaattaa	aagattcaga	aactgaatta	1380
ccaccagaaa	caacagaacg	accaaattat	gaatcatata	gtcatagatt	atctcacata	1440
gggatcattt	tacaaactag	gttgaatgta	cgggtatatt	cttggacgca	tcgtagtgca	1500
gatcgtacaa	atacaattgg	accaaataga	attactcaaa	ttcctgcagt	gaagggaaac	1560
cttcttttta	atggttctgt	aatttcagga	ccaggattta	ctggtgggga	cttagttaga	1620
ttaaataata	gtggaataa	tattcaaat	agaggctatc	ttgaggttcc	aattcaattc	1680
acatcgacat	ctaccagata	tcgagttcgt	gtacgttatg	cttctgtaac	cccgattcac	1740
ctcagtgtta	attggggtaa	ttcaaacatt	ttttccagca	cagttccagc	tacagctgcg	1800
tcattagata	atctacaatc	aagggatfff	ggttatfff	aaagtaccaa	tgcatttaca	1860
tctgtaacag	gtaatgtagt	aggtgtaaga	aatffftagtg	aaaatgccag	agtgataata	1920
gacagatttg	aatfffattcc	agttactgca	acottogaag	cagaatacga	tttagaaagg	1980
gcgcaagagg	cggtgaatgc	tctgtttact	aatacgaatc	caagaagatt	gaaaacagat	2040

ES 2 647 595 T3

```

gtgacagatt atcatattga tcaagtatcc aatttagtgg cgtgtttatc ggatgaattc 2100
tgcttagatg aaaagagaga attacttgag aaagtgaaat atgcgaaacg actcagtgat 2160
gaaagaaact tactccaaga tccaaacttc acatccatca ataagcaacc agacttcata 2220
tctactaatg agcaatcgaa ttccacatct atccatgaac aatctgaaca tggatggtgg 2280
ggaagtgaga acattacaat ccaggaagga aatgacgtat ttaaagagaa ttacgtcaca 2340
ctaccaggta cttataatga gtgttatccg acgtatztat atcaaaaaat aggagagtgc 2400
gaattaaaag cttatactcg ctaccaatta agaggttata ttgaagatag tcaagattta 2460
gagatatatt tgattcgtta taatgcgaaa catgaaacat tggatggtcc aggtaccgag 2520
tccgtatggc cgctttcagt tgaaagccca atcagaaggt gcggagaacc gaatcgatgc 2580
gcaccacatt ttgaatggaa tcctgatcta gattgttcct gcagagatgg agaaaaatgt 2640
gcgcatcatt cccatcattt ctctttggat attgatggtg gatgcataga cttgcatgag 2700
aacctaggcg tgtgggtggt attcaagatt aagacgcagg aaggatcatgc aagactaggg 2760
aacctggaat ttattgaaga gaaaccatta ttaggagaag cactgtctcg tgtgaagaga 2820
gcagagaaaa aatggagaga caaacgtgaa aaactacaat tggaaacaaa acgagtatat 2880
acagaggcaa aagaagctgt ggatgcttta tttgtagatt ctcaatatga tagattaca 2940
gcggatacaa acattggcat gattcatgcg gcagataaac ttgttcatcg aattcgagag 3000
gcgtatcttt cagaattatc tgttatocca ggtgtaaattg cggaaatttt tgaagaatta 3060
gaaggtcgca ttatcactgc aatctcccta tacgatgcga gaaatgtcgt taaaaatggt 3120
gattttaata atggattagc atgctggaat gtaaaagggc atgtagatgt acaacagagc 3180
catcaccggt ctgtccttgt tatcccagaa tgggaagcag aagtgtcaca agcagttcgc 3240
gtctgtccgg ggcgtggcta tatectccgt gtcacagcgt acaaagaggg atatggagag 3300
ggttgtgtaa cgatccatga aatcgagaac aatacagacg aactaaaatt taaaaactgt 3360
gaagaagagg aagtgtatcc aacggataca ggaacgtgta atgattatac tgcacaccaa 3420
ggtacagcag catgtaattc ccgtaatgct ggatatgagg atgcatatga agttgatact 3480
acagcatctg ttaattacaa accgacttat gaagaagaaa cgtatacaga tgtacgaaga 3540
gataatcatt gtgaatatga cagaggggat gtgaattatc caccactacc agctggttat 3600
gtgacaaaag aattagaata tttcccagaa accgataagg tatggattga gattggagaa 3660
acggaaggaa cattcatcgt ggacagcata gaattactcc tcatggaaga a 3711

```

- <210> 3
- <211> 2157
- <212> ADN
- <213> *Bacillus thuringiensis*
- <400> 3

5

atgaaactaa	agaatcaaga	taagcatcaa	agtttttcta	gcaatgcgaa	agtagataaa	60
atctctacgg	attcactaaa	aatgaaaaca	gatatagaat	tacaaaaacat	taatcatgaa	120
gattgtttga	aatgtctga	gtatgaaaat	gtagagccgt	ttgttagtgt	atcaacaatt	180
caaacgggta	ttggtattgc	tggtaaaatc	cttggttaacc	taggcgttcc	ctttgctggg	240
caagtagcta	gcctctatag	ttttatoccta	ggtagccttt	ggoccaaagg	gaaaagccaa	300
tgggaaatft	ttatggaaca	tgtagaagag	cttattaatc	aaaaaatatc	gacttacgca	360
agaaacaaag	cacttgcgaga	tttaaaagga	ttaggagatg	ctttggctgt	ctacctgaa	420
tcgctggaaa	gttggattaa	aaatcgcaat	aacacaagaa	ctagaagtgt	tgtcaagagc	480
caatacatta	ccttggaact	tatgttcgta	caatcattac	cttcttttgc	agtgtctgga	540
gaggaagtac	cactattacc	aatatatgct	caagctgcaa	atctacactt	gttgctatta	600
agagatgcgt	ctatfttttg	aaaagaatgg	ggattatcag	actcagaaat	ttcgacattc	660
tataatcgtc	aagtggaaag	aacatcagat	tattccgatc	attgcacgaa	attggttcat	720
acgggcttga	atagattaaa	gggctcaaat	gctgaaatct	gggtaaagta	taatcaattc	780
cgtagagaca	tgactttaat	ggtagtagat	ttagtggcac	tattocaaag	ctatgatata	840
catatgtacc	caattaaaac	tacagcccaa	cttagtagag	aagtatatac	aaacgcaatt	900
gggacagtac	atccgcaccc	aagtftttgca	agtacgactt	ggtataataa	taatgcacct	960
tcgtftttctg	ccatagaggc	tgccgttatc	cgaagcccg	acctactcga	ttttctagaa	1020
caagttacaa	tttacagctt	attaagtcca	tggagtaaca	ctcagtatat	gaatatgtgg	1080
ggaggacata	aactagaatt	ccgaacaata	ggaggaaact	taaataacct	aacacaagga	1140
tctactaata	cttctattaa	tctctgaaca	ttaccgttca	cgctctcgaga	catctatagg	1200
actgaatcat	tggcagggct	gaatctatft	ttaactcaac	ctgttaatgg	agtacctagg	1260
gttgatfttct	attggaaatt	cgctcacacat	ccgatcgcat	ctgataatft	ctattatcca	1320
gggtatgctg	gaattgggac	gcaattacag	gattcagaaa	atgaattacc	acctgaaaca	1380
acaggacagc	caaattatga	atcttatagt	catagattat	ctcatatagg	actcatttca	1440
gcatcacatg	tgaagcatt	ggtatattct	tggacgcac	gtagtgcaga	tcgtacgaa	1500
acaattcatt	cagatagtat	aacacaaata	ccactggtaa	aagcacatac	cottcagtca	1560
ggtactactg	ttgtaaaagg	gccagggftt	acaggtggag	atatacctcc	acgaactagt	1620
ggaggacct	ttgctftttag	taatgttaat	ttagactgga	acttgtcaca	aagatatcgt	1680
gctagaatac	gotatgcttct	taactactaat	ctaagaatgt	acgtaacgat	tgcaggggaa	1740
cgaatftttg	ctggctcaatt	taataaaaaca	atgaatactg	gtgatccatt	aacattccaa	1800
tctftttagtt	acgcaactat	tgatacagca	tttaccattcc	caacgaaagc	gagcagcttg	1860
actgtaggtg	ctgatactft	tagctcaggt	aatgaagftt	atgtagatag	atfttgaattg	1920
atcccagfta	ctgcaacact	tgaggcagta	actgatttag	aaagagcgca	gaaggcggft	1980
catgaactgt	ttacatctac	gaatccggga	ggattaaaaa	cggatgtaaa	ggattatcat	2040
attgaccagg	tatcaaattt	agtagagtct	ctatcagatg	aattctatct	tgatgaaaag	2100
agagaattat	tcgagatagt	taaatacgcg	aagcaactcc	atattgagcc	taacatg	2157

<210> 4
 <211> 1998
 <212> ADN
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 4

```

gtggttgtga ataagtattt tcttaaaaaac attcgttatt atcaggctaa tttagtatct 60
ttaatttttaa tatataacct aatatttaag gaggaatttt atatgaatag tgtattgaat 120
agcggaaagag ctactaatgg tgatgcgtat aatgtagtgg ctcatgatcc atttagtttt 180
caacataaat cattagatac catacaagaa gaatggatgg agtggaaaaa agataatcat 240
agtttatatg tagatcctat tgttggaaact gtggctagct ttcttttaa gaaagtgggg 300
agtcttgttg gaaaaagaat attaagtgag ttacggaatt taatatttcc tagtggcagt 360
acaaatctaa tgcaagatat ttttaagagag acagaaaaat tcctgaatca aagacttaat 420
acagacactc ttgcccggtg aaatgcggaa ttgacagggc tgcaagcaaa tgtagaagag 480
tttaatcgac aagtagataa ttttttgaac cctaaccgaa atgctgttcc tttatcaata 540
acttcttcag ttaatacaat gcagcaatta tttctaaata gattaccca gtttcagatg 600
caaggatacc aattgttatt attaccttta tttgcacagg cagccaattt acatctttct 660
tttattagag atgttattct taatgcagat gaatggggaa tttcagcagc aacattacgt 720
acgtatcaaa atcacctgag aaattataca agagagtact ctaattattg tataactacg 780
tatcaaactg cgttttagagg tttaaacacc cgtttacagc atatgtaga cgttgtttaa atatcaaagc 900
tataatgttt taaatgtatt tgaatatgta tctatctggt cgttgtttaa atatacaaagc 900
cttctagtat cttctggtgc taatttatat gcaagtggta gtggaccaca gcagacccaa 960
tcatttactt cacaagactg gccattttta tattctcttt tccaagttaa ttcaaattat 1020
gtgttaaagt gcttttagtgg cgctagaactt acgcagactt tcctaatat tgttggttta 1080
cctggtacta ctacaactca cgcattgctt gctgcaaggg tcaattacag tggaggagtt 1140
tcgtctggtg atatagggcg tgtgtttaat caaaatttta gttgtagtac atttctcca 1200
cctttgttaa caccatttgt tagaagtgg ctagattcag gttcagatcg gggggggatt 1260
aataccgtta ccaattggca aacagaatcc tttgagacaa ctttaggttt aaggagtgg 1320
gcttttacag ctcgaggtaa ttcaaactat ttcccagatt attttatccg taatatttct 1380
ggagttcctt tagttgtag aaatgaagat ttaagaagac cgttacacta taatcaaata 1440
agaaatatag aaagtccttc aggaacacct ggtggattac gagcttata ggtatctgtg 1500
cataacagaa aaaataatat ctatgccgtt cagatacatg gtactatgat tcactatcg 1560
ccggaagatt atacaggatt tactatatcg ccgatacatg caactcaagt gaataatcaa 1620
acgcgaacat ttatttctga aaaatttggg aatcaaggtg attccttaag atttgaacaa 1680
agcaacacga cagctcgtta tacccttaga gggaaatggaa atagttacaa tctttattta 1740
agagtatctt caataggaaa ttccactatt cgagttacta taaacggtag agtttatact 1800
gcttcaaagt ttaatactac tacaataaac gatggagtta atgataatgg agctcgtttt 1860
tcagatatta atatcggtaa tgtagtagca agtgataata ctaatgtacc gttagatata 1920
aatgtgacat taaattcggg tactcaattt gagctgatga atattatggt tgttccaact 1980
aatagctcac cactttat

```

<210> 5
 <211> 3531
 <212> ADN
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

10

```

atggataaca atccgaacat caatgaatgc attccttata attgtttaag taaccctgaa 60
gtagaagtat taggtggaga aagaatagaa actggttaca cccaatcga tatttctctg 120
tcgctaacgc aatttctttt gagtgaattt gttcccggtg ctggatttgt gttaggacta 180
gttgatataa tatggggaat ttttgggtccc tctcaatggg acgcatttct tgtacaaatt 240
gaacagttaa ttaaccaaag aatagaagaa ttcgctagga accaagccat ttctagatta 300
gaaggactaa gcaatcttta tcaaatttac gcagaatctt ttagagcgtg ggaagcagat 360
cctactaatc cagcattaag agtagagatg cgtattcaat tcaatgacat gaacagtgcc 420

```

```

cttacaaccg ctattcctct ttttgagtt caaaattatc aagttcctct tttatcagta 480
tatgttcaag ctgcaaattt acatttatca gttttgagag atgtttcagt gtttggacaa 540
aggtggggat ttgatgccac gactatcaat agtcggtata atgatttaac taggcttatt 600
ggcaactata cagattatgc tgtacgctgg tacaatacgg gattagagcg tgtatgggga 660
ccggattcta gagattggat aagatataat caatttagaa gagaattaac actaactgta 720
ttagatatcg tttctctatt tccgaactat gatagtagaa cgtatccaat tcgaacagtt 780
tccaattaa caagagaaat ttatacaaac ccagttatag aagattttaa tggtagtttt 840
cgaggctcgg ctcagggcac agaacaaagt attaggagtc cgcatttgat ggatatactt 900
aatagtataa ccatctatac ggatgctcat aggggttatt attattggtc agggcatcaa 960
ataatggctt ctctgtcgg ttttcgggg ccagaattca cgtttccgct atatggaacc 1020
atgggaaatg cagctccaca acaacgtatt gttgctcaac taggtcaggg cgtgtataga 1080
acattatcct ctacttttta tagaagtcct ttaatatag ggataaataa tcaacaacta 1140
tctgttcttg acgggacaga atttgcttat ggaacctcct caaatttggc atccgctgta 1200
tacagaaaaa gcggaacggt agattcgctg gatgaaatac caccacagaa taacaacggtg 1260
ccacctagge aaggatttag tcatcgatta agccatgttt caatgtttcg ttcaggattt 1320
agtaatagta gtgtaagtat aataagagct cctatgttct cttggataca tcgtagtgct 1380
gaatttaata atataattcc ttcatcacia attacacaaa tacotttaac aaaatctact 1440
aatcttggct ctggaacttc tgtcgttaaa ggaccaggat ttacaggagg agatattctt 1500
cgaagaactt cacctggcca gatttcaacc ttaagagtaa atattactgc accattatca 1560
caaagatadc gcgtaagaat tcgttacgct tctactaaa atttacaatt ccatacatca 1620
attgacggaa gacctattaa tcaggggaat ttttcagcaa ctatgagtag tgggagtaat 1680
ttacagtcgg gaagctttag gactgcaggt tttactactc cgtttaactt ttcaaatgga 1740
tcaagtgtat ttacgttaag tgctcatgct tccaattcag gcaatgaagt ttatatagat 1800
cgaattgaat ttgttcgggc agaagtaacc tttgaggcag aatatgattt agaaagagca 1860
cagaagcggg tgaatgcgct gtttacttct tccaatcaa tcgggttaa tccagatgtg 1920
acggattatc atattgatca agtatccaat ttagttgagt gtttatcaga tgaattttgt 1980
ctggatgaaa aacaagaatt gtccgagaaa gtcaaacatg cgaagcgact tagtgatgag 2040
cggaaattac ttcaagatcc aaacttcaga gggatcaata gacaactaga ccgtggctgg 2100
agaggaagta cggatattac catccaagga ggcgatgacg tattcaaaga gaattacggt 2160
acactaccag gtacctttga tgagtgctat ccaacgtatt tatatcaaaa aatagatgag 2220
tcgaaattaa aagcctatac ccgttatcaa ttaagagggt atatcgagga tagtcaagac 2280
ttagaaatct atttaattcg ctacaatgca aaacatgaaa cagtaaatgt gccaggtagc 2340
ggttccttat ggccgctttc agcccaaagt ccaatcggaa agtgtggaga gccgaatcga 2400
tgccgcgccac accttgaatg gaatcctgac ttagattggt cgtgtagggg tggagaaatg 2460
tgtgcccatc attcgcacca tttctcctta gacattgatg ttggatgtac agacttaaat 2520
gaggacctag gtgtatgggt gatctttaag attaagacgc aagatgggca cgcaagacta 2580
gggaatctag agtttctcga agagaaacca ttagtaggag aagcgctagc tcgtgtgaaa 2640
agagcggaga aaaaatggag agacaaacgt gaaaaattgg aatgggaaac aaatatcgtt 2700
tataaagagg caaaagaatc tgtagatgct ttatttghta actctcaata tgatcaatta 2760
caagcggata cgaatattgc catgattcat gcggcagata aacgtgttca tagcattcga 2820
gaagcttatc tgccctgagct gtctgtgatt ccgggtgtca atgcggctat ttttgaagaa 2880
ttagaagggc gtattttcac tgcattctcc ctatatgatg cgagaaatgt cattaanaat 2940
ggtgatttta ataatggctt atcctgctgg aacgtgaaag ggcagtaga tgtagaagaa 3000
caaaacaacc accgttcggt ccttgttgtt ccggaatggg aagcagaagt gtcacaagaa 3060
gttcgtgtct gtccgggtcg tggctatate cttcgtgtca cagcgtacaa ggagggatat 3120
ggagaaggtt gcgtaaccat tcatgagatc gagaacaata cagacgaact gaagtttagc 3180
aactgcgtag aagaggaat ctatccaaac aacacggtaa cgtgtaatga ttatactgta 3240
aatcaagaag aatacggagg tcggtacact tctcgtaatc gaggatataa cgaagctcct 3300
tccgtaccag ctgattatgc atcagctat gaagaaaaat cgtatacaga tggacgaaga 3360
gagaatcctt gtgaatttaa cagagggtat agggattaca cgccactacc agttggttat 3420
gtgacaaaag aattagaata ctcccagaa accgataagg tatggattga gattggagaa 3480
acggaaggaa catttatcgt ggacagcgtg gaattactcc ttatggagga a 3531

```

<210> 6
 <211> 1986
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI221z (axmi221zv02.02)

10

<400> 6

atgaaccaga acaagcatgg catcattgga gcaagcaact gtggatgcac cagcgacaat 60

gttgcaaaat atcctctggc caacaatcct tattcttctg ctctcaacct caacagctgc 120
 cagaacagca gcatcctcaa ctggatcaac atcattggtg atgctgccaa ggaagctgtc 180
 tccatcgga ccaccatcgt cagcttgatc accgggccat cattgacagg cctcatctcc 240
 atcgtctatg atctcatcgg caaggtgctg ggaggaagca gcgccaaag catctccgac 300
 ctctccatct gcgacctcct ctccatcctc gacctccgcg tcaaccagag cgtgctgaat 360
 gatggcattg ctgatttcaa tggatcagtg ctgctgtaca ggaactacct ggaggcgtg 420
 gacagctgga acaagaacct aaattctgct tctgctgaag agctgaggac aaggttcaga 480
 attgctgatt cagaatttga caggatcttg acaagaggca gcttgacaaa tggaggaagc 540
 ctggcgcggc aaaatgctca gatcctgctg ctgccctcct ttgcttcagc tgccttcttc 600
 cacctgctgc tgcctcgtga tgcaacaaga tatggcacca actggggcct ctacaatgcc 660
 acccccttca tcaactacca gagcaagctg gtggagctga tcgagctcta caccgactac 720
 tgcgtccact ggtacaacag aggcttcaat gagctccgcc aaagaggaac atcagcaaca 780
 gcatggctgg agttccaccg ctacaggagg gagatgacct tgatggtgct ggacatcgtc 840
 gcctccttct cctccttggg catcaccaac taccctattg aaacagattt ccagctcagc 900
 agggatgatc acacagatcc aattggcttc gtccacagaa gcagcttgag aggagaaagc 960
 tggttctcct tcgtcaaccg cgccaacttc tcagatctgg agaatgccat ccccaacca 1020
 aggccaaagct ggttcctcaa caacatgatc atcagcactg gaagcctcac ccttcctgtt 1080
 tctccaaaca ctgaccgctg gcgctctgg tatggaagca gggacaggat ctgcgccgcc 1140
 aacagccaag tgatctcaga gctcatctcc ggccagcaca ccaacagcac acaaaccatc 1200
 cttggaagga acatcttcag aattgacagc caagcctgca acctcaatga caccacctac 1260
 ggcgtcaacc ggcgcgtgtt ctaccatgat gcttcagaag gaagccaaag aagcgtctat 1320
 gaaggcttca tcaggacaac tggcatcgac aaccaagggt tgcaaaacat aaacacctac 1380
 ttccctggag aaaacagcaa catccccacg ccggaggact acaccacct cctctccacc 1440
 accgtcaacc tcaccggcgg cctccgccag gtggccaaca acagaagatc aagcatcgtc 1500
 atctatggat ggaccacaaa gagcttgaca agaaataaca ccatcaacc tggcatcatc 1560
 acccagatcc ccatggtgaa gctctccaac ctgccatcag gaacaaatgt ggtgagagga 1620
 cctggcttca ctggaggaga catcttgagg aggacaaatg ctggaaattt tggagatgtc 1680
 cgcgtcaaca ttgctggaag cctctcccag cgctacaggg tgaggatcag atatgcttca 1740
 acaactaacc tcagttcca cacctccatc aatggccgcg ccatcaacca agcaaaactc 1800
 cccgccacca tgaacattgg agcaagcctc aactacagga ccttcagaac tgttggcttc 1860
 accacccctc tcaccttctc agaagcaagc agcatcttca cctctccac ccacagcttc 1920
 tcctctgaa atgctgtcta catcgacagg attgaatttg ttctgctga agtcaccttt 1980
 gaagca 1986

<210> 7

<211> 1965

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI222z (axmi222zv02.02)

10

<400> 7

ES 2 647 595 T3

```

atgaacagca acaggaagaa tgaaaatgag atcattgatg cttccttcat cccgcgcgtc 60
agcaatgaga gcgtcacccat cagcaaggaa tatgctcaaa caaaccagct gcaaaaacaac 120
agcattgaag atggcctctg cattgctgaa ggagaataca tagatccatt tgtttcagca 180
agcaccgtcc aaactggcat cagcattgct ggaagaatcc tcggcgtcct cggcgtcccc 240
ttcgccggcc agctggcatc attctacagc ttcattggtg gagagctctg gcaaaaagga 300
agagatcaat gggagatctt catggagcat gttgagcagc tggtgaggca gcagatcacc 360
gccaatgcaa ggaacaccgc gctggcaagg ctgcaaggcc tcggcgacag cttccgcgcc 420
taccagcaga gcttggagga ctggctggag aacagaaatg atgcaaggac aagatcagtg 480
ctgtacaccc agtacattgc tctggagctg gacttcctca atgccatgcc gctcttogcc 540
atcagggagc aggaggtgcc gctgctgatg gtgtatgctc aagctgcca cctccacctg 600
ctgctgctga gagatgcttc attgtatgga agagaatttg gcctcaccag ccaggagatc 660
caaagatatt atgaaaggca ggtggagagg acaagagatt attcagatca ttgtgttcaa 720
tggtaacaac cggcctcaa caacctcgc ggaccaatg ctgaaagctg ggtgagatc 780
aaccagttaa gaagagatct cacctcggc gtgctggatc tggtggcgtc cttoccaaagc 840
tatgacacaa ggacatatcc catcaacacc tcagctcagc tgacaaggga ggtgtacaca 900
gatgocattg gagccacogg cgtcaacatg gcatcaatga actggtacaa caacaatgct 960
ccttccttct cggccattga aactgctgtc atcagatctc ctcatctgct ggacttcctg 1020
gagcagctga agatcttctc cgcctcctca agatggagca acacaaggca catgacatat 1080
tggagaggcc acaccatcca gagcaggccc atccgcggcg cgctcatcac ctccacccat 1140
ggtaacacca acacctccat caaccccgct accttccagt tccttcaag agatgtctac 1200

```

```

aggacagaaa gctatgctgg agtgctgctc tggggcatct acctagagcc catocatgga 1260
gttccacogc tccgcttcaa cttcagaaat cctcaaaaca cctttgaaag aggaacagca 1320
aactacagcc agccatatga atctcctggc ctccagctga aggattcaga aacagagctg 1380
ccgcgggaga caacagaaag gccaaactat gaaagctaca gccaccgcct cagocacatc 1440
ggcatcatcc tccaaacaag gctgaatggt cctgtctaca gctggacca cgcctctgct 1500
gacaggacca acaccatcgg cccaacagg atcaccaga tccccgcgt caagggcaac 1560
ctcctcttca atggcagcgt catctcagga cctggcttca ctggaggaga tctggtgagg 1620
ctcaacaaca gcggcaaca catccagaac agaggctatc ttgaggtgcc catccagttc 1680
acctccacca gcacaagata ccgcgtccgc gtcagatatg cttcagtgac gccatccac 1740
ctctccgtca actggggcaa cagcaacatc ttctcctcca ccgtgccggc caccgcgcc 1800
tccttgaca accttcaaag cagagatttt ggatattttg aaagcaccia tgcttccacc 1860
tccgtcactg gaaatgtggt ggcgtcagg aacttctcag aaaatgcaag ggtgatcatc 1920
gacagatttg agttcatccc cgtcacggcc accttgaag ctgaa 1965

```

<210> 8
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI223z (axmi223zv03.02)

<400> 8

5

10

```

atgtcagaat atgaaaatgt ggagccattt gtttctgtct ccaccatcca aactggcattc 60
ggcattgctg gcaagatcct cggcaacctc ggcgtcccct tcgccggcca ggtggcctcc 120
ctctacagct tcatectagg agagctctgg ccaaaaggaa aaagccaatg ggagatcttc 180
atggagcatg ttgaggagct catcaaccag aagatctcaa catatgcaag gaacaaggcg 240
ctggcagatc tgaagggcct tggagatgct ctgccctct accatgagag cttggagagc 300
tggatcaaga acaggaacaa cacaaggaca aggagcgtgg tgaagagcca gtacatcacc 360
ttggagctga tgtttgttca gagcttgccc tccttcgccg tgtcaggaga agaagttcct 420
ctgctgcccc tctatgctca agctgctaac ctccacctgc tgctgctgag agatgcttcc 480
atcttcggca agaatgggg cctctcagat tcagagatct ccaccttcta caacaggcag 540
gtggagagga catcagatta ttcagatcat tgcaccaaat ggttcgacac cggcctcaac 600
aggctgaagg gcagcaatgc tgagatctgg gtgaagtaca accagttcag aagggaatcg 660
accttgatgg tgctggatct ggtggcgtc ttccaatcat atgacacca catgtaccc 720
atcaagacaa cagctcagct gacaaggag gtgtacacca atgccatcgg cacgtccat 780
cctcatcctt ccttcgctc caccacctgg tacaacaaca atgctccttc cttctccgcc 840
attgaagctg ctgtcatcag atctcctcat ctgctggact tectggagca ggtcaccatc 900
tacagcctcc tctcaagatg gagcaacacc cagtacatga acatgtgggg aggccacaag 960
ctggagttca gaaccattgg aggaacctc aacacctcca cccaaggaag caccaacacc 1020
tccatcaacc ccgtcaccct ccccttcacc tcacgtgaca tctacaggac agaaagcctc 1080
gccggcctca acctcttct caccagcct gtcaatggag ttccaagggg ggacttccac 1140
tggaagtttg tgacacatcc aattgcttct gacaacttct actaccctgg atatgctggc 1200
atcggcacc ccagctgcaaga ttcagaaaat gagctgccgc cggagacaac agggcagcca 1260
aactatgaaa gctacagcca ccgcctcagc cacatcggcc tcatctcagc aagccatgtg 1320
aaggcgtgg tgtacagctg gaccaccgc tccgcgaca ggaccaacac catcattct 1380
gacagcatca ccagatccc gctggtgaag gctcacacc tccagagcgg caccacctg 1440
gtgaaggggc caggcttcac tggaggagac atcttgagaa gaacatcagg aggcccttc 1500
gccttcagca atgtcaacct tgattggaac ctctccaaa gatacagagc aagaatccgc 1560
tatgcttcca ccaccaactt gaggatgtat gtcaccattg ctggagaaag gatcttggcc 1620
ggccagttca acaagaccat gaacactgga gatcctctca ccttcagag cttctcatat 1680
gccaccattg acaccgctt caccttcccc accaaggcca gcagcctcac cgtcggcgt 1740
gacaccttct cctctggaaa tgaagttat gtggacagat ttgagctcat ccctgtt 1797

```

5 <210> 9
 <211> 1896
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI224z (axmi224zv03.02)
 <400> 9

ES 2 647 595 T3

```

atgaacagcg tctcaactc cggccgcgcc accaatggag atgcctacaa tgtggtggct 60
catgatccct tctcctcca gcacaagagc ttggacacca tccaagaaga atggatggaa 120
tggaagaagg acaaccacag cctctatgtt gatccaattg ttggcaccgt cgcctccttc 180
ctgctgaaga aggtgggcag cttggtggg aagaggatct tgtcagagct gaggaacctc 240
atcttcctct ctggaagcac caacttgatg caagacatcc tcagagaaac agagaagttc 300
ctcaaccagc gcctcaacac cgacaccttg gcgcgctca atgctgagct caccggcctt 360
caagcaaagt tggaggagtt caacaggcag gtggacaact tcctcaaccc aaatagaaat 420
gctgttcctc tctccatcac cagctcagtg aacaccatgc agcagctctt cctcaacagg 480
ctgccgcagt tccagatgca aggctaccag ctgctgctgc tgccgctctt tgctcaagct 540
gccaacctcc acctctcctt catcagagat gtcacctca atgctgatga atggggcatc 600
tccgcgcgcca ccttgaggac atatcaaaac cacctgagga actacacaag agaattttca 660
aactactgca tcaccacctt ccaaacagcc ttcagaggcc tcaacacaag gctgcatgac 720
atgctggagt tcagaacata catgttcctc aatgtttttg aatatgtctc catctggagc 780
ctcttcaagt accagagctt gctggtgagc tctggagcaa acctctatgc ttctggaagc 840
ggccccagca aaaccacagc cttcacctca caagattggc ccttcctcta cagcctcttc 900
caggtgaaca gcaactatgt gctgaatggc ttctctggag caaggctcac ccaaaccctc 960
cctaacatcg tcggccttcc tggcaccacc accaccatg ctctgctggc ggcgcgcgctc 1020
aactactctg gaggagtttc ttctggagac atcggcgcgg tgttcaacca gaacttctca 1080
tgctccacct tcctgcgcgc gctgctgacg cccttcgta gaagctggct ggattctgga 1140
totgatcgag gaggcatcaa cacogtcacc aactggcaaa cagagagctt tgaaacaacc 1200
ttggggctga gaagtggagc cttcacagca agaggaaaaca gcaactactt ccccgactac 1260
ttcatcagga acatctcagg agttcctctg gtggtgagaa atgaagatct ccgcccggccg 1320
ctccactaca accagatcag gaacattgaa tctccatcag gaactcctgg aggcctccgc 1380
gcctacatgg tgagcgtcca caacaggaag aacaacatct atgctgttca tgaaaatggc 1440
accatgatcc atcttgctcc agaagattac accggettca ccatctccc catccatgcc 1500
accaggtga acaaccaaac aaggaccttc atctcagaga agtttgaaa tcaaggagac 1560
agcttgagat ttgagcagag caaccaccag gcgcgctaca cctccgcgg caatggcaac 1620
agctacaacc tctacctccg cgtcagcagc atcggcaaca gcaccatcag ggtgaccatc 1680
aatggccgcg tctacaccgc cagcaatgtc aacaccacca ccaacaatga tggcgtcaat 1740
gacaatggag caaggttctc agacatcaac attggaatg tgggtggctc cgacaacacc 1800
aatgttcctc tggacatcaa tgtcaccctc aacagcggca cccagttcga gctgatgaac 1860
atcatgtttg ttccaacaaa cagctcgccc ctgtac 1896

```

<210> 10
 <211> 1821
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI225z (axmi225zv02.02)

10

<400> 10

ES 2 647 595 T3

```

atggacaaca accccaacat caatgaatgc atcccctaca actgcttgag caaccagag 60
gtggaggtgc tgggaggaga aaggattgaa actggctaca ccccatcga catctcctc 120
tcctcacc agttcctcct ctcaaatgtt gttcctggag ctggcttcgt gctggggctg 180
gtggacatca tctggggcat ctctggccct tctcaatggg atgccttcct cgtccagatc 240
gagcagctga tcaaccagag gattgaagaa tttgcaagga accaggccat ctcaaggctg 300
gaaggcctct ccaacctcta ccagatctat gctgagagct tccgcgcctg ggaagcagat 360
ccaacaaatc ctgctctccg cgtggagatg aggattcagt tcaatgacat gaactcagct 420
ctcaccaccg ccatcctctt ctctgcctgc cagaactacc aggtgcccgt gctctccgtc 480
tatgttcaag ctgccaacct ccacctctcc gtgctgagag atgtttcagt ttttggccaa 540
agatggggct ttgatgccac caccatcaac agcagataca atgatctgac aaggctcatc 600
ggcaactaca cagattatgc tgtcagatgg tacaacaccg gcctggagcg cgtctggggg 660
ccagattcaa gagattgat cagatacaac cagttcagaa gggagctcac ctgacgggtg 720
ctggacatcg tcagcctctt cccaactat gattcaagga catatcccat caggaccgtc 780
agccagctga caaggagat ctacaccaac cccgtgctgg aggacttcaa tggcagcttc 840
agaggatcag ctcaaggcat cgagcagagc atcagatctc ctcatctgat ggacatcctc 900
aacagcatca ccatctacac tgatgctcac cgcggtact actactggag cggccaccag 960
atcatggctt ctctgttggt cttctcagga cctgagttca ccttccctct ctatggcacc 1020
atgggcaacg ccgcgcgcga gcagaggatc gtcgcccagc tgggccaagg cgtctacagg 1080
accttgagca gcaccttcta cagaagcccc ttcaacatcg gcatcaacaa ccagcagctc 1140
tcctgtctgg atggaactga atttgcatat ggaacaagca gcaaccttcc ttcagctgtc 1200
tacaggaaga gcggcaccgt ggacagcttg gatgagatcc cgccgcagaa caacaatgtg 1260

ccgcgcgcgc aaggcttcag ccaccgcctc agccatgtga gcatgttcag aagcggcttc 1320
agcaacagca gcgtcagcat catccgcgcg ccgatgttca gctggattca ccgctctgct 1380
gagttcaaca acatcatccc ttcttcacag atcaccaga tccccctcac caagagcacc 1440
aacctcggca gcggcaacctc cgtggtgaag gggccagget tcactggagg tgacatcttg 1500
aggaggacat ctctggcca gatctccacc ctccgcgtca acatcaccgc gccgctctct 1560
caaagataca gggtgaggat cagatatgct tcaacaacaa acctccagtt ccacaccagc 1620
attgatggcc gccccatcaa tcaaggaaac ttctccgcca ccatgagctc aggaagcaac 1680
ctccagagcg gcagcttcag aactgctggc ttcaccacc ccttcaactt cagcaatgga 1740
agctccgtgt tcaccctctc tgctcatggt ttcaacagcg gcaatgaggt gtacatcgac 1800
aggattgaat ttgttccagc a

```

<210> 11

<211> 1986

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI221z (axmi221zv02.03)

10

<400> 11

ES 2 647 595 T3

```

atgaatcaaa acaaacatgg aatcattgga gtttcaaatt gtggatgcac ttcagacaat 60
gttgcaaaat atcctcttgc aaacaatcca tattcttctg ctttgaatct caattcttgt 120
caaaattctt caattttgaa ttggatcaac atcattgggtg atgctgcaaa agaagctgtt 180
tcaattggaa caacaattgt ttctttgatc actgctcctt ctttgactgg attgatttca 240
attgtttatg atttgattgg aaaagtctt ggaggaagt ctggacaaag catttctgat 300
ctttcaattt gtgatcttct ttcaatcatt gatttgagag tgaatcaaag tgttttgaat 360
gatggaattg ctgatttcaa tggaggtgt cttctttaca gaaattattt ggaagcattg 420
gattcttggg acaagaatcc aaattctgct tctgctgaag aattgagaac aagattcaga 480
attgctgatt cagaatttga cagaattttg acaagaggaa gtttgacaaa tggaggaagt 540
ttggcaagac aaaatgctca aattcttctt ctctcttctt ttgcttctgc tgccttcttt 600
catttgttgt tgttgagaga tgcaacaaga tatggaacaa attggggatt gtacaatgca 660
acaccattca tcaattatca atcaaaattg gtggaattga ttgaacttta cactgattat 720
tgtgttcatt ggtacaacag aggttcaat gaattgagac aaagaggaa ttctgcaact 780
gcttggttgg aatttcacag atacagaaga gaaatgacat tgatggtttt ggatattgtt 840
gcttctttt cttctttgga catcacaat tatccaattg aaacagattt tcaactttca 900
agagtgattt aactgatcc aattggattt gttcacagaa gttctttgag aggagaaagt 960
tggttttctt ttgtcaacag agcaaatttt tcagatttgg aaaatgcaat tccaatcca 1020
agaccttctt ggtttctcaa caacatgatc atttcaactg gaagtttgac acttctgtt 1080
tctccaaaca ctgacagagc aagagtttgg tatggaagca gagacagaat ttctccagca 1140
aattctcaag tgatttcaga attgatttct ggacaacaca caaattcaac tcaaacaatt 1200
cttgaagaa acattttcag aattgattct caagcatgca atttgaatga tacaacatat 1260
ggagtgaaca gagctgtttt ttatcatgat gttcagaag gaagccaaag aagtgtttat 1320
gaaggattca tcagaacaac tggattgac aatccaagag ttcaaaacat caacacatat 1380
tttcttggag aaaattcaaa cattccaaca ccagaagatt acactcatct tctttcaaca 1440
actgttaatt tgactggagg attgagacaa gttgcaaca acagaagaag ttcaattgtg 1500
atztatggat ggacacacaa aagtttgaca agaaacaaca caatcaatcc tggaatcatc 1560
actcaaatc caatggtgaa actttcaaat ctctcttctg gaacaaatgt tgttagagga 1620
cctggattca ctggtggaga tattttgaga agaacaatg ctggaaattt tggagatgtg 1680
agagtgaaca ttgctggttc tctttctcaa agatacagag tgagaatcag atatgcttca 1740
acaacaatc ttcaatttca cacttcaatt aatggaagag caatcaatca agcaaatttt 1800
cctgcaacaa tgaacattgg agcttctttg aattacagaa ctttcagaac tgttggattc 1860
acaacacat tcacattttc agaagcaagt tcaattttca ctctttcaac tcattctttt 1920
tcttctggaa atgctgttta cattgacaga attgaaattg ttctctgctga agtgacattt 1980
gaagca

```

<210> 12

<211> 1965

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI222z (axmi222zv02.03)

<400> 12

ES 2 647 595 T3

```

atgaactcaa acagaaagaa tgaaaatgaa atcattgatg cttctttcat tcctgctggt 60
tcaaatgaaa gtgtgacaat ttcaaaagaa tatgctcaaa caaatcaact tcaaaacaat 120
tcaattgaag atggattgtg cattgctgaa ggagaatata ttgatccatt tgtttctgct 180
tcaacagttc aaactggaat aagcattgct ggaaggattc ttggagttct tggagttcca 240
tttgctggac aacttgcttc attttattct ttcattggtg gagaattgtg gccaaaagga 300
agagatcaat gggaaatfff catggaacat gttgaacaat tggtgagaca acaaatcact 360
gcaaatgcaa gaaacactgc tttggcaaga ttgcaaggat tgggagattc attcagagct 420
tatcaacaaa gtttggaaga ttggttgga aacagaaatg atgcaagaac aagaagtgtt 480
ctttacactc aatatattgc tttggaattg gattttottga atgcaatgoc attatattgca 540
atcagagaac aagaagttcc tttggtgatg gtttatgctc aagctgcaaa tottcatott 600
cttcttttga gagatgcttc tctttatgga agagaatttg gacttacttc acaagaaatt 660
caaagatatt atgaaagaca agttgaaaga acaagagatt attctgatca ttgtgttcaa 720
tggtaacaaca ctggattgaa caatttgaga ggaacaaatg ctgaaagttg ggtgagatac 780
aatcaattca gaagagattt gacacttgga gttttggatt tgggttgcctt gtttctctca 840
tatgatacaa gaacatatcc aatcaacact tctgctcaat tgacaagaga agtttacact 900
gatgcaattg gagcaactgg agtgaacatg gcttcaatga attggtacaa caacaatgct 960
ccttcttttt ctgcaattga aactgctgtg atcagatctc ctcatattgtt ggatttcttg 1020
gaacaattga agattttttc tgcttcttca agatggagca acacaagaca tatgacatat 1080
tggagaggac acacaattca atcaagacca attagaggag ctttgatcac ttcaactcat 1140
ggaaacacaa acacttcaat caatccagtg acatttcaat ttcttcaag agatgtttac 1200
agaacagaaa gttatgctgg agttcttctt tggggaattt atttggaacc aattcatgga 1260
gttccaacag tgagattcaa tttcagaaat cctcaaaaca cttttgaaag aggaactgca 1320
aattattctc aaccatatga atctctgga ttgcaattga aagattcaga aacagaactt 1380
cctccagaaa caacagaaag accaaattat gaaagctatt ctcacaggct ttctcacatt 1440
ggaatcattc ttcaacaag attgaatgtt cctgtttatt catggacaca cagaagtgtt 1500
gacagaacaa acacaattgg accaaacaga atcactcaaa ttctgctgtt gaaaggaaat 1560
cttctcttca atggaagtgt gatttctgga cctggattca ctggtggaga tttggtgaga 1620
ttgaacaatt ctggaacaa cattcaaac agaggatatt tggaagttcc aattcaattc 1680
acttcaactt caacaagata tagagtgaga gtgagatag cttctgtgac accaattcat 1740
ctttctgtga attgggaaa ttcaaacatt ttttcttcaa cagttcctgc aactgctgct 1800
tctttggaca atcttcaatc aagagatttt ggatattttg aatcaacaaa tgctttcact 1860
tctgtcactg gaaatgttgt tggagtgaga aatttttcag aaaatgcaag agtgatcatt 1920
gacagatttg aatttattcc agtgacagca acatttgaag cagaa 1965

```

<210> 13
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI223z (axmi223zv03.03)

10

<400> 13

ES 2 647 595 T3

```

atgtcagaat atgaaaatgt tgaaccattt gtttctggtt caacaattca aactggaatt 60
ggaattgctg gaaaaattct tggaaatcct ggagttccat ttgctggaca agttgcttct 120
ctttattcctt tcattcttgg agaattgtgg ccaaaaggaa aatctcaatg ggaaattttc 180
atggaacatg ttgaagaatt gatcaatcaa aagatttcaa catatgcaag aaacaaagct 240
cttgctgatt tgaaggatt gggagatgct cttgctggtt atcatgaaag tttggaaagt 300
tggatcaaga acagaaacaa cacaagaaca agaagtgttg tgaaaagcca atacatcact 360
ttggaattga tgtttgttca atctcttctc tcatttctctg tttctggaga agaagttcct 420
cttcttccaa tttatgctca agctgcaaat cttcatcttc ttcttctcag agatgcttca 480
atTTTTGGAA aagaatgggg attgagtgat tcagaaattt caacatttta caacagacaa 540
gttgaaagaa cttcagatta ttctgatcat tgcacaaaat ggtttgatagc tggattgaac 600
agattgaaag gaagcaatgc tgaattttgg gtgaaataca atcaattcag aagagatatg 660
acattgatgg ttttggattt ggttgctttg tttcaatcat atgatactca catgtatcca 720
atcaaaacaa ctgctcaatt gacaagagaa gtttacacaa atgcaattgg aactgttcat 780
cctcatcctt cttttgcttc aacaacttgg tacaacaaca atgctccttc ttttctgca 840
attgaagctg ctgtgatcag atctcctcat ttgttggatt tcttggaaaca agtgacaatt 900
tattctcttc tttcaagatg gagcaacact caatatatga acatgtgggg aggacacaaa 960
cttgagttca gaacaattgg aggaacattg aacacttcaa ctcaaggatc aacaaacact 1020
tcaatcaatc cagtgcatt gccattcact tcaagagata tttacagaac agaatctctt 1080
gctggattga atttgtttt gacacaacca gtgaatggag ttccaagagt tgattttcat 1140

```

```

tggaaatttg tcactcatcc aattgcttca gacaattttt attatcctgg atatgctgga 1200
attggaactc aacttcaaga ttcagaaaat gaattgccac cagaaacaac tggacaacca 1260
aattatgaaa gctattctca caggctttct cacattggat tgatttctgc ttctcatgtc 1320
aaagcattgg tttattcttg gacacacaga agtgctgaca gaacaaacac aattcattca 1380
gattcaatca ctcaaattcc tttggtgaaa gctcacactc ttcaaagtgg aacaactggt 1440
gtgaaaggac ctggattcac tgggtggagat attttgagaa gaacaagtgg aggaccattt 1500
gctttttcaa atgtgaattt ggattggaat ctttctcaaa gatatagagc aagaatcaga 1560
tatgcttcaa caacaaattt gagaatgtat gtgacaattg ctggagaaag aatttttgct 1620
ggacaattca acaaaacaat gaacactgga gatccattga catttcaaag tttttcatat 1680
gcaacaattg atactgctt cacttttcca acaaaggctt cttctttgac tgttggagct 1740
gatacatttt cttctggaaa tgaagtttat gttgacagat ttgaattgat tccagtt 1797

```

<210> 14

<211> 1896

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI224z (axmi224zv03.03)

10 <400> 14

ES 2 647 595 T3

```

atgaactctg ttttgaacag tgggaagagca acaaatggag atgcttaca tgttggtgct 60
catgatccat tttcttttca acacaaaagt ttggatacaa ttcaagaaga atggatggaa 120
tggagaagaa acaatcattc tctttatggt gatccaattg ttggaactgt tgcttctttt 180
cttctcaaga aagttggaag tttggttgga aaaaggattc tttcagaatt gagaaatttg 240
atttttcctt ctggttcaac aaatttgatg caagatattt tgagagaaac agaaaaattt 300
ttgaatcaaa gattgaacac tgatactttg gcaagagtga atgctgaatt gactggattg 360
caagcaaatg ttgaagagtt caacagacaa gttgacaatt tcttgaatcc aaacagaaat 420
gctgttcctc tttcaatcac ttcttctgtg aacacaatgc aacaattggt tctcaacaga 480
ttgcctcaat ttcaaatgca aggatatcaa cttcttcttc ttctttggtt tgctcaagct 540
gcaaatcttc atctttcttt catcagagat gtgattttga atgctgatga atggggaatt 600
tctgctgcaa cattgagaac atatcaaaat catttgagaa attacacaag agaattattca 660
aattattgca tcacaacata tcaaactgct ttccagaggat tgaacacaag attgcatgat 720
atggtggagt tcagaacata tatgtttttg aatgtttttg aatatgtttc aatttggagt 780
ttgttcaaat atcaaagttt gttggtttct tctggagcaa atctttatgc ttctggaagt 840
ggacctcaac aaactcaaag tttcacttct caagattggc catttcttta ttctttggtt 900
caagttaatt caaattatgt tttgaatgga ttttctggag caagattgac acaaacattt 960
ccaaacattg ttggattgcc aggaacaaca acaactcatg ctcttcttgc tgcaagagtt 1020
aattattctg gtggagtttc ttctggagat attggagctg ttttcaatca aaatttttct 1080
tgttcaacat ttcttctctc attgttgaca ccatttgtga gaagttgggt ggattctgga 1140
agtgcagag gaggaatcaa cactgtgaca aattggcaaa cagaaagttt tgaacaact 1200
cttgattgga gaagtggagc tttcactgca agaggaaatt caaattattt tccagattat 1260
ttcatcagaa acatttctgg agttcctttg gtggtgagaa atgaagattt gagaaggcct 1320
cttcattaca atcaaatcag aaacattgaa tcaccaagtg gaactcctgg aggattgaga 1380
gcttacatgg tttctgttca caacagaaag aacaacattt atgctgttca tgaaaatgga 1440
acaatgattc atcttgctcc agaagattac actggattca caatttctcc aattcatgca 1500
actcaagtga acaatcaaac aagaactttc atttcagaaa aatttggaaa tcaaggagat 1560
tctttgagat ttgaacaaag caacacaaca gcaagatata ctttgagagg aaatggaaat 1620
tcttacaatc tttatttgag agtttcttca attggaaatt caacaatcag agtgacaatc 1680
aatggaagag tttacactgc ttcaaagtgc aacacaacaa caaacaatga tggagtgaat 1740
gacaatggag caagattttc tgatatcaac attggaaatg ttgttgcttc agacaacaca 1800
aatgttcctt tggacatcaa tgtgacattg aacagtggaa ctcaatttga attgatgaac 1860
atcatgtttg ttccaacaaa ttcttctctc ctttat 1896

```

<210> 15
 <211> 1821
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI225z (axmi225zv02.03)

10

<400> 15

ES 2 647 595 T3

```

atggacaaca atccaaacat caatgaatgc attccttaca attgtttgtc aaatccagaa 60
gttgaagttc ttggaggaga aagaattgaa actggatata ctccaattga tatttctctt 120
tctttgacac aatttcttct ttcagaattt gttcctgggtg ctggatttgt tcttggattg 180
gttgatatca tttggggaat ttttggacct tctcaatggg atgctttctt ggttcaaatt 240
gaacaattga tcaatcaaag aattgaagaa tttgcaagaa atcaagcaat ttcaagattg 300
gaaggattgt caaatcttta tcaaatttat gctgaaagtt tcagagcttg ggaagctgat 360
ccaacaaatc ctgctttgag agttgaaatg aggattcaat tcaatgatat gaactctgct 420
ttgacaacag caattccttt gtttgctggt caaaattatc aagttcctct tctttcagtt 480
tatgttcaag ctgcaaactc tcatctttct gttttgagag atgtttctgt ttttggacaa 540
agatggggat ttgatgcaac aacaatcaat tcaagatata atgatttgac aagattgatt 600
ggaaattaca ctgattatgc tgtgagatgg tacaacactg gattggaaaag agtttgggga 660
ccagattcaa gagattggat cagatacaat caattcagaa gagaattgac attgacagtt 720
ttggatattg tttctttggt tccaaattat gattcaagaa catatccaat cagaactggt 780
tctcaattga caagagaaat ttacacaaat ccagttttgg aagatttcaa tggaagtttc 840
agaggaagtg ctcaaggaat tgaacaaagc atcagatctc ctcatattgat ggatattctc 900
aattcaatca caatttacac tgatgctcac agaggatatt attattggag tggacatcaa 960
ataatggctt ctctgttgg attttctgga cctgaattta catttctctt ttatggaaca 1020
atgggaaatg ctgctcctca acaaagaatt gttgctcaac ttggacaagg agtttacaga 1080
actctttctt caacatttta cagatctcct ttcaacattg gaatcaacaa tcaacaattg 1140
agtgttcttg atggaacaga atttgcttat ggaacttctt caaatcttcc ttctgctggt 1200
tacagaaaaa gtggaactgt tgattctttg gatgaaattc ctctcaaaa caacaatggt 1260
cctccaagac aaggattttc tcacagattg agccatgttt caatgttcag aagtggattt 1320
tcaaatctt ctgtttcaat catcagagct ccaatgtttt cttggattca cagaagtgct 1380
gagttcaaca acatcattcc ttcttctcaa atcactcaaa ttccattgac aaaatcaaca 1440
aatcttggaa gtggaacttc tgttgtgaaa ggacctggat tcaactggtg tgatattttg 1500
agaagaactt ctctgggaca aatttcaaca ttgagagtga acatcactgc tcctctttct 1560
caaagatata gagtgagaat cagatatgct tcaacaacaa atcttcaatt tcacacttca 1620
attgatggaa ggccaatcaa tcaaggaaat ttttctgcaa caatgagttc tggaagcaat 1680
cttcaaagtg gaagtttcag aactgctgga ttcacaacac cattcaattt ttcaaatgga 1740
agttctgttt tcaactcttc tgctcatggt ttcaattctg gaaatgaagt ttacattgac 1800
agaattgaat ttgttctgct t 1821

```

- <210> 16
- <211> 1986
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI221z (axmi221zv02.04)
- <400> 16

ES 2 647 595 T3

```

atgaatcaaa acaaacatgg aatcattgga gottcaaat gtggatgcac ttcagacaat 60
gttgcaaaat atcctttggc aaacaatcct tattcttctg ctttgaattt gaactcttgc 120
caaaattctt caattttgaa ttggatcaac atcattgggtg atgctgcaaa agaagctgtt 180
tcaattggaa caacaattgt ttctttgatc actgctcctt ctttgactgg tttgatttca 240
attgtttatg atttgattgg aaaagtctt ggaggaagtt ctggacaaag catttcagat 300
ctttcaattt gtgatttgc ttcaatcatt gatttgagag tgaatcaaag tgttttgaat 360
gatggaattg ctgatttcaa tggagtgtt ttgctttaca gaaattattt ggaagcattg 420
gattcttggg acaaaaatcc aaattctgct tctgctgaag aattgagaac aagattcaga 480
attgctgatt cagaatttga cagaattttg acaagaggaa gtttgacaaa tggaggaagt 540
ttggcaaggc aaaatgctca aattcttctt ctctcttctt ttgcttctgc tgctttcttt 600
catttgttgt tgttgagaga tgcaacaaga tatggaacaa attggggatt atacaatgca 660
actcctttca tcaattatca aagcaaattg gtggaattga ttgaaactta cactgattat 720
tgtgttcatt ggtacaacag aggattcaat gaattgaggc aaagaggaac ttcagcaact 780
gcttggttgg aatttcacag atacagaaga gaaatgacat tgatggtttt ggaatttgtt 840
gcttcttttt ctcttttggg tattacaat tatccaattg aaacagattt tcaactttca 900
agagtgtttt acactgatcc aattggattt gttcacagaa gttctttgag aggagaaagc 960
tggttttctt ttgtgaacag agcaaatttt tcagatttgg aaaatgcaat tccaaatcca 1020
agaccaagtt ggtttttgaa caacatgatc atttcaactg gaagtttgac attgctgtt 1080
tctccaaaca ctgacagagc aagagtttgg tatggatcaa gagacagaat ttctccagca 1140
aattctcaag tgatttcaga attgatttct ggacaacata caaattcaac tcaaacaatt 1200
cttggagaa acattttcag aattgattct caagcatgca atttgaatga tacaacttat 1260
ggagtgaaca gagctgtttt ttatcatgat gcttcagaag gaagccaaag aagtgtttat 1320

gaaggattca tcagaacaac tgggaattgac aatccaagag ttcaaaacat caacacttat 1380
ttcctggag aaaattcaaa cattccaact ccagaagatt acactcattt gctttcaaca 1440
actgttaatt tgactggtgg attgagacaa gttgcaaca acagaagaag ttcaattgtg 1500
atztatggat ggacacacaa aagtttgaca agaaacaaca ccatcaatoc tggaatcatc 1560
actcaaattc caatggtgaa actttcaaat ctccaagtg gaacaaatgt tgttagagga 1620
cctggtttca ctggtggaga tattttgaga agaacaatg ctggaaattt tggagatgtg 1680
agagtgaaca ttgctggaag tttgagcaa agatacagag tgagaatcag atatgcttca 1740
acaacaatc tcaatttca tacttcaatt aatggaagag caatcaatca agcaaatttt 1800
ccagcaacaa tgaacattgg agcttctttg aattacagaa ctttcagaac tgttggattt 1860
acaactcctt tcactttttc agaagcaagt tcaattttca ctctttcaac tcattctttt 1920
tcttctggaa atgctgttta cattgacaga attgaatttg ttctgctga agttactttt 1980
gaagct

```

<210> 17
 <211> 1965
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI222z (axmi222zv02.04)

10

<400> 17

ES 2 647 595 T3

```

atgaactcaa acagaaaaaa tgaaaatgaa atcattgatg cttctttcat tcoctgctgtt 60
tcaaatgaaa gtgtttacaat ttcaaaaagaa tatgctcaaa caaatcaact tcaaaaacaat 120
tcaattgaag atggattatg cattgctgaa ggagaatata ttgatccttt tgtttctgct 180
tcaactgttc aaactggaat aagcattgct ggaagaattt tgggagttct tggagttcct 240
tttgcctggac aacttgcttc attttattct ttcattgttg gagaactttg gccaaaagga 300
agagatcaat gggaaatfff catggaacat gttgacaat tggtgaggca acaaatcact 360
gcaaatgcaa gaaacactgc tttggcaaga ttgcaaggat tgggagattc attcagagct 420
tatcaacaaa gtttggaaga ttggttggaa aacagaaatg atgcaagaac aagaagtgtt 480
ctttacactc aatatattgc tttggaattg gattttttga atgcaatgcc attatattgca 540
atcagagaac aagaagttcc tttgttgatg gtttatgctc aagctgcaaa tcttcatttg 600
ttgttgttga gagatgcttc tctttatgga agagaatttg gtcttacttc tcaagaaatt 660
caaagatatt atgaaagaca agttgaaaga acaagagatt attcagatca ttgtgttcaa 720
tggtaacaaca ctggtttgaa caatttgaga ggaacaaatg ctgaaagttg ggtgagatac 780
aatcaattca gaagagattt gacattggga gttttggatt tgggtgcttt gtttccttct 840
tatgatacaa gaacttatcc aatcaacact tcagctcaat tgacaagaga agtttacact 900
gatgcaattg gagcaactgg agtgaacatg gtttcaatga attggtacaa caacaatgct 960
ccttcttttt cagcaattga aactgctgtg atcagatctc ctcaattgtt ggattttttg 1020
gaacaattga agattttttc tgcttcttca agatggagca acacaagaca tatgacatat 1080
tggagaggac atacaattca atcaagacca attagaggag ctttgatcac ttcaactcat 1140
ggaaatacaa acacttcaat caatcctgtt acttttcaat ttcttcaag agatgtttac 1200
agaacagaaa gctatgctgg agttcttctt tggggaattt atttggaacc aattcatgga 1260
gttccaacag tgagattcaa tttcagaaat cctcaaaaaca cttttgaaag aggaactgca 1320
aattattctc aaccatataga atctcctggt ttgcaattga aagattcaga aacagagctt 1380
cctccagaaa caacagaaaag accaaattat gaaagctatt ctcacaggct ttctcatatt 1440
ggaatcattc ttcaacaag attgaatgtt cotgtttatt catggacaca cagaagtgtc 1500
gacagaacaa atacaattgg accaaacaga atcactcaaa ttcoctgctgt gaaaggaaat 1560
ttgcttttca atggaagtgt gatttctggt cctggtttca ctgggtgaga tttggtgaga 1620
ttgaacaatt ctggaacaa cattcaaac agaggatatt tgggaagttcc aattcaattc 1680
acttcaactt caacaagata tagagtgaga gtgagatatg cttctgttac tccaattcat 1740
ctttcagtga attggggaaa ttcaaacatt ttttcttcaa ctgttccagc aactgctgct 1800
tctttggaca atcttcaatc aagagatttt ggatattttg aatcaacaaa tgctttcact 1860
tctgttactg gaaatgttgt tggagtgaga aatttttcag aaaatgcaag agtgcatt 1920
gacagatttg aatttattcc tgttactgca acttttgaag ctgaa 1965

```

<210> 18
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI223z (axmi223zv03.04)

10

<400> 18

ES 2 647 595 T3

```

atgtcagaat atgaaaatgt tgaaccattt gtttctgttt caacaattca aactggaatt 60
ggaattgctg gaaaaattct tggaaatctt ggagttcctt ttgctggaca agttgcttct 120
ctttattctt tcattccttg agaactttgg ccaaaaggaa aaagccaatg ggaaattttc 180
atggaacatg ttgaagaatt gatcaatcaa aagatttcaa cttatgcaag aaacaaagct 240
cttgctgatt tgaaggatt gggagatgct ttggctgttt atcatgaaag tttggaaagt 300
tggatcaaaa acagaaacaa cacaagaaca agaagtgttg tgaaaagcca atacatcact 360
ttggaattga tgtttgttca aagtttgctt tcatttgctg tttctggaga agaagttcct 420
ttgcttccaa tttatgctca agctgcaaat cttcatcttc ttcttctcag agatgcttca 480
atTTTTGGAA aagaatgggg attgagtgat tcagaaattt caacatttta caacagacaa 540
gttgaaagaa cttcagatta ttcagatcat tgcacaaaat ggtttgatac tggtttgaac 600
agattgaaag gaagcaatgc tgaaatttgg gtgaaataca atcaattcag aagagatag 660
acattgatgg ttttggattt ggttgcttta tttcaaagct atgatactca tatgtatcca 720
atcaaaaaca ctgctcaatt gacaagagaa gtttatacaa atgcaattgg aactgttcat 780
cctcatcctt cttttgcttc aacaacatgg tacaacaaca atgctccttc tttttcagca 840
attgaagctg ctgtgatcag atctcctcat ttgttgatt ttttggaaac agttacaatt 900
tattctttgc tttcaagatg gagcaacact caatatatga acatgtgggg aggacacaaa 960
cttgagttca gaacaattgg aggaactttg aacacttcaa ctcaaggatc aacaaacact 1020
tcaatcaatc ctgttactct tcctttcact tcaagagata tttacagaac agaaagtttg 1080
gctggtttga atttgtttt gacacaacca gtgaatggag ttccaagagt tgattttcat 1140
tggaaatttg ttactcatcc aattgcttca gacaattttt attatcctgg atatgctgga 1200
attggaactc aacttcaaga ttcagaaaat gaacttcctc cagaaacaac tggacaacca 1260
aattatgaaa gctattctca caggctttct catattggat tgatttctgc ttctcatgtc 1320
aaagcattgg tttattcttg gacacacaga agtgctgaca gaacaaatac aattcattca 1380
gattcaatca ctcaaattcc tttggtgaaa gctcatactt tgcaaagtgg aacaactggt 1440
gtgaaaggac ctggtttcac tgggtggagat attttgagaa gaacaagtgg aggaccattt 1500
gctttttcaa atgtgaattt ggattggaat ctttctcaa gatatagagc aagaatcaga 1560
tatgcttcaa caacaaattt gagaatgtat gttacaattg ctggagaaag aatttttgc 1620
ggacaattca acaaaacaat gaacactgga gatccattga catttcaaag ttttcttat 1680
gcaacaattg atactgcttt cacttttcca acaaaggctt cttcattgac tgttgagct 1740
gatacatttt cttctggaaa tgaagtttat gttgacagat ttgaattgat tccagtt 1797

```

<210> 19
 <211> 1896
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI224z (axmi224zv03.04)

10

<400> 19

```

atgaactctg ttttgaacag tgggaagagca acaaatggag atgcttacia tgttgttgc 60
catgatccat tttcttttca acacaaaagt ttggatacaa ttcaagaaga atggatggaa 120
tggagaaga acaatcattc tctttatgtt gatccaattg ttggaactgt tgcttcttt 180
cttctcaaga aagttggaag tttggttgga aaaaggattc tttcagaatt gagaaaattg 240
atthttccaa gtggttcaac aaatttgatg caagatattt tgagagaaac agaaaaattt 300
ttgaatcaaa gattgaacac tgatactttg gcaagagtga atgctgaatt gactggtttg 360
caagcaaatg ttgaagagtt caacagacaa gttgacaatt ttttgaatcc aaacagaaat 420
gctgttctc tttcaatcac ttcttcagtg aatacaatgc aacaactttt cttgaacaga 480
ttgctcaat ttcaaatgca aggatatcaa cttcttcttc ttctttgtt tgctcaagct 540
gcaaatcttc atctttcttt catcagagat gtgattttga atgctgatga atggggaatt 600
tctgctgcaa ctttgagaac ttatcaaaat catttgagaa attatacaag agaataattca 660
aattattgca ttacaactta tcaaaactgct ttcagaggat tgaatacaag attgcatgat 720
atgttggagt tcagaactta catgtttttg aatgtttttg aatatgtttc aatttggagc 780
ttgttcaaat atcaaaagttt gttggtttct tctggagcaa atctttatgc ttctggaagt 840
ggtcctcaac aaactcaaaag tttcaactct caagattggc catttcttta ttctttgtt 900
caagttaatt caaattatgt tttgaatgga ttttctggag caagattgac acaaaactttt 960
ccaaacattg ttggattgca tggaaacaaca acaactcatg ctttgcttgc tgcaagagtt 1020
aattattctg gtggagtttc ttctggagat attggagctg ttttcaatca aaatttttct 1080
tgttcaactt ttcttctcc tttgttgaca ccatttgtga gaagctggtt ggattctgga 1140
agtgcacagag gaggaatcaa cactgttaca aattggcaaa cagaaagttt tgaacaact 1200
ttgggattga gaagtggagc tttcaactgca agaggaaatt caaattattt tccagattat 1260

ttcatcagaa acatttctgg agttcttttg gtggtgagaa atgaagattt gagaaggcca 1320
ttgcattaca atcaaatcag aaacattgaa tctccaagtg gaactcctgg tggattgaga 1380
gcttcatggt tttcagttca caacagaaaa aacaacattt atgctgttca tgaaaatgga 1440
acaatgattc atcttgctcc agaagattac actggtttca ccatttctcc aattcatgca 1500
actcaagtga acaatcaaac aagaactttc atttcagaaa aatttggaaa tcaaggagat 1560
tctttgagat ttgaacaaaag caacacaact gcaagatata ctttgagagg aaatggaaat 1620
tcttacaatc tttatttgag agtttcttca attggaaatt caacaatcag agttacaatc 1680
aatggaagag tttacactgc ttcaaatgct aacacaacaa caacaatga tggagtgaat 1740
gacaatggag caagattttc tgatatcaac attggaaatg ttgttgcttc agacaacaca 1800
aatgttctct tggatatcaa tgttactttg aacagtggaa ctcaatttga attgatgaac 1860
atcatgtttg ttccaacaaa ttcttctctc ctttat 1896

```

<210> 20
 <211> 1821
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos sintética que codifica AXMI225z (axmi225zv02.04)

10

<400> 20

ES 2 647 595 T3

```

atggacaaca atccaaacat caatgaatgc attccttaca attgcttgtc aaatccagaa 60
gttgaagttc ttggaggaga aagaattgaa actggatata ctccaattga tatttctctt 120
tctttgacac aatttcttct ttcagaattht gttcctggag ctggatttgt tcttggattg 180
gttgatatca tttggggaat ttttggctct tctcaatggg atgctttttt ggttcaaatt 240
gaacaattga tcaatcaaag aattgaagaa tttgcaagaa atcaagcaat ttcaagattg 300
gaaggattgt caaatcttta tcaaatttat gctgaaagtt tcagagcttg ggaagctgat 360
ccaacaaatc cagctttgag agttgaaatg aggattcaat tcaatgatat gaactcagct 420
ttgacaactg caattccttt gtttgcctgt caaaattatc aagttccttt gctttctgtt 480
tatgttcaag ctgcaaactc tcatctttct gttttgagag atgtttctgt ttttggacaa 540
agatggggat ttgatgcaac aacaatcaat tcaagatata atgatttgac aagattgatt 600
ggaaattaca ctgattatgc tgtgagatgg tacaacactg gtttggaaag agtttgggga 660
ccagattcaa gagattgat cagatacaat caattcagaa gagaattgac attgactgtt 720
ttgatattg tttctttgtt tccaaattat gattcaagaa cttatccaat cagaactgtt 780
tctcaattga caagagaaat ttatacaaat cctgttttgg aagatttcaa tggaaagttt 840
agaggaagtg ctcaaggaat tgaacaaagc atcagatctc ctcatattgat ggatattttg 900
aactcaatta caatttacac tgatgctcac agaggatatt attattggag tggacatcaa 960
atcatggctt ctctgttgg attttctgga ccagaattta cttttcctct ttatggaaca 1020
atgggaaatg ctgctcctca acaagaatt gttgctcaac ttggacaagg agtttataga 1080
actttgagtt caacatttta cagatctcct ttcaacattg gaatcaacaa tcaacaactt 1140
tctgttttgg atggaacaga atttgcttat ggaacttctt caaatcttcc ttctgctgtt 1200
tacagaaaaa gtggaactgt tgattctttg gatgaaattc ctctcaaaa caacaatgtt 1260
cctccaagac aaggattttc tcacagattg agccatgttt caatgttcag aagtggattt 1320
tcaaattctt ctgtttcaat catcagagct ccaatgtttt cttggattca cagaagtgt 1380
gagttcaaca acatcatcc ttcttctcaa atcactcaa ttcttttgac aaaatcaaca 1440
aatcttggaa gtggaacttc tgttgtgaaa ggacctggtt tcaactggtg tgatattttg 1500
agaagaactt ctcttgaca aatttcaact ttgagagtga acatcactgc tctctttct 1560
caaagataca gagtgagaat cagatagct tcaacaacaa atcttcaatt tcatacaagc 1620
attgatggaa ggccaatcaa tcaaggaaat ttttcagcaa caatgagttc tggaaagcaat 1680
cttcaaagtg gaagtttcag aactgctggt ttcaacaact ctttcaattt ttcaaagga 1740
agttctgttt tcaactcttc tgcctatgtt ttcaattctg gaaatgaagt ttacattgac 1800
agaattgaat ttgttccagc t 1821

```

<210> 21
 <211> 1229
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 21

```

Met Asn Gln Asn Lys His Gly Ile Ile Gly Ala Ser Asn Cys Gly Cys
 1           5           10           15
Thr Ser Asp Asn Val Ala Lys Tyr Pro Leu Ala Asn Asn Pro Tyr Ser
          20           25           30

```

10

ES 2 647 595 T3

Ser Ala Leu Asn Leu Asn Ser Cys Gln Asn Ser Ser Ile Leu Asn Trp
35 40 45
Ile Asn Ile Ile Gly Asp Ala Ala Lys Glu Ala Val Ser Ile Gly Thr
50 55 60
Thr Ile Val Ser Leu Ile Thr Ala Pro Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser
65 70 75 80
Ile Val Tyr Asp Leu Ile Gly Lys Val Leu Gly Gly Ser Ser Gly Gln
85 90 95
Ser Ile Ser Asp Leu Ser Ile Cys Asp Leu Leu Ser Ile Ile Asp Leu
100 105 110
Arg Val Asn Gln Ser Val Leu Asn Asp Gly Ile Ala Asp Phe Asn Gly
115 120 125
Ser Val Leu Leu Tyr Arg Asn Tyr Leu Glu Ala Leu Asp Ser Trp Asn
130 135 140
Lys Asn Pro Asn Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg Thr Arg Phe Arg
145 150 155 160
Ile Ala Asp Ser Glu Phe Asp Arg Ile Leu Thr Arg Gly Ser Leu Thr
165 170 175
Asn Gly Gly Ser Leu Ala Arg Gln Asn Ala Gln Ile Leu Leu Leu Pro
180 185 190
Ser Phe Ala Ser Ala Ala Phe Phe His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala
195 200 205
Thr Arg Tyr Gly Thr Asn Trp Gly Leu Tyr Asn Ala Thr Pro Phe Ile
210 215 220
Asn Tyr Gln Ser Lys Leu Val Glu Leu Ile Glu Leu Tyr Thr Asp Tyr
225 230 235 240
Cys Val His Trp Tyr Asn Arg Gly Phe Asn Glu Leu Arg Gln Arg Gly
245 250 255
Thr Ser Ala Thr Ala Trp Leu Glu Phe His Arg Tyr Arg Arg Glu Met
260 265 270
Thr Leu Met Val Leu Asp Ile Val Ala Ser Phe Ser Ser Leu Asp Ile
275 280 285
Thr Asn Tyr Pro Ile Glu Thr Asp Phe Gln Leu Ser Arg Val Ile Tyr
290 295 300
Thr Asp Pro Ile Gly Phe Val His Arg Ser Ser Leu Arg Gly Glu Ser
305 310 315 320
Trp Phe Ser Phe Val Asn Arg Ala Asn Phe Ser Asp Leu Glu Asn Ala
325 330 335
Ile Pro Asn Pro Arg Pro Ser Trp Phe Leu Asn Asn Met Ile Ile Ser
340 345 350
Thr Gly Ser Leu Thr Leu Pro Val Ser Pro Asn Thr Asp Arg Ala Arg
355 360 365
Val Trp Tyr Gly Ser Arg Asp Arg Ile Ser Pro Ala Asn Ser Gln Val
370 375 380
Ile Ser Glu Leu Ile Ser Gly Gln His Thr Asn Ser Thr Gln Thr Ile
385 390 395 400
Leu Gly Arg Asn Ile Phe Arg Ile Asp Ser Gln Ala Cys Asn Leu Asn
405 410 415
Asp Thr Thr Tyr Gly Val Asn Arg Ala Val Phe Tyr His Asp Ala Ser
420 425 430
Glu Gly Ser Gln Arg Ser Val Tyr Glu Gly Phe Ile Arg Thr Thr Gly
435 440 445
Ile Asp Asn Pro Arg Val Gln Asn Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gly Glu
450 455 460
Asn Ser Asn Ile Pro Thr Pro Glu Asp Tyr Thr His Leu Leu Ser Thr
465 470 475 480
Thr Val Asn Leu Thr Gly Gly Leu Arg Gln Val Ala Asn Asn Arg Arg
485 490 495
Ser Ser Ile Val Ile Tyr Gly Trp Thr His Lys Ser Leu Thr Arg Asn
500 505 510
Asn Thr Ile Asn Pro Gly Ile Ile Thr Gln Ile Pro Met Val Lys Leu
515 520 525
Ser Asn Leu Pro Ser Gly Thr Asn Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr

ES 2 647 595 T3

530						535									540
Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Asn	Ala	Gly	Asn	Phe	Gly	Asp	Val
545						550				555					560
Arg	Val	Asn	Ile	Ala	Gly	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Ile
				565						570					575
Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Gln	Phe	His	Thr	Ser	Ile	Asn	Gly
				580						585				590	
Arg	Ala	Ile	Asn	Gln	Ala	Asn	Phe	Pro	Ala	Thr	Met	Asn	Ile	Gly	Ala
				595			600						605		
Ser	Leu	Asn	Tyr	Arg	Thr	Phe	Arg	Thr	Val	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Phe
				610			615						620		
Thr	Phe	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	His	Ser	Phe
625							630						635		640
Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Ala
				645						650					655
Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala
				660						665				670	
Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp
				675				680					685		
Val	Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Ala	Cys	Leu
				690			695					700			
Ser	Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Val
705						710					715				720
Lys	His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro
				725						730					735
Asn	Phe	Arg	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser
				740						745				750	
Thr	Asp	Ile	Thr	Ile	Gln	Gly	Gly	Asp	Asp	Val	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr
				755				760					765		
Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Phe	Asp	Glu	Cys	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr
				770			775					780			
Gln	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Lys	Leu	Lys	Ala	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Glu	Leu
785							790					795			800
Arg	Gly	Tyr	Ile	Glu	Asp	Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Val	Tyr	Leu	Ile	Arg
				805						810					815
Tyr	Asn	Ala	Lys	His	Glu	Thr	Leu	Asn	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Ser	Leu
				820						825				830	
Trp	Pro	Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn
				835						840				845	
Arg	Cys	Ala	Pro	His	Ile	Glu	Trp	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Cys	Ser	Cys
				850						855				860	
Arg	Asp	Gly	Glu	Lys	Cys	Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp
865						870						875			880
Ile	Asp	Val	Gly	Cys	Thr	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Trp	Val
				885											895
Ile	Phe	Lys	Ile	Lys	Thr	Gln	Asp	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu
				900						905				910	
Glu	Phe	Leu	Glu	Glu	Lys	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Val
				915						920				925	
Lys	Arg	Ala	Glu	Lys	Lys	Trp	Arg	Asp	Lys	Arg	Asp	Lys	Leu	Glu	Leu
				930						935				940	
Glu	Thr	Asn	Ile	Val	Tyr	Lys	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Ala	Leu
945						950						955			960
Phe	Val	Asp	Ser	Gln	Tyr	Asn	Arg	Leu	Gln	Thr	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala
				965										975	
Met	Ile	His	Ala	Ala	Asp	Lys	Arg	Val	His	Arg	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr
				980						985				990	
Leu	Pro	Glu	Leu	Ser	Val	Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Ala	Ile	Phe	Glu
				995						1000				1005	
Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Ile	Phe	Thr	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg
				1010										1020	
Asn	Val	Ile	Lys	Asn	Gly	Asp	Phe	Asn	His	Gly	Leu	Ser	Cys	Trp	Asn
1025						1030								1035	1040

ES 2 647 595 T3

```

Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val
      1045                               1050                   1055
Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val
      1060                               1065                   1070
Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly
      1075                               1080                   1085
Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asp His Thr Asp
      1090                               1095                   1100
Glu Leu Lys Phe Arg Asn Cys Glu Glu Glu Glu Gly Tyr Pro Asn Asn
1105                               1110                   1115                   1120
Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Asn Gln Asp Glu Tyr Lys Gly
      1125                               1130                   1135
Ala Tyr Pro Ser Arg Asn Gly Gly Tyr Glu Asp Thr Tyr Asp Thr Ser
      1140                               1145                   1150
Ala Ser Val His Tyr Asn Thr Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Ile Gly Thr
      1155                               1160                   1165
Asp Leu Gln Arg Tyr Asn Gln Cys Glu Asn Asn Arg Gly Tyr Gly Asn
1170                               1175                   1180
Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe
1185                               1190                   1195                   1200
Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr
      1205                               1210                   1215
Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
      1220                               1225

```

<210> 22
 <211> 656
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*
 <400> 22

5

ES 2 647 595 T3

Met	Asn	Gln	Asn	Lys	His	Gly	Ile	Ile	Gly	Ala	Ser	Asn	Cys	Gly	Cys
1				5					10					15	
Thr	Ser	Asp	Asn	Val	Ala	Lys	Tyr	Pro	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ser
			20					25					30		
Ser	Ala	Leu	Asn	Leu	Asn	Ser	Cys	Gln	Asn	Ser	Ser	Ile	Leu	Asn	Trp
		35					40					45			
Ile	Asn	Ile	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Ser	Ile	Gly	Thr
	50				55						60				
Thr	Ile	Val	Ser	Leu	Ile	Thr	Ala	Pro	Ser	Leu	Thr	Gly	Leu	Ile	Ser
65				70						75				80	
Ile	Val	Tyr	Asp	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gln
			85						90					95	
Ser	Ile	Ser	Asp	Leu	Ser	Ile	Cys	Asp	Leu	Leu	Ser	Ile	Ile	Asp	Leu
			100					105					110		
Arg	Val	Asn	Gln	Ser	Val	Leu	Asn	Asp	Gly	Ile	Ala	Asp	Phe	Asn	Gly
		115					120					125			
Ser	Val	Leu	Leu	Tyr	Arg	Asn	Tyr	Leu	Glu	Ala	Leu	Asp	Ser	Trp	Asn
	130					135					140				
Lys	Asn	Pro	Asn	Ser	Ala	Ser	Ala	Glu	Glu	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Arg
145				150						155					160
Ile	Ala	Asp	Ser	Glu	Phe	Asp	Arg	Ile	Leu	Thr	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr
				165					170					175	
Asn	Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Arg	Gln	Asn	Ala	Gln	Ile	Leu	Leu	Leu	Pro
			180					185					190		
Ser	Phe	Ala	Ser	Ala	Ala	Phe	Phe	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala
	195					200						205			
Thr	Arg	Tyr	Gly	Thr	Asn	Trp	Gly	Leu	Tyr	Asn	Ala	Thr	Pro	Phe	Ile
	210					215					220				
Asn	Tyr	Gln	Ser	Lys	Leu	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Leu	Tyr	Thr	Asp	Tyr
225				230						235					240
Cys	Val	His	Trp	Tyr	Asn	Arg	Gly	Phe	Asn	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Gly

ES 2 647 595 T3

				245					250					255	
Thr	Ser	Ala	Thr	Ala	Trp	Leu	Glu	Phe	His	Arg	Tyr	Arg	Arg	Glu	Met
			260					265					270		
Thr	Leu	Met	Val	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile
		275					280					285			
Thr	Asn	Tyr	Pro	Ile	Glu	Thr	Asp	Phe	Gln	Leu	Ser	Arg	Val	Ile	Tyr
	290					295					300				
Thr	Asp	Pro	Ile	Gly	Phe	Val	His	Arg	Ser	Ser	Leu	Arg	Gly	Glu	Ser
305				310						315					320
Trp	Phe	Ser	Phe	Val	Asn	Arg	Ala	Asn	Phe	Ser	Asp	Leu	Glu	Asn	Ala
				325					330					335	
Ile	Pro	Asn	Pro	Arg	Pro	Ser	Trp	Phe	Leu	Asn	Asn	Met	Ile	Ile	Ser
			340					345					350		
Thr	Gly	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Val	Ser	Pro	Asn	Thr	Asp	Arg	Ala	Arg
		355					360					365			
Val	Trp	Tyr	Gly	Ser	Arg	Asp	Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Asn	Ser	Gln	Val
	370					375					380				
Ile	Ser	Glu	Leu	Ile	Ser	Gly	Gln	His	Thr	Asn	Ser	Thr	Gln	Thr	Ile
385					390					395					400
Leu	Gly	Arg	Asn	Ile	Phe	Arg	Ile	Asp	Ser	Gln	Ala	Cys	Asn	Leu	Asn
				405					410					415	
Asp	Thr	Thr	Tyr	Gly	Val	Asn	Arg	Ala	Val	Phe	Tyr	His	Asp	Ala	Ser
			420					425					430		
Glu	Gly	Ser	Gln	Arg	Ser	Val	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ile	Arg	Thr	Thr	Gly
		435					440					445			
Ile	Asp	Asn	Pro	Arg	Val	Gln	Asn	Ile	Asn	Thr	Tyr	Phe	Pro	Gly	Glu
	450					455					460				
Asn	Ser	Asn	Ile	Pro	Thr	Pro	Glu	Asp	Tyr	Thr	His	Leu	Leu	Ser	Thr
465				470						475					480
Thr	Val	Asn	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Arg	Gln	Val	Ala	Asn	Asn	Arg	Arg
				485					490					495	
Ser	Ser	Ile	Val	Ile	Tyr	Gly	Trp	Thr	His	Lys	Ser	Leu	Thr	Arg	Asn
			500					505					510		
Asn	Thr	Ile	Asn	Pro	Gly	Ile	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Met	Val	Lys	Leu
		515					520					525			
Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly	Thr	Asn	Val	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr
	530					535					540				
Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Asn	Ala	Gly	Asn	Phe	Gly	Asp	Val
545					550					555					560
Arg	Val	Asn	Ile	Ala	Gly	Ser	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Ile
				565					570					575	
Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Gln	Phe	His	Thr	Ser	Ile	Asn	Gly
			580					585					590		
Arg	Ala	Ile	Asn	Gln	Ala	Asn	Phe	Pro	Ala	Thr	Met	Asn	Ile	Gly	Ala
		595					600					605			
Ser	Leu	Asn	Tyr	Arg	Thr	Phe	Arg	Thr	Val	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Phe
	610					615					620				
Thr	Phe	Ser	Glu	Ala	Ser	Ser	Ile	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	His	Ser	Phe
625					630					635					640
Ser	Ser	Gly	Asn	Ala	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Ala
				645					650					655	

<210> 23
 <211> 662
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 23

ES 2 647 595 T3

Met	Asn	Gln	Asn	Lys	His	Gly	Ile	Ile	Gly	Ala	Ser	Asn	Cys	Gly	Cys
1				5					10					15	
Thr	Ser	Asp	Asn	Val	Ala	Lys	Tyr	Pro	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ser
			20					25					30		

ES 2 647 595 T3

Ser Ala Leu Asn Leu Asn Ser Cys Gln Asn Ser Ser Ile Leu Asn Trp
35 40 45
Ile Asn Ile Ile Gly Asp Ala Ala Lys Glu Ala Val Ser Ile Gly Thr
50 55 60
Thr Ile Val Ser Leu Ile Thr Ala Pro Ser Leu Thr Gly Leu Ile Ser
65 70 75 80
Ile Val Tyr Asp Leu Ile Gly Lys Val Leu Gly Gly Ser Ser Gly Gln
85 90 95
Ser Ile Ser Asp Leu Ser Ile Cys Asp Leu Leu Ser Ile Ile Asp Leu
100 105 110
Arg Val Asn Gln Ser Val Leu Asn Asp Gly Ile Ala Asp Phe Asn Gly
115 120 125
Ser Val Leu Leu Tyr Arg Asn Tyr Leu Glu Ala Leu Asp Ser Trp Asn
130 135 140
Lys Asn Pro Asn Ser Ala Ser Ala Glu Glu Leu Arg Thr Arg Phe Arg
145 150 155 160
Ile Ala Asp Ser Glu Phe Asp Arg Ile Leu Thr Arg Gly Ser Leu Thr
165 170 175
Asn Gly Gly Ser Leu Ala Arg Gln Asn Ala Gln Ile Leu Leu Leu Pro
180 185 190
Ser Phe Ala Ser Ala Ala Phe Phe His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala
195 200 205
Thr Arg Tyr Gly Thr Asn Trp Gly Leu Tyr Asn Ala Thr Pro Phe Ile
210 215 220
Asn Tyr Gln Ser Lys Leu Val Glu Leu Ile Glu Leu Tyr Thr Asp Tyr
225 230 235 240
Cys Val His Trp Tyr Asn Arg Gly Phe Asn Glu Leu Arg Gln Arg Gly
245 250 255
Thr Ser Ala Thr Ala Trp Leu Glu Phe His Arg Tyr Arg Arg Glu Met
260 265 270
Thr Leu Met Val Leu Asp Ile Val Ala Ser Phe Ser Ser Leu Asp Ile
275 280 285
Thr Asn Tyr Pro Ile Glu Thr Asp Phe Gln Leu Ser Arg Val Ile Tyr
290 295 300
Thr Asp Pro Ile Gly Phe Val His Arg Ser Ser Leu Arg Gly Glu Ser
305 310 315 320
Trp Phe Ser Phe Val Asn Arg Ala Asn Phe Ser Asp Leu Glu Asn Ala
325 330 335
Ile Pro Asn Pro Arg Pro Ser Trp Phe Leu Asn Asn Met Ile Ile Ser
340 345 350
Thr Gly Ser Leu Thr Leu Pro Val Ser Pro Asn Thr Asp Arg Ala Arg
355 360 365
Val Trp Tyr Gly Ser Arg Asp Arg Ile Ser Pro Ala Asn Ser Gln Val
370 375 380
Ile Ser Glu Leu Ile Ser Gly Gln His Thr Asn Ser Thr Gln Thr Ile
385 390 395 400
Leu Gly Arg Asn Ile Phe Arg Ile Asp Ser Gln Ala Cys Asn Leu Asn
405 410 415
Asp Thr Thr Tyr Gly Val Asn Arg Ala Val Phe Tyr His Asp Ala Ser
420 425 430
Glu Gly Ser Gln Arg Ser Val Tyr Glu Gly Phe Ile Arg Thr Thr Gly
435 440 445
Ile Asp Asn Pro Arg Val Gln Asn Ile Asn Thr Tyr Phe Pro Gly Glu
450 455 460
Asn Ser Asn Ile Pro Thr Pro Glu Asp Tyr Thr His Leu Leu Ser Thr
465 470 475 480
Thr Val Asn Leu Thr Gly Gly Leu Arg Gln Val Ala Asn Asn Arg Arg
485 490 495
Ser Ser Ile Val Ile Tyr Gly Trp Thr His Lys Ser Leu Thr Arg Asn
500 505 510
Asn Thr Ile Asn Pro Gly Ile Ile Thr Gln Ile Pro Met Val Lys Leu
515 520 525
Ser Asn Leu Pro Ser Gly Thr Asn Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr

ES 2 647 595 T3

```

      530              535              540
Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Asn Ala Gly Asn Phe Gly Asp Val
545              550              555              560
Arg Val Asn Ile Ala Gly Ser Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile
      565              570              575
Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asn Gly
      580              585              590
Arg Ala Ile Asn Gln Ala Asn Phe Pro Ala Thr Met Asn Ile Gly Ala
      595              600              605
Ser Leu Asn Tyr Arg Thr Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe
      610              615              620
Thr Phe Ser Glu Ala Ser Ser Ile Phe Thr Leu Ser Thr His Ser Phe
625              630              635              640
Ser Ser Gly Asn Ala Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala
      645              650              655
Glu Val Thr Phe Glu Ala
      660

```

- <210> 24
- <211> 1237
- <212> PRT
- <213> *Bacillus thuringiensis*

- <400> 24

5

ES 2 647 595 T3

Met	Asn	Ser	Asn	Arg	Lys	Asn	Glu	Asn	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Ser	Phe
1				5					10					15	
Ile	Pro	Ala	Val	Ser	Asn	Glu	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Glu	Tyr	Ala
			20					25					30		
Gln	Thr	Asn	Gln	Leu	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Glu	Asp	Gly	Leu	Cys	Ile
		35					40					45			
Ala	Glu	Gly	Glu	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Val	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Gln
		50				55					60				
Thr	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala	Gly	Arg	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Gly	Val	Pro
65					70					75					80
Phe	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	Ser	Phe	Tyr	Ser	Phe	Ile	Val	Gly	Glu	Leu
				85					90					95	
Trp	Pro	Lys	Gly	Arg	Asp	Gln	Trp	Glu	Ile	Phe	Met	Glu	His	Val	Glu
			100					105					110		
Gln	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Ile	Thr	Ala	Asn	Ala	Arg	Asn	Thr	Ala	Leu
		115					120					125			
Ala	Arg	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	Asp	Ser	Phe	Arg	Ala	Tyr	Gln	Gln	Ser
		130				135					140				
Leu	Glu	Asp	Trp	Leu	Glu	Asn	Arg	Asn	Asp	Ala	Arg	Thr	Arg	Ser	Val
145					150					155					160
Leu	Tyr	Thr	Gln	Tyr	Ile	Ala	Leu	Glu	Leu	Asp	Phe	Leu	Asn	Ala	Met
				165					170					175	
Pro	Leu	Phe	Ala	Ile	Arg	Glu	Gln	Glu	Val	Pro	Leu	Leu	Met	Val	Tyr
			180					185					190		
Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Leu
		195					200					205			
Tyr	Gly	Arg	Glu	Phe	Gly	Leu	Thr	Ser	Gln	Glu	Ile	Gln	Arg	Tyr	Tyr
	210					215					220				
Glu	Arg	Gln	Val	Glu	Arg	Thr	Arg	Asp	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Val	Gln
225					230					235					240
Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Asn	Asn	Leu	Arg	Gly	Thr	Asn	Ala	Glu	Ser
				245					250					255	
Trp	Val	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Val	Leu
			260					265					270		
Asp	Leu	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Ser	Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Tyr	Pro	Ile
		275					280					285			
Asn	Thr	Ser	Ala	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ile	Gly
	290						295					300			

Ala Thr Gly Val Asn Met Ala Ser Met Asn Trp Tyr Asn Asn Asn Ala
305 310 315 320
Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu Thr Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu
325 330 335
Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu Lys Ile Phe Ser Ala Ser Ser Arg Trp
340 345 350
Ser Asn Thr Arg His Met Thr Tyr Trp Arg Gly His Thr Ile Gln Ser
355 360 365
Arg Pro Ile Arg Gly Ala Leu Ile Thr Ser Thr His Gly Asn Thr Asn
370 375 380
Thr Ser Ile Asn Pro Val Thr Phe Gln Phe Pro Ser Arg Asp Val Tyr
385 390 395 400
Arg Thr Glu Ser Tyr Ala Gly Val Leu Leu Trp Gly Ile Tyr Leu Glu
405 410 415
Pro Ile His Gly Val Pro Thr Val Arg Phe Asn Phe Arg Asn Pro Gln
420 425 430
Asn Thr Phe Glu Arg Gly Thr Ala Asn Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Ser
435 440 445
Pro Gly Leu Gln Leu Lys Asp Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr
450 455 460
Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile
465 470 475 480
Gly Ile Ile Leu Gln Thr Arg Leu Asn Val Pro Val Tyr Ser Trp Thr
485 490 495
His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr
500 505 510
Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Asn Leu Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile
515 520 525
Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Leu Val Arg Leu Asn Asn Ser
530 535 540
Gly Asn Asn Ile Gln Asn Arg Gly Tyr Leu Glu Val Pro Ile Gln Phe
545 550 555 560
Thr Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val
565 570 575
Thr Pro Ile His Leu Ser Val Asn Trp Gly Asn Ser Asn Ile Phe Ser
580 585 590
Ser Thr Val Pro Ala Thr Ala Ala Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Arg
595 600 605
Asp Phe Gly Tyr Phe Glu Ser Thr Asn Ala Phe Thr Ser Val Thr Gly
610 615 620
Asn Val Val Gly Val Arg Asn Phe Ser Glu Asn Ala Arg Val Ile Ile
625 630 635 640
Asp Arg Phe Glu Phe Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
645 650 655
Asp Leu Glu Arg Ala Gln Glu Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Asn Thr
660 665 670
Asn Pro Arg Arg Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln
675 680 685
Val Ser Asn Leu Val Ala Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu
690 695 700
Lys Arg Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp
705 710 715 720
Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Thr Ser Ile Asn Lys Gln
725 730 735
Pro Asp Phe Ile Ser Thr Asn Glu Gln Ser Asn Phe Thr Ser Ile His
740 745 750
Glu Gln Ser Glu His Gly Trp Trp Gly Ser Glu Asn Ile Thr Ile Gln
755 760 765
Glu Gly Asn Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr
770 775 780
Tyr Asn Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser
785 790 795 800
Glu Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp

				805						810				815	
Ser	Gln	Asp	Leu	Glu	Ile	Tyr	Leu	Ile	Arg	Tyr	Asn	Ala	Lys	His	Glu
			820					825					830		
Thr	Leu	Asp	Val	Pro	Gly	Thr	Glu	Ser	Val	Trp	Pro	Leu	Ser	Val	Glu
		835					840				845				
Ser	Pro	Ile	Arg	Arg	Cys	Gly	Glu	Pro	Asn	Arg	Cys	Ala	Pro	His	Phe
	850					855				860					
Glu	Trp	Asn	Pro	Asp	Leu	Asp	Cys	Ser	Cys	Arg	Asp	Gly	Glu	Lys	Cys
865					870					875				880	
Ala	His	His	Ser	His	His	Phe	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Val	Gly	Cys	Ile
				885					890					895	
Asp	Leu	His	Glu	Asn	Leu	Gly	Val	Trp	Val	Val	Phe	Lys	Ile	Lys	Thr
			900					905					910		
Gln	Glu	Gly	His	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Leu	Glu	Phe	Ile	Glu	Glu	Lys
		915					920					925			
Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Ala	Leu	Ser	Arg	Val	Lys	Arg	Ala	Glu	Lys	Lys
	930					935					940				
Trp	Arg	Asp	Lys	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Glu	Thr	Lys	Arg	Val	Tyr
945				950						955					960
Thr	Glu	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Leu	Phe	Val	Asp	Ser	Gln	Tyr
				965					970					975	
Asp	Arg	Leu	Gln	Ala	Asp	Thr	Asn	Ile	Gly	Met	Ile	His	Ala	Ala	Asp
			980					985					990		
Lys	Leu	Val	His	Arg	Ile	Arg	Glu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Glu	Leu	Ser	Val
		995					1000					1005			
Ile	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Ile	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Gly	Arg	Ile
	1010					1015					1020				
Ile	Thr	Ala	Ile	Ser	Leu	Tyr	Asp	Ala	Arg	Asn	Val	Val	Lys	Asn	Gly
1025					1030					1035				1040	
Asp	Phe	Asn	Asn	Gly	Leu	Ala	Cys	Trp	Asn	Val	Lys	Gly	His	Val	Asp
				1045					1050					1055	
Val	Gln	Gln	Ser	His	His	Arg	Ser	Val	Leu	Val	Ile	Pro	Glu	Trp	Glu
				1060				1065					1070		
Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Ala	Val	Arg	Val	Cys	Pro	Gly	Arg	Gly	Tyr	Ile
	1075						1080					1085			
Leu	Arg	Val	Thr	Ala	Tyr	Lys	Glu	Gly	Tyr	Gly	Glu	Gly	Cys	Val	Thr
	1090					1095					1100				
Ile	His	Glu	Ile	Glu	Asn	Asn	Thr	Asp	Glu	Leu	Lys	Phe	Lys	Asn	Cys
1105					1110						1115			1120	
Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Tyr	Pro	Thr	Asp	Thr	Gly	Thr	Cys	Asn	Asp	Tyr
				1125					1130					1135	
Thr	Ala	His	Gln	Gly	Thr	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	Arg	Asn	Ala	Gly	Tyr
			1140					1145					1150		
Glu	Asp	Ala	Tyr	Glu	Val	Asp	Thr	Thr	Ala	Ser	Val	Asn	Tyr	Lys	Pro
	1155						1160						1165		
Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Thr	Tyr	Thr	Asp	Val	Arg	Arg	Asp	Asn	His	Cys
	1170					1175					1180				
Glu	Tyr	Asp	Arg	Gly	Tyr	Val	Asn	Tyr	Pro	Pro	Val	Pro	Ala	Gly	Tyr
1185					1190					1195				1200	
Met	Thr	Lys	Glu	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro	Glu	Thr	Asp	Lys	Val	Trp	Ile
				1205					1210					1215	
Glu	Ile	Gly	Glu	Thr	Glu	Gly	Lys	Phe	Ile	Val	Asp	Ser	Val	Glu	Leu
			1220					1225					1230		
Leu	Leu	Met	Glu	Glu											
		1235													

<210> 25

<211> 648

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 25

ES 2 647 595 T3

Met Asn Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asp Ala Ser Phe
1 5 10 15
Ile Pro Ala Val Ser Asn Glu Ser Val Thr Ile Ser Lys Glu Tyr Ala
20 25 30
Gln Thr Asn Gln Leu Gln Asn Asn Ser Ile Glu Asp Gly Leu Cys Ile
35 40 45
Ala Glu Gly Glu Tyr Ile Asp Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln
50 55 60
Thr Gly Ile Ser Ile Ala Gly Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro
65 70 75 80
Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser Phe Tyr Ser Phe Ile Val Gly Glu Leu
85 90 95
Trp Pro Lys Gly Arg Asp Gln Trp Glu Ile Phe Met Glu His Val Glu
100 105 110
Gln Leu Val Arg Gln Gln Ile Thr Ala Asn Ala Arg Asn Thr Ala Leu
115 120 125
Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly Asp Ser Phe Arg Ala Tyr Gln Gln Ser
130 135 140
Leu Glu Asp Trp Leu Glu Asn Arg Asn Asp Ala Arg Thr Arg Ser Val
145 150 155 160
Leu Tyr Thr Gln Tyr Ile Ala Leu Glu Leu Asp Phe Leu Asn Ala Met
165 170 175
Pro Leu Phe Ala Ile Arg Glu Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr
180 185 190
Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu
195 200 205
Tyr Gly Arg Glu Phe Gly Leu Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr
210 215 220
Glu Arg Gln Val Glu Arg Thr Arg Asp Tyr Ser Asp His Cys Val Gln
225 230 235 240
Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser
245 250 255
Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu
260 265 270
Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile
275 280 285
Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly
290 295 300
Ala Thr Gly Val Asn Met Ala Ser Met Asn Trp Tyr Asn Asn Asn Ala
305 310 315 320
Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu Thr Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu
325 330 335
Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu Lys Ile Phe Ser Ala Ser Ser Arg Trp
340 345 350
Ser Asn Thr Arg His Met Thr Tyr Trp Arg Gly His Thr Ile Gln Ser
355 360 365
Arg Pro Ile Arg Gly Ala Leu Ile Thr Ser Thr His Gly Asn Thr Asn
370 375 380
Thr Ser Ile Asn Pro Val Thr Phe Gln Phe Pro Ser Arg Asp Val Tyr
385 390 395 400
Arg Thr Glu Ser Tyr Ala Gly Val Leu Leu Trp Gly Ile Tyr Leu Glu
405 410 415
Pro Ile His Gly Val Pro Thr Val Arg Phe Asn Phe Arg Asn Pro Gln
420 425 430
Asn Thr Phe Glu Arg Gly Thr Ala Asn Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Ser
435 440 445
Pro Gly Leu Gln Leu Lys Asp Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr
450 455 460
Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile
465 470 475 480
Gly Ile Ile Leu Gln Thr Arg Leu Asn Val Pro Val Tyr Ser Trp Thr
485 490 495
His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr

ES 2 647 595 T3

			500					505					510				
Gln	Ile	Pro	Ala	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Leu	Phe	Asn	Gly	Ser	Val	Ile		
		515					520					525					
Ser	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Leu	Asn	Asn	Ser		
	530					535				540							
Gly	Asn	Asn	Ile	Gln	Asn	Arg	Gly	Tyr	Leu	Glu	Val	Pro	Ile	Gln	Phe		
545					550				555						560		
Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Arg	Tyr	Ala	Ser	Val		
				565				570						575			
Thr	Pro	Ile	His	Leu	Ser	Val	Asn	Trp	Gly	Asn	Ser	Asn	Ile	Phe	Ser		
			580				585						590				
Ser	Thr	Val	Pro	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Asp	Asn	Leu	Gln	Ser	Arg		
		595					600					605					
Asp	Phe	Gly	Tyr	Phe	Glu	Ser	Thr	Asn	Ala	Phe	Thr	Ser	Val	Thr	Gly		
	610					615					620						
Asn	Val	Val	Gly	Val	Arg	Asn	Phe	Ser	Glu	Asn	Ala	Arg	Val	Ile	Ile		
625					630					635					640		
Asp	Arg	Phe	Glu	Phe	Ile	Pro	Val										
				645													

<210> 26
 <211> 655
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

 <400> 26

5

ES 2 647 595 T3

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

ES 2 647 595 T3

```

Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly
 290                295                300
Ala Thr Gly Val Asn Met Ala Ser Met Asn Trp Tyr Asn Asn Asn Ala
305                310                315
Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu Thr Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu
                325                330                335
Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu Lys Ile Phe Ser Ala Ser Ser Arg Trp
                340                345                350
Ser Asn Thr Arg His Met Thr Tyr Trp Arg Gly His Thr Ile Gln Ser
                355                360                365
Arg Pro Ile Arg Gly Ala Leu Ile Thr Ser Thr His Gly Asn Thr Asn
                370                375                380
Thr Ser Ile Asn Pro Val Thr Phe Gln Phe Pro Ser Arg Asp Val Tyr
385                390                395
Arg Thr Glu Ser Tyr Ala Gly Val Leu Leu Trp Gly Ile Tyr Leu Glu
                405                410                415
Pro Ile His Gly Val Pro Thr Val Arg Phe Asn Phe Arg Asn Pro Gln
                420                425                430
Asn Thr Phe Glu Arg Gly Thr Ala Asn Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Ser
                435                440                445
Pro Gly Leu Gln Leu Lys Asp Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr
                450                455                460
Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile
465                470                475
Gly Ile Ile Leu Gln Thr Arg Leu Asn Val Pro Val Tyr Ser Trp Thr
                485                490                495
His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr
                500                505                510
Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Asn Leu Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile
                515                520                525
Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Leu Val Arg Leu Asn Asn Ser
                530                535                540
Gly Asn Asn Ile Gln Asn Arg Gly Tyr Leu Glu Val Pro Ile Gln Phe
545                550                555
Thr Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val
                565                570                575
Thr Pro Ile His Leu Ser Val Asn Trp Gly Asn Ser Asn Ile Phe Ser
                580                585                590
Ser Thr Val Pro Ala Thr Ala Ala Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Arg
                595                600                605
Asp Phe Gly Tyr Phe Glu Ser Thr Asn Ala Phe Thr Ser Val Thr Gly
610                615                620
Asn Val Val Gly Val Arg Asn Phe Ser Glu Asn Ala Arg Val Ile Ile
625                630                635
Asp Arg Phe Glu Phe Ile Pro Val Thr Ala Thr Phe Glu Ala Glu
                645                650                655

```

<210> 27
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 27

ES 2 647 595 T3

Met	Lys	Leu	Lys	Asn	Gln	Asp	Lys	His	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Asn	Ala
1				5					10					15	
Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Asn	Glu	Thr	Asp	Ile
			20					25					30		
Glu	Leu	Gln	Asn	Ile	Asn	His	Glu	Asp	Cys	Leu	Lys	Met	Ser	Glu	Tyr
		35					40					45			
Glu	Asn	Val	Glu	Pro	Phe	Val	Ser	Val	Ser	Thr	Ile	Gln	Thr	Gly	Ile
	50					55					60				
Gly	Ile	Ala	Gly	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ala	Gly

ES 2 647 595 T3

65					70					75				80	
Gln	Val	Ala	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Trp	Pro	Lys
				85					90					95	
Gly	Lys	Ser	Gln	Trp	Glu	Ile	Phe	Met	Glu	His	Val	Glu	Glu	Leu	Ile
			100					105					110		
Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala	Asp	Leu
		115					120					125			
Lys	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Ala	Val	Tyr	His	Glu	Ser	Leu	Glu	Ser
	130					135					140				
Trp	Ile	Lys	Asn	Arg	Asn	Asn	Thr	Arg	Thr	Arg	Ser	Val	Val	Lys	Ser
145					150					155					160
Gln	Tyr	Ile	Thr	Leu	Glu	Leu	Met	Phe	Val	Gln	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe
				165					170					175	
Ala	Val	Ser	Gly	Glu	Glu	Val	Pro	Leu	Leu	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ala
			180					185					190		
Ala	Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	Lys
		195					200					205			
Glu	Trp	Gly	Leu	Ser	Asp	Ser	Glu	Ile	Ser	Thr	Phe	Tyr	Asn	Arg	Gln
	210					215					220				
Val	Glu	Arg	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Thr	Lys	Trp	Phe	Asp
225					230					235					240
Thr	Gly	Leu	Asn	Arg	Leu	Lys	Gly	Ser	Asn	Ala	Glu	Ile	Trp	Val	Lys
			245						250					255	
Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Asp	Met	Thr	Leu	Met	Val	Leu	Asp	Leu	Val
			260				265						270		
Ala	Leu	Phe	Gln	Ser	Tyr	Asp	Thr	His	Met	Tyr	Pro	Ile	Lys	Thr	Thr
		275					280					285			
Ala	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ile	Gly	Thr	Val	His
	290					295						300			
Pro	His	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Thr	Thr	Trp	Tyr	Asn	Asn	Asn	Ala	Pro
305					310					315					320
Ser	Phe	Ser	Ala	Ile	Glu	Ala	Ala	Val	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Leu
			325						330					335	
Asp	Phe	Leu	Glu	Gln	Val	Thr	Ile	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ser	Arg	Trp	Ser
			340					345					350		
Asn	Thr	Gln	Tyr	Met	Asn	Met	Trp	Gly	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Phe	Arg
	355					360						365			
Thr	Ile	Gly	Gly	Thr	Leu	Asn	Thr	Ser	Thr	Gln	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr
	370					375					380				
Ser	Ile	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Phe	Thr	Ser	Arg	Asp	Ile	Tyr	Arg
385					390					395					400
Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Gln	Pro	Val	Asn
			405						410					415	
Gly	Val	Pro	Arg	Val	Asp	Phe	His	Trp	Lys	Phe	Val	Thr	His	Pro	Ile
			420					425					430		
Ala	Ser	Asp	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Gln
		435					440					445			
Leu	Gln	Asp	Ser	Glu	Asn	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Thr	Gly	Gln	Pro
	450					455					460				
Asn	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	Ile	Gly	Leu	Ile	Ser
465					470					475					480
Ala	Ser	His	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala
			485						490					495	
Asp	Arg	Thr	Asn	Thr	Ile	His	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu
			500					505					510		
Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Val	Lys	Gly	Pro
	515						520					525			
Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Gly	Gly	Pro	Phe
	530					535					540				
Ala	Phe	Ser	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Trp	Asn	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg
545					550					555					560
Ala	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	Met	Tyr	Val	Thr
				565					570					575	

ES 2 647 595 T3

Ile	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	Lys	Thr	Met	Asn
			580					585					590		
Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	Ala	Thr	Ile	Asp
		595					600					605			
Thr	Ala	Phe	Thr	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	Thr	Val	Gly	Ala
	610					615					620				
Asp	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Glu	Leu
625					630					635					640
Ile	Pro	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Glu	Ala	Val	Thr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala
				645					650					655	
Gln	Lys	Ala	Val	His	Glu	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr	Asn	Pro	Gly	Gly	Leu
			660					665					670		
Lys	Thr	Asp	Val	Lys	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val
		675					680					685			
Glu	Ser	Leu	Ser	Asp	Glu	Phe	Tyr	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Phe
	690					695					700				
Glu	Ile	Val	Lys	Tyr	Ala	Lys	Gln	Leu	His	Ile	Glu	Pro	Asn	Met	
705					710					715					

<210> 28
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 28

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

290						295						300				
Ser	Arg	Trp	Ser	Asn	Thr	Gln	Tyr	Met	Asn	Met	Trp	Gly	Gly	His	Lys	
305						310					315				320	
Leu	Glu	Phe	Arg	Thr	Ile	Gly	Gly	Thr	Leu	Asn	Thr	Ser	Thr	Gln	Gly	
						325					330				335	
Ser	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Phe	Thr	Ser	Arg	
						340					345				350	
Asp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Gly	Leu	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	
						355									365	
Gln	Pro	Val	Asn	Gly	Val	Pro	Arg	Val	Asp	Phe	His	Trp	Lys	Phe	Val	
						370									380	
Thr	His	Pro	Ile	Ala	Ser	Asp	Asn	Phe	Tyr	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Ala	Gly	
385						390						395			400	
Ile	Gly	Thr	Gln	Leu	Gln	Asp	Ser	Glu	Asn	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	
						405									415	
Thr	Gly	Gln	Pro	Asn	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His	Ile	
						420									430	
Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	His	Val	Lys	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	Trp	Thr	
						435									445	
His	Arg	Ser	Ala	Asp	Arg	Thr	Asn	Thr	Ile	His	Ser	Asp	Ser	Ile	Thr	
						450									460	
Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	His	Thr	Leu	Gln	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	
465						470									480	
Val	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	
						485									495	
Gly	Gly	Pro	Phe	Ala	Phe	Ser	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Trp	Asn	Leu	Ser	
						500									510	
Gln	Arg	Tyr	Arg	Ala	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Arg	
						515									525	
Met	Tyr	Val	Thr	Ile	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Phe	Ala	Gly	Gln	Phe	Asn	
						530									540	
Lys	Thr	Met	Asn	Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gln	Ser	Phe	Ser	Tyr	
545						550									560	
Ala	Thr	Ile	Asp	Thr	Ala	Phe	Thr	Phe	Pro	Thr	Lys	Ala	Ser	Ser	Leu	
						565									575	
Thr	Val	Gly	Ala	Asp	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Val	Asp	
						580									590	
Arg	Phe	Glu	Leu	Ile	Pro	Val										
						595										

<210> 29
 <211> 666
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 29

ES 2 647 595 T3

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

ES 2 647 595 T3

Arg Glu Thr Glu Lys Phe Leu Asn Gln Arg Leu Asn Thr Asp Thr Leu
 130 135 140
 Ala Arg Val Asn Ala Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ala Asn Val Glu Glu
 145 150 155 160
 Phe Asn Arg Gln Val Asp Asn Phe Leu Asn Pro Asn Arg Asn Ala Val
 165 170 175
 Pro Leu Ser Ile Thr Ser Ser Val Asn Thr Met Gln Gln Leu Phe Leu
 180 185 190
 Asn Arg Leu Pro Gln Phe Gln Met Gln Gly Tyr Gln Leu Leu Leu Leu
 195 200 205
 Pro Leu Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Phe Ile Arg Asp
 210 215 220
 Val Ile Leu Asn Ala Asp Glu Trp Gly Ile Ser Ala Ala Thr Leu Arg
 225 230 235 240
 Thr Tyr Gln Asn His Leu Arg Asn Tyr Thr Arg Glu Tyr Ser Asn Tyr
 245 250 255
 Cys Ile Thr Thr Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Thr Arg Leu
 260 265 270
 His Asp Met Leu Glu Phe Arg Thr Tyr Met Phe Leu Asn Val Phe Glu
 275 280 285
 Tyr Val Ser Ile Trp Ser Leu Phe Lys Tyr Gln Ser Leu Leu Val Ser
 290 295 300
 Ser Gly Ala Asn Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Pro Gln Gln Thr Gln
 305 310 315 320
 Ser Phe Thr Ser Gln Asp Trp Pro Phe Leu Tyr Ser Leu Phe Gln Val
 325 330 335
 Asn Ser Asn Tyr Val Leu Asn Gly Phe Ser Gly Ala Arg Leu Thr Gln
 340 345 350
 Thr Phe Pro Asn Ile Val Gly Leu Pro Gly Thr Thr Thr Thr His Ala
 355 360 365
 Leu Leu Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Gly Gly Val Ser Ser Gly Asp
 370 375 380
 Ile Gly Ala Val Phe Asn Gln Asn Phe Ser Cys Ser Thr Phe Leu Pro
 385 390 395 400
 Pro Leu Leu Thr Pro Phe Val Arg Ser Trp Leu Asp Ser Gly Ser Asp
 405 410 415
 Arg Gly Gly Ile Asn Thr Val Thr Asn Trp Gln Thr Glu Ser Phe Glu
 420 425 430
 Thr Thr Leu Gly Leu Arg Ser Gly Ala Phe Thr Ala Arg Gly Asn Ser
 435 440 445
 Asn Tyr Phe Pro Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Val Pro Leu
 450 455 460
 Val Val Arg Asn Glu Asp Leu Arg Arg Pro Leu His Tyr Asn Gln Ile
 465 470 475 480
 Arg Asn Ile Glu Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Leu Arg Ala Tyr
 485 490 495
 Met Val Ser Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Val His Glu
 500 505 510
 Asn Gly Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu Asp Tyr Thr Gly Phe Thr
 515 520 525
 Ile Ser Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn Asn Gln Thr Arg Thr Phe
 530 535 540
 Ile Ser Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln
 545 550 555 560
 Ser Asn Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Leu Arg Gly Asn Gly Asn Ser Tyr
 565 570 575
 Asn Leu Tyr Leu Arg Val Ser Ser Ile Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val
 580 585 590
 Thr Ile Asn Gly Arg Val Tyr Thr Ala Ser Asn Val Asn Thr Thr Thr
 595 600 605
 Asn Asn Asp Gly Val Asn Asp Asn Gly Ala Arg Phe Ser Asp Ile Asn
 610 615 620
 Ile Gly Asn Val Val Ala Ser Asp Asn Thr Asn Val Pro Leu Asp Ile

ES 2 647 595 T3

625					630					635				640	
Asn	Val	Thr	Leu	Asn	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Glu	Leu	Met	Asn	Ile	Met
				645					650					655	
Phe	Val	Pro	Thr	Asn	Ser	Ser	Pro	Leu	Tyr						
			660					665							

- 5 <210> 30
- <211> 631
- <212> PRT
- <213> *Bacillus thuringiensis*
- <400> 30

ES 2 647 595 T3

Met	Asn	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	Gly	Arg	Ala	Thr	Asn	Gly	Asp	Ala	Tyr
1				5					10					15	
Asn	Val	Val	Ala	His	Asp	Pro	Phe	Ser	Phe	Gln	His	Lys	Ser	Leu	Asp
			20					25					30		
Thr	Ile	Gln	Glu	Glu	Trp	Met	Glu	Trp	Lys	Lys	Asp	Asn	His	Ser	Leu
		35					40					45			
Tyr	Val	Asp	Pro	Ile	Val	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Lys
	50					55					60				
Val	Gly	Ser	Leu	Val	Gly	Lys	Arg	Ile	Leu	Ser	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu
65					70					75				80	
Ile	Phe	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Met	Gln	Asp	Ile	Leu	Arg	Glu
				85					90					95	
Thr	Glu	Lys	Phe	Leu	Asn	Gln	Arg	Leu	Asn	Thr	Asp	Thr	Leu	Ala	Arg
			100					105					110		
Val	Asn	Ala	Glu	Leu	Thr	Gly	Leu	Gln	Ala	Asn	Val	Glu	Glu	Phe	Asn
		115					120					125			
Arg	Gln	Val	Asp	Asn	Phe	Leu	Asn	Pro	Asn	Arg	Asn	Ala	Val	Pro	Leu
	130					135					140				
Ser	Ile	Thr	Ser	Ser	Val	Asn	Thr	Met	Gln	Gln	Leu	Phe	Leu	Asn	Arg
145					150					155					160
Leu	Pro	Gln	Phe	Gln	Met	Gln	Gly	Tyr	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu
				165					170					175	
Phe	Ala	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Phe	Ile	Arg	Asp	Val	Ile
			180					185					190		
Leu	Asn	Ala	Asp	Glu	Trp	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala	Thr	Leu	Arg	Thr	Tyr
		195					200					205			
Gln	Asn	His	Leu	Arg	Asn	Tyr	Thr	Arg	Glu	Tyr	Ser	Asn	Tyr	Cys	Ile
	210					215					220				
Thr	Thr	Tyr	Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Gly	Leu	Asn	Thr	Arg	Leu	His	Asp
225					230					235					240
Met	Leu	Glu	Phe	Arg	Thr	Tyr	Met	Phe	Leu	Asn	Val	Phe	Glu	Tyr	Val
				245					250					255	
Ser	Ile	Trp	Ser	Leu	Phe	Lys	Tyr	Gln	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Ser	Gly
			260					265					270		
Ala	Asn	Leu	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Gln	Gln	Thr	Gln	Ser	Phe
		275					280					285			
Thr	Ser	Gln	Asp	Trp	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Asn	Ser
	290					295					300				
Asn	Tyr	Val	Leu	Asn	Gly	Phe	Ser	Gly	Ala	Arg	Leu	Thr	Gln	Thr	Phe
305					310					315					320
Pro	Asn	Ile	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Thr	Thr	His	Ala	Leu	Leu	
				325					330					335	
Ala	Ala	Arg	Val	Asn	Tyr	Ser	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Gly
			340					345					350		
Ala	Val	Phe	Asn	Gln	Asn	Phe	Ser	Cys	Ser	Thr	Phe	Leu	Pro	Pro	Leu
		355					360					365			
Leu	Thr	Pro	Phe	Val	Arg	Ser	Trp	Leu	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Arg	Gly
	370					375					380				
Gly	Ile	Asn	Thr	Val	Thr	Asn	Trp	Gln	Thr	Glu	Ser	Phe	Glu	Thr	Thr
385					390					395					400

ES 2 647 595 T3

Leu Gly Leu Arg Ser Gly Ala Phe Thr Ala Arg Gly Asn Ser Asn Tyr
 405 410 415
 Phe Pro Asp Tyr Phe Ile Arg Asn Ile Ser Gly Val Pro Leu Val Val
 420 425 430
 Arg Asn Glu Asp Leu Arg Arg Pro Leu His Tyr Asn Gln Ile Arg Asn
 435 440 445
 Ile Glu Ser Pro Ser Gly Thr Pro Gly Gly Leu Arg Ala Tyr Met Val
 450 455 460
 Ser Val His Asn Arg Lys Asn Asn Ile Tyr Ala Val His Glu Asn Gly
 465 470 475 480
 Thr Met Ile His Leu Ala Pro Glu Asp Tyr Thr Gly Phe Thr Ile Ser
 485 490 495
 Pro Ile His Ala Thr Gln Val Asn Asn Gln Thr Arg Thr Phe Ile Ser
 500 505 510
 Glu Lys Phe Gly Asn Gln Gly Asp Ser Leu Arg Phe Glu Gln Ser Asn
 515 520 525
 Thr Thr Ala Arg Tyr Thr Leu Arg Gly Asn Gly Asn Ser Tyr Asn Leu
 530 535 540
 Tyr Leu Arg Val Ser Ser Ile Gly Asn Ser Thr Ile Arg Val Thr Ile
 545 550 555 560
 Asn Gly Arg Val Tyr Thr Ala Ser Asn Val Asn Thr Thr Thr Asn Asn
 565 570 575
 Asp Gly Val Asn Asp Asn Gly Ala Arg Phe Ser Asp Ile Asn Ile Gly
 580 585 590
 Asn Val Val Ala Ser Asp Asn Thr Asn Val Pro Leu Asp Ile Asn Val
 595 600 605
 Thr Leu Asn Ser Gly Thr Gln Phe Glu Leu Met Asn Ile Met Phe Val
 610 615 620
 Pro Thr Asn Ser Ser Pro Leu
 625 630

<210> 31
 <211> 1177
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 31

ES 2 647 595 T3

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

ES 2 647 595 T3

				195					200						205			
Arg	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Trp	Gly	Pro	Asp	Ser	Arg			
	210						215					220						
Asp	Trp	Ile	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Val			
225					230					235					240			
Leu	Asp	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ser	Arg	Thr	Tyr	Pro			
				245					250						255			
Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asn	Pro	Val			
			260					265						270				
Leu	Glu	Asp	Phe	Asn	Gly	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Ile	Glu			
		275					280						285					
Gln	Ser	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Thr			
	290					295						300						
Ile	Tyr	Thr	Asp	Ala	His	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Gln			
305					310						315				320			
Ile	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe	Pro			
				325					330						335			
Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Val	Ala			
			340					345						350				
Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg			
		355					360						365					
Ser	Pro	Phe	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Asp			
	370					375						380						
Gly	Thr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ala	Val			
385					390						395				400			
Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln			
				405						410					415			
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His			
			420					425					430					
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile			
		435						440					445					
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Ile	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Phe	Asn	Asn			
	450						455					460						
Ile	Ile	Pro	Ser	Ser	Gln	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr			
465					470						475				480			
Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Val	Val	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly			
				485					490						495			
Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Gly	Gln	Ile	Ser	Thr	Leu	Arg			
			500						505					510				
Val	Asn	Ile	Thr	Ala	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Ile	Arg			
		515						520						525				
Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Gln	Phe	His	Thr	Ser	Ile	Asp	Gly	Arg			
					535								540					
Pro	Ile	Asn	Gln	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Thr	Met	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn			
545					550						555				560			
Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Ala	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Phe	Asn			
				565						570					575			
Phe	Ser	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Ser	Ala	His	Val	Phe	Asn			
			580						585					590				
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Ala	Glu			
		595					600							605				
Val	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val			
		610				615							620					
Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Val			
625					630						635				640			
Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Ser			
				645						650					655			
Asp	Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Gln	Glu	Leu	Ser	Glu	Lys	Val	Lys			
			660						665					670				
His	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Asp	Glu	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asn			
		675					680						685					
Phe	Arg	Gly	Ile	Asn	Arg	Gln	Leu	Asp	Arg	Gly	Trp	Arg	Gly	Ser	Thr			
						695							700					

ES 2 647 595 T3

Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val
 705 710 715 720
 Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln
 725 730 735
 Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg
 740 745 750
 Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr
 755 760 765
 Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp
 770 775 780
 Pro Leu Ser Ala Gln Ser Pro Ile Gly Lys Cys Gly Glu Pro Asn Arg
 785 790 795 800
 Cys Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser Cys Arg
 805 810 815
 Asp Gly Glu Met Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile
 820 825 830
 Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile
 835 840 845
 Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu
 850 855 860
 Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys
 865 870 875 880
 Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu
 885 890 895
 Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe
 900 905 910
 Val Asn Ser Gln Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met
 915 920 925
 Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu
 930 935 940
 Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu
 945 950 955 960
 Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn
 965 970 975
 Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val
 980 985 990
 Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu
 995 1000 1005
 Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys
 1010 1015 1020
 Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr
 1025 1030 1035 1040
 Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu
 1045 1050 1055
 Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Ile Tyr Pro Asn Asn Thr
 1060 1065 1070
 Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Val Asn Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Ala
 1075 1080 1085
 Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asn Glu Ala Pro Ser Val Pro Ala
 1090 1095 1100
 Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Glu Lys Ser Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1105 1110 1115 1120
 Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Leu
 1125 1130 1135
 Pro Val Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp
 1140 1145 1150
 Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp
 1155 1160 1165
 Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1170 1175

<210> 32
<211> 607
<212> PRT
<213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 32

Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys	Leu
1				5					10					15	
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu	Thr	Gly
			20					25					30		
Tyr	Thr	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe	Leu	Leu	Ser
		35					40					45			
Glu	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Val	Asp	Ile	Ile
	50					55					60				
Trp	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala	Phe	Leu	Val	Gln	Ile
65				70					75					80	
Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala
				85					90				95		
Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn	Leu	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ala	Glu
			100					105					110		
Ser	Phe	Arg	Ala	Trp	Glu	Ala	Asp	Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Val
		115					120					125			
Glu	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn	Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala
	130					135					140				
Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val
145					150					155					160
Tyr	Val	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ser
				165						170				175	
Val	Phe	Gly	Gln	Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Ala	Thr	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg
			180					185					190		
Tyr	Asn	Asp	Leu	Thr	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Ala	Val
		195					200					205			
Arg	Trp	Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Trp	Gly	Pro	Asp	Ser	Arg
	210					215					220				
Asp	Trp	Ile	Arg	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Val
225					230					235					240
Leu	Asp	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Ser	Arg	Thr	Tyr	Pro
			245						250					255	
Ile	Arg	Thr	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asn	Pro	Val
			260					265					270		
Leu	Glu	Asp	Phe	Asn	Gly	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Ile	Glu
		275					280					285			
Gln	Ser	Ile	Arg	Ser	Pro	His	Leu	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ser	Ile	Thr
	290					295					300				
Ile	Tyr	Thr	Asp	Ala	His	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Gly	His	Gln
305					310					315					320
Ile	Met	Ala	Ser	Pro	Val	Gly	Phe	Ser	Gly	Pro	Glu	Phe	Thr	Phe	Pro
				325					330					335	
Leu	Tyr	Gly	Thr	Met	Gly	Asn	Ala	Ala	Pro	Gln	Gln	Arg	Ile	Val	Ala
			340					345					350		
Gln	Leu	Gly	Gln	Gly	Val	Tyr	Arg	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg
		355					360					365			
Ser	Pro	Phe	Asn	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Gln	Gln	Leu	Ser	Val	Leu	Asp
	370					375					380				
Gly	Thr	Glu	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Pro	Ser	Ala	Val
385					390					395					400
Tyr	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Val	Asp	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln
				405						410				415	
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Gln	Gly	Phe	Ser	His	Arg	Leu	Ser	His
			420					425					430		
Val	Ser	Met	Phe	Arg	Ser	Gly	Phe	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ser	Ile	Ile
		435					440					445			
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Trp	Ile	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Phe	Asn	Asn
	450					455						460			

ES 2 647 595 T3

Ile	Ile	Pro	Ser	Ser	Gln	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr
465					470					475					480
Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Val	Val	Lys	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly
				485					490						495
Gly	Asp	Ile	Leu	Arg	Arg	Thr	Ser	Pro	Gly	Gln	Ile	Ser	Thr	Leu	Arg
			500					505					510		
Val	Asn	Ile	Thr	Ala	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Ile	Arg
			515				520					525			
Tyr	Ala	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	Gln	Phe	His	Thr	Ser	Ile	Asp	Gly	Arg
	530					535					540				
Pro	Ile	Asn	Gln	Gly	Asn	Phe	Ser	Ala	Thr	Met	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn
545					550					555					560
Leu	Gln	Ser	Gly	Ser	Phe	Arg	Thr	Ala	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Phe	Asn
				565					570						575
Phe	Ser	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Ser	Ala	His	Val	Phe	Asn
			580					585					590		
Ser	Gly	Asn	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Ala	
		595					600					605			

<210> 33
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido dirigido a retículo endoplásmico

10

<400> 33

Lys Asp Glu Leu
 1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
 b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 27 o 28; y
 c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 o 28.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de nucleótidos:
- (a) es una secuencia sintética que ha sido diseñada para expresión en una planta; y/o
 (b) está operativamente unida a un promotor capaz de dirigir la expresión de dicha secuencia de nucleótidos en una célula de la planta.
- 20 3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.
4. El vector de la reivindicación 3, que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
- 25 5. Una célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 3, preferentemente que es una célula huésped bacteriana o una célula de la planta.
6. Una planta transgénica que comprende la célula de la planta huésped de la reivindicación 5, preferentemente en la que dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, calabaza, girasol, tomate, crucíferas, pimiento, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza oleaginosa.
- 30 7. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
8. Un polipéptido recombinante con actividad plaguicida seleccionado del grupo que consiste en:
- 35 a) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, preferentemente que comprende además una secuencia de aminoácidos heteróloga.
- 40 9. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 8.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicha composición:
- 45 (a) se selecciona del grupo que consiste en un polvo, un pulverizado, un aglomerado, un granulado, una aspersión, una emulsión, un coloide y una solución;
 (b) se prepara por desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células bacterianas; o
 (c) comprende de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso de dicho polipéptido.
- 50 11. Un método para controlar una población de plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros o para eliminar una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros, comprendiendo el método el contacto de dicha población o plaga con una cantidad eficaz como plaguicida de un polipéptido de la reivindicación 8.
- 55 12. Un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 5 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
- 60 13. Una planta en cuyo genoma está incorporada establemente una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;
 b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y
 65 c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28,

preferentemente en la que dicha planta es una célula de la planta.

14. Un método para proteger una planta contra una plaga que comprende la expresión en una planta o una célula de la misma de una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;

b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y

c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28, preferentemente, en el que dicha planta produce un polipéptido plaguicida que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, hemípteros, coleópteros, nematodos o dípteros.

15. Un método para aumentar el rendimiento de una planta que comprende el cultivo en un campo de una planta o una semilla de la misma en cuyo genoma está incorporada establemente una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína que tiene actividad plaguicida, en la que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) la secuencia de nucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 3, 8, 13 o 18;

b) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y

c) una secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 27 o 28; y

en el que dicho campo está infestado con una plaga contra la cual dicho polipéptido tiene actividad plaguicida.