



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 893 T2** 2006.07.13

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 654 075 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 893.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP93/01820**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 915 882.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/005771**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.07.1993**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **17.03.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.1995**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 1/20** (2006.01)

C12N 15/32 (2006.01)

C12N 5/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

92402358 **27.08.1992** **EP**

93400949 **09.04.1993** **EP**

(73) Patentinhaber:

Bayer BioScience N.V., Gent, BE

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLÉ, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**LAMBERT, Bart, B-8730 Beernem, BE; JANSSENS,
Stefan, B-9000 Gent, BE; VAN AUDENHOVE,
Katrien, B-9000 Gent, BE; PEFEROEN, Marnix,
B-9850 NEVELE, BE**

(54) Bezeichnung: **BACILLUS THURINGIENSIS UND DESSEN INSEKTIZIDE PROTEINE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft vier neue Stämme von *Bacillus thuringiensis* (den „Stamm BTS02617A“, den „Stamm BTS02618A“, den „Stamm BTS02654B“ und den „Stamm BTS02652E“), die jeweils kristallisierte Proteine (die „BTS02617A-Kristallproteine“, die „BTS02618A-Kristallproteine“, die „BTS02654B-Kristallproteine“ bzw. die „BTS02652E-Kristallproteine“) produzieren, die während der Sporulation in Kristalle (die „BTS02617A-Kristalle“, die „BTS02618A-Kristalle“, die „BTS02654B-Kristalle“ bzw. die „BTS02652E-Kristalle“) verpackt werden. Die Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E wurden gemäß den Bestimmungen des Budapester Vertrags bei den „Belgian Coordinated Collections of Microorganisms – Collection Laboratorium voor Microbiologie Belgium“ „BCCM-LMG“, R. U. G., K. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent hinterlegt.

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Insektizidzusammensetzung mit Wirkung gegen Lepidoptera, die den Stamm BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E als solche oder vorzugsweise die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Kristalle, Kristallproteine oder deren Wirkstoff(e) als aktiven Bestandteil enthält.

[0003] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Gen (das „bTS02618A-Gen“), das in dem Genom der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E vorhanden ist und das ein insektizides Protein (das „BTS02618A-Protoxin“) codiert, das in den BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- und BTS02652E-Kristallen vorkommt. Das BTS02618A-Protoxin ist das Protein, das von den Stämmen BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E produziert wird, bevor es in die entsprechenden BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- und BTS02652E-Kristalle verpackt wird.

[0004] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Toxin (das „BTS02618A-Toxin“), das aus dem BTS02618A-Protoxin (z. B. mittels Trypsinverdau) erhalten werden kann. Das BTS02618A-Toxin ist ein insektizid wirksames Protein, das aus den BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- und BTS02652E-Kristallen, die von dem Stamm BTS02617A, dem Stamm BTS02618A, dem Stamm BTS02654B bzw. dem Stamm BTS02652E produziert werden. Dieses Toxin und sein Protoxin weisen eine starke Wirksamkeit gegen verschiedenste Lepidoptera-Insekten, besonders gegen Noctuidae, insbesondere gegen Spodoptera und *Agrotis* spp., jedoch auch gegen andere wichtige Lepidoptera-Insekten wie Pyralidae, besonders den Maiszünsler, *Ostrinia nubilalis*, und Yponomeutidae, wie *Plutella xylostella*, auf. Dieses neue Charakteristikum des BTS02618A-Prottoxins und -Toxins („(Pro-)Toxin“), also die Kombination der Wirkung gegen unterschiedliche wirtschaftlich wichtige Insektenfamilien der Lepidoptera wie Noctuidae, Yponomeutidae und Pyralidae, bedeutet, dass es sich bei diesem (Pro-)Toxin um eine Verbindung handelt, die sich ideal für die Bekämpfung von verschiedensten Schadinsekten, dadurch dass diese Insekten mit dem (Pro-)Toxin, z. B. durch Spritzen oder durch Exprimieren des bTS02618A-Gens in mit Pflanzen assoziierten Bakterien oder in Pflanzen eignet. Es wird angenommen, dass das BTS02618A-Toxin den kleinsten Teil des BTS02618A-Prottoxins darstellt, der insektizid gegen Lepidoptera wirksam ist.

[0005] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein chimäres Gen, das für die Transformation einer Pflanzenzelle verwendet werden kann und das die folgenden operativ verbundenen DNA-Fragmente enthält:

- 1) einen Teil des bTS02618A-Gens (den „insektizid wirksamen bTS02618A-Gen-Teil“), der einen insektizid wirksamen Abschnitt des BTS02618A-Prottoxins codiert, vorzugsweise einen verkürzten Teil des bTS02618A-Gens (das „verkürzte bTS02618A-Gen“), der nur das BTS02618A-Toxin codiert;
- 2) einen Promotor, der sich für die Transkription des insektizid wirksamen bTS02618A-Genteils in einer Pflanzenzelle eignet; sowie
- 3) geeignete 3'-Ende-Transkriptbildungs- und Polyadenylationssignale für die Expression des insektizid wirksamen bTS02618A-Genteils in einer Pflanzenzelle;

[0006] Dieses chimäre Gen wird im Folgenden im Allgemeinen als „chimäres bTS02618A-Gen“ bezeichnet.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft auch:

- 1) eine Zelle (die „transformierte Pflanzenzelle“) einer Pflanze wie Mais oder Baumwolle, deren Genom mit dem insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil, vorzugsweise dem chimären bTS02618A-Gen, transformiert ist; sowie
- 2) eine Pflanze (die „transformierte Pflanze“), die ausgehend von der transformierten Pflanzenzelle regeneriert wird oder aus den so regenerierten Pflanzen und ihren Samen hergestellt wird und deren Genom den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil vorzugsweise das chimäre bTS02618A-Gen, enthält und die gegen Lepidoptera resistent ist.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin:

- 1) einen Mikroorganismus wie *B. thuringiensis* oder *Pseudomonas* spp., dessen Genom mit dem ganzen bTS02618A-Gen bzw. einem Teil des bTS02618A-Gen transformiert ist; sowie
- 2) eine Mikroorganismenspore, die ein Genom enthält, das mit dem ganzen bTS02618A-Gen bzw. einem Teil des bTS02618A-Gen transformiert ist.

Allgemeiner Stand der Technik

[0009] Bei *B. thuringiensis* („Bt“) handelt es sich um ein grampositives Bakterium, das bei der Sporulation endogene Kristalle bildet. Die Kristalle bestehen aus Proteinen mit einer spezifischen Toxizität gegen Insektenlarven. Die Einteilung dieser Kristallproteine und der entsprechenden Gene erfolgte aufgrund ihrer Struktur und ihres insektiziden Spektrums (Höfte und Whiteley, 1989). Die vier Hauptklassen sind Lepidoptera-spezifische Gene (cryI), Lepidoptera- und Dipteraspezifische Gene (cryII), Coleoptera-spezifische Gene (cryIII) und Diptera-spezifische Gene (cryIV).

[0010] Die Tatsache, dass traditionelle Submersfermentationstechniken zur Produktion von Bt-Sporen im großen Maßstab verwendet werden können, macht Bt-Bakterien zu einer kommerziell attraktiven Quelle für insektizide Zusammensetzungen.

[0011] Es wurden daher Genfragmente aus manchen Bt-Stämmen, die insektizide Proteine codieren, identifiziert und in Pflanzengenome integriert, um die Pflanzen insektenresistent zu machen. Die Expression von solchen Bt-Genfragmenten in Pflanzen ist jedoch kein einfacher Vorgang. Für die optimale Expression eines insektiziden Proteins in Pflanzenzellen wurde gefunden, dass es nötig ist, jedes Bt-Genfragment gentechnisch spezifisch zu verändern, sodass es einen Teil eines Bt-Protoxins codiert, das eine wesentliche Toxizität gegen die Zielinsekten beibehält (Europäische Patentanmeldung („EPA“) 86/300,291.1 und 88/402,115.5; US-Patentanmeldung 821,582, eingereicht am 22. Januar 1986).

Kurze Darstellung der Erfindung

[0012] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden vier neue Bt-Stämme, nämlich die Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E, bereitgestellt. Die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- und BTS02652E-Kristalle und -Kristallproteine, das BTS02618A-Protoxin und -Toxin, das von den Stämmen während der Sporulation produziert wird, und insektizid wirksame Abschnitte des BTS02618A-Protoxins, sowie Äquivalente dieser Kristallproteine, dieses Protoxins, dieses Toxins und dieser insektizid wirksamen Protoxinabschnitte, in denen manche Aminosäuren entfernt, ersetzt oder hinzugefügt wurden, ohne die insektizide Wirksamkeit des Proteins wesentlich zu beeinflussen, weisen jeweils eine insektizide Wirksamkeit auf und können daher zu insektiziden Zusammensetzungen gegen Lepidoptera im Allgemeinen und besonders gegen Noctuidae, wie *Agrotis* spp. (Erdeulen wie *Agrotis ipsilon*), *Mamestra* spp. (z. B. die Kohlschabe, *Mamestra brassica*) und *Spodoptera* spp. (Heerwurm-Arten wie *Spodoptera exigua*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis* und *Spodoptera litura*) gegen Pyralidae (z. B. den Maiszünsler, *Ostrinia nubilalis*) und Yponomeutidae (wie *Plutella xylostella*), die wichtige Schädlinge von verschiedenen ökonomisch wichtigen Kulturpflanzen wie Mais, Baumwolle und vielen Gemüsen wie Kohlgewächsen sind, formuliert werden.

[0013] Ebenfalls erfindungsgemäß wird ein Pflanzenzellgenom mit dem insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil, vorzugsweise dem verkürzten bTS02618A-Gen, oder einem Äquivalent davon wie einem modifizierten synthetischen bTS02618A-Gen transformiert. Diese Transformation wird vorzugsweise mit dem chimären bTS02618A-Gen durchgeführt. Die erhaltene transformierte Pflanzenzelle kann zur Herstellung von transformierten Pflanzen, Samen von transformierten Pflanzen und Pflanzenzellkulturen, die im Wesentlichen aus den transformierten Zellen bestehen, verwendet werden. Die transformierten Zellen in manchen oder allen Geweben der transformierten Pflanzen 1) enthalten den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil als stabiles Insert in ihr Genom sowie 2) exprimieren den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil dadurch, dass sie einen insektizid wirksamen Abschnitt seines bTS02618A-Protoxins, vorzugsweise sein BTS02618A-Toxin, produzieren, wodurch die Pflanze gegen Lepidoptera resistent wird. Die erfindungsgemäßen transformierten Pflanzenzellen können auch zur Herstellung, für die Gewinnung, von solchen insektiziden Bt-Proteinen verwendet werden.

[0014] Weiterhin wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein Verfahren bereitgestellt, mit dem eine Pflanze resistent gegen Lepidoptera gemacht wird, dadurch, dass man das Pflanzenzellgenom mit dem insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil, vorzugsweise dem verkürzten bTS02618A-Gen, oder einem Äquivalent davon transformiert. Diesbezüglich wird die Pflanzenzelle vorzugsweise mit dem chimären bTS02618A-Gen transfor-

miert.

[0015] Weiterhin werden erfindungsgemäß das BTS02618A-Protoxin, die insektizid wirksamen Abschnitte solch eines Protoxins und das BTS02618A-Toxin sowie funktionelle Teile des BTS02618A-Toxins, sowie das bTS02618A-Gen, der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil, das verkürzte bTS02618A-Gen und das chimäre bTS02618A-Gen, sowie deren Äquivalente bereitgestellt, wobei solche Äquivalente äquivalente DNAs sind, die das BTS02618A-(Pro-)Toxin codieren, wobei die Codon-Verwendung der codierenden Sequenz so modifiziert wurde, dass sie von einer Pflanze bevorzugt wird, und äquivalente DNAs, die ein Protein mit der insektiziden Wirksamkeit des BTS02618A-Proteins codieren, die unter stringenten Bedingungen mit der DNA, die das BTS02618A-Protoxin oder -Toxin codiert, hybridisieren.

[0016] Ebenfalls erfindungsgemäß wird eine DNA-Sequenz, und zwar entweder eine natürliche oder künstliche DNA-Sequenz, die das BTS02618A-Protoxin oder insektizid wirksame Teile davon, wie das Toxin, codiert, bereitgestellt.

[0017] Ebenfalls erfindungsgemäß werden eine insektizide Zusammensetzung gegen Lepidoptera, besonders Noctuidae, Pyralidae und Yponomeutidae, und ein Verfahren zur Bekämpfung von Lepidoptera, besonders Noctuidae, Pyralidae und Yponomeutidae, mit der insektiziden Zusammensetzung bereitgestellt, wobei die insektizide Zusammensetzung den Stamm BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E, die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Kristalle und/oder -Kristallproteine oder das BTS02618A-Protoxin, -Toxin und/oder insektizid wirksame Protoxinabschnitte oder ihre Äquivalente, wobei solche Äquivalente Äquivalente des BTS02618A-Proteins sind, bei denen manche Aminosäuren entfernt, ersetzt oder hinzugefügt wurden, ohne die insektizide Wirksamkeit des Proteins wesentlich zu beeinflussen, enthält.

Genauere Beschreibung der Erfindung

[0018] Das BTS02618A-Protoxin der Erfindung kann auf traditionelle Weise aus dem am 2. Juli 1992 beim BCCM-LMG mit der Hinterlegungsnummer LMG P-12592 hinterlegten Stamm BTS02617A, aus dem am 2. Juli 1992 beim BCCM-LMG mit der Hinterlegungsnummer LMG P-12593 hinterlegten Stamm BTS02618A, aus dem am 2. Juli 1992 beim BCCM-LMG mit der Hinterlegungsnummer LMG P-12594 hinterlegten Stamm BTS02654B oder aus dem am 1. März 1993 beim BCCM-LMG mit der Hinterlegungsnummer LMG P-13493 hinterlegten Stamm BTS02652E isoliert werden. So können zum Beispiel die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Kristalle aus sporulierten Kulturen ihres jeweiligen Stamms isoliert werden (Mahillon und Delcour, 1984) und das BTS02618A-Protoxin kann dann nach dem Verfahren von Höfte et al. (1986) aus den Kristallen isoliert werden. Mit den Protoxinen können monoklonale oder polyklonale Antikörper, die spezifisch für das Protoxin sind, auf traditionelle Weise hergestellt werden (Höfte et al. 1988). Das BTS02618A-Toxin kann durch Proteaseverdau (z. B. Trypsinverdau) des BTS02618A-Protoxins erhalten werden.

[0019] Das bTS02618A-Gen kann auf traditionelle Weise isoliert werden. Das bTS02618A-Gen kann mittels der in der am 22. Januar 1986 eingereichten US-Patentanmeldung 821,582 und in der EPA 86/300,291.1 und 88/402,115.5 (die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden) beschriebenen Vorgehensweise in dem Stamm BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E identifiziert werden. Das bTS02618A-Gen wurde folgendermaßen identifiziert: Verdau von Gesamt-DNA aus einem der genannten Stämme mit Restriktionsenzymen; Größentrennung der so hergestellten DNA-Fragmente in DNA-Fractionen von 5 bis 10 KB; Ligation dieser Fractionen mit Kloniervektoren; Durchmustern der mit den Kloniervektoren transformierten E. coli mit einer DNA-Sonde, die aus einer Region des cryIG-Gens konstruiert wurde (Smulevitch et al., 1991; Gleave et al., 1992).

[0020] Der Begriff „bTS02618A-Gen“ beinhaltet im vorliegenden Zusammenhang eine DNA-Sequenz, die das BTS02618A-Protoxin oder -Toxin oder funktionell äquivalente Varianten davon codiert. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes können manche Aminosäurecodons durch andere ersetzt werden, ohne dass die Aminosäuresequenz des Proteins geändert wird. Weiterhin können manche Aminosäuren durch andere äquivalente Aminosäuren ersetzt werden, ohne die insektizide Wirksamkeit des Proteins wesentlich zu verändern. Veränderungen in Bezug auf die Aminosäurezusammensetzung in Regionen des Moleküls, die sich von denjenigen, die für Bindung und Toxizität verantwortlich sind, unterscheiden, verursachen auch weniger wahrscheinlich einen Unterschied in Bezug auf die insektizide Wirksamkeit des Proteins. Solche Äquivalente des Gens beinhalten DNA-Sequenzen, die mit der DNA-Sequenz des BTS02618A-Toxins oder -Protoxins der SEQ ID. Nr. 4 hybridisieren und ein Protein mit den gleichen insektiziden Eigenschaften wie das erfindungsgemäße

BTS02618A-(Pro-)Toxin codieren. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Hybridisierung“ traditionelle Hybridisierungsbedingungen, am stärksten bevorzugt stringente Hybridisierungsbedingungen.

[0021] Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Begriff „funktionelle Teile des BTS02618A-Toxins“ jegliche(n) Teil(e) oder Domäne(n) des Toxins mit einer spezifischen Struktur, der die auf ein anderes (Bt-)Protein übertragen werden kann/können, um ein neues Hybridprotein mit mindestens einer funktionellen Eigenschaft (z. B. den Bindungs- und/oder Toxizitätseigenschaften) des BTS02618A-Toxins bereitzustellen (Ge et al., 1991). Solche Teile können ein wesentliches Merkmal des Hybrid-Bt-Proteins mit den Bindungs- und/oder Toxizitätseigenschaften des BTS02618A-Proteins bilden. Solch ein Hybridprotein kann über einen erweiterten Wirtsbereich oder eine verbesserte Toxizität verfügen und/oder kann in einer Strategie zur Verhinderung der Entwicklung einer Resistenz von Insekten verwendet werden (Europäische Patentschrift („EP“) 408 403; Visser et al., 1993).

[0022] Die aus Gesamt-DNA des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E hergestellten 5- bis 10-KB-Fragmente können jedoch auch in geeignete Expressionsvektoren ligiert und in *E. coli* transformiert werden, und die Klone können anschließend nach traditionellen Kolonie-Immunsondierungsmethoden (French et al., 1986) mit monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern, die gegen das BTS02618A-Toxin erzeugt wurden, auf Expression des Toxins durchmustert werden.

[0023] Die aus Gesamt-DNA des Stamms BTS02617R, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E hergestellten 5- bis 10-KB-Fragmente können auch in geeignete Bt-Zwischenvektoren (Lereclus et al., 1992) ligiert und in eine Kristallminus-Bt-Mutante transformiert werden. Die Klone werden dann auf Produktion von Kristallen (Nachweis unter dem Mikroskop) oder Kristallproteinen (Nachweis mittels SDS-PAGE) durchmustert.

[0024] Das so identifizierte bTS02618A-Gen wurde auf traditionelle Weise (Maxam und Gilbert, 1980) sequenziert, wodurch man zur DNA-Sequenz gelangte. Durch Hybridisierung in Southern-Blots und Sequenzvergleich wurde gezeigt, dass sich dieses Gen von zuvor beschriebenen Genen, die Protoxine und Toxine mit Aktivität gegen Lepidoptera codieren, unterscheidet (Höfte und Whiteley, 1989).

[0025] Ein insektizid wirksamer Teil des bTS02618A-Gens, der für einen insektizid wirksamen Abschnitt seines Protoxins codiert, und ein verkürzter Teil des Gens, der nur sein Toxin codiert, können auf traditionelle Weise nach Sequenzanalyse des Gens hergestellt werden. Die Aminosäuresequenz des BTS02618A-Protoxins und -Toxins wurde aus der DNA-Sequenz des bTS02618A-Gens und des verkürzten bTS02618A-Gens bestimmt. Unter „einem insektizid wirksamen Teil“ oder „einem Teil“ des bTS02618A-Gens versteht man eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid codiert, das weniger Aminosäuren als das BTS02618A-Protoxin aufweist, jedoch noch toxisch für Lepidoptera ist.

[0026] Um das ganze bTS02618A-Gen oder einen insektizid wirksamen Teil davon, oder ein äquivalentes Gen, in *E. coli*, in anderen Bt-Stämmen und in Pflanzen zu exprimieren, können geeignete Restriktionsstellen eingeführt werden, die jedes Gen bzw. jeden Genteil flankieren. Dies kann mittels gut bekannter Vorgehensweisen durch ortsgerichtete Mutagenese erfolgen (Stanssens et al., 1989; White et al., 1989). Für eine verbesserte Expression in Pflanzen kann es bevorzugt sein, die Codonverwendung des bTS02618A-Gens oder des insektizid wirksamen bTS02618A-Genteils zu modifizieren und so ein(en) äquivalentes/en, modifiziertes/en oder künstliches/en Gen bzw. Genteil gemäß den PCT-Veröffentlichungen WO 91/16432 und WO 93/09218; EP 0,358,962 und EP 0,359,472 zu bilden. Zur Erzielung einer verbesserten Expression in monokotylen Pflanzen wie Mais kann dem chimären bTS02618A-Gen auch ein Monokotyledonen-Intron hinzugefügt werden, und die DNA-Sequenz des bTS02618A-Genteils kann auf translationell neutrale Weise weiter dahingehend verändert werden, um möglicherweise hemmend wirkende DNA-Sequenzen, die in dem Genteil vorhanden sind, mittels ortsgerichteter Introninsertion und/oder durch Einführung von Veränderungen in Bezug auf die Codonverwendung, z. B. Anpassung der Codonverwendung auf diejenige, die von der jeweiligen Pflanze am stärksten bevorzugt ist (Murray et al., 1989), ohne die codierte Aminosäuresequenz wesentlich zu verändern, zu modifizieren.

[0027] Der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil oder sein Äquivalent, vorzugsweise das chimäre bTS02618A-Gen, der einen insektizid wirksamen Abschnitt des BTS02618A-Protoxins codiert, kann auf traditionelle Weise stabil in das Kerngenom einer einzelnen Pflanzenzelle eingeschleust werden und die so transformierte Pflanzenzelle kann auf traditionelle Weise zur Herstellung einer transformierten Pflanze, die insektenresistent ist, verwendet werden. Diesbezüglich kann für die Transformation der Pflanzenzelle ein entwaffnetes Ti-plasmid, das den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil enthält, in *Agrobacterium tumefaciens* verwendet werden, und eine transformierte Pflanze kann anschließend unter Verwendung der zum Beispiel in

EP 0,116,718, EP 0,270,822, PCT-Veröffentlichung WO 84/02,913 und Europäische Patentanmeldung („EPA“) 87/400,544.0 (die ebenfalls hiermit durch Bezugnahme aufgenommen sind) sowie bei Gould et al. (1991) beschriebenen Verfahren aus der transformierten Pflanzenzelle regeneriert werden. Bevorzugte Ti-plasmid-Vektoren enthalten jeweils den insektizid wirksamen bTS02618A-Genabschnitt zwischen den Border-Sequenzen oder zumindest auf der linken Seite der rechten Border-Sequenz der T-DNA des Ti-plasmids. Natürlich können für die Transformation der Pflanzenzelle andere Arten von Vektoren verwendet werden, wobei man Verfahren wie den direkten Gentransfer (wie zum Beispiel in EP 0,233,247 beschrieben), die durch Pollen vermittelte Transformation (wie zum Beispiel in EP 0,270,356, PCT-Veröffentlichung WO 85/01856 und US-Patent 4,684,611 beschrieben), die durch Pflanzen-RNA-Viren vermittelte Transformation (wie zum Beispiel in EP 0,067,533 und US-Patent 4,407,956 beschrieben), die durch Liposomen vermittelte Transformation (wie zum Beispiel in US-Patent 4,536,475 beschrieben) und andere Verfahren, wie die in jüngster Zeit beschriebenen Verfahren für die Transformation gewisser Maislinien (Fromm et al., 1990; Gordon-Kamm et al., 1990) und Reislinien (Shimamoto et al., 1989; Datta et al., 1990) beschriebenen Verfahren und das in jüngster Zeit beschriebene Verfahren für die Transformation von monokotylen Pflanzen im Allgemeinen (PCT-Veröffentlichung WO 92/09696) verwendet.

[0028] Mit der erhaltenen transformierten Pflanze kann man in einem traditionellen Pflanzenzüchtungsschema mehr transformierte Pflanzen mit den gleichen Eigenschaften herstellen oder den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil in andere Sorten der gleichen Pflanzenart bzw. von verwandten Pflanzenarten einschleusen. Samen, die von den transformierten Pflanzen erhalten werden, enthalten den insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil als stabiles Insert im Genom. Zellen der transformierten Pflanze können auf traditionelle Weise kultiviert werden, und so den insektizid wirksamen Abschnitt des bTS02618A-Protoxins, insbesondere das bTS02618A-Toxin, zu produzieren, das für die Verwendung in traditionellen Insektizidzusammensetzungen gegen Lepidoptera gewonnen werden kann (US-Patentanmeldung 821,582; EPA 86/300291.1).

[0029] Der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil, vorzugsweise das verkürzte bTS02618A-Gen, wird so in ein Pflanzenzellgenom eingeschleust, dass das eingeschleuste Gen stromabwärts (also in 3'-Richtungen) von einem Promotor sowie unter der Kontrolle eines Promotors, der die Expression des Genteils in der Pflanzenzelle steuern kann, ist. Dies wird vorzugsweise dadurch erzielt, dass man das chimäre bTS02618A-Gen in das Pflanzenzellgenom einschleust. Zu bevorzugten Promotoren zählen: die starken konstitutiven 35S-Promotoren (die „35S-Promotoren“) des Blumenkohlmosaikvirus der Isolate CM 1841 (Gardner et al., 1981), Cabb-S (Franck et al., 1980) und CabbB-JI (Hull und Howell, 1987); sowie der TR1'-Promotor und der TR2'-Promotor (der „der TR1'-Promotor“ bzw. „TR2'-Promotor“), die die Expression der Gene 1' bzw. 2' der T-DNA vorantreiben (Velten et al., 1984). Es kann jedoch auch ein Promotor verwendet werden, der nicht konstitutiv ist, sondern vielmehr für ein oder mehrere Gewebe oder Organe der Pflanze spezifisch ist (z. B. für Blätter und/oder Wurzeln), wodurch der eingeschleuste bTS02618A-Genteil nur in Zellen des bzw. der spezifischen Gewebe(s) oder Organ(e) exprimiert wird. So könnte der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil dadurch selektiv in den Blättern einer Pflanze (z. B. Mais, Baumwolle) exprimiert werden, dass man den insektizid wirksamen Genteil unter die Kontrolle eines lichtinduzierbaren Promotors, wie des Promotors des Gens für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphatcarboxylase, der Pflanze selbst oder einer anderen Pflanze, wie Erbse, wie in US-Patentanmeldung 821,582 und EPA 86/300,291.1 beschrieben, stellt.

[0030] Eine weitere Möglichkeit besteht darin, einen Promotor zu verwenden, dessen Expression induzierbar ist (z. B. durch Temperatur oder chemische Faktoren).

[0031] Der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil wird so in das Pflanzengenom eingeschleust, dass der eingeschleuste Genteil stromaufwärts (also in 5'-Richtung) von geeigneten Transkriptionsregulationssignalen am 3'-Ende (also Transkriptbildungs- und Polyadenylationssignalen) liegt. Dies wird vorzugsweise dadurch erzielt, dass man das chimäre bTS02618A-Gen in das Pflanzenzellgenom einschleust. Zu bevorzugten Polyadenylations- und Transkriptbildungssignalen zählen diejenigen des Octopinsynthasegens (Gielen et al., 1984) und des T-DNA-Gens 7 (Velten und Schell, 1985), die als 3'-untranslatierte DNA-Sequenzen in transformierten Pflanzenzellen agieren.

[0032] Der insektizid wirksame bTS02618A-Genteil kann gewünschtenfalls in das Pflanzengenom als Hybridgen (EPA 86/300,291.1; Vaeck et al., 1987) unter der Kontrolle des gleichen Promotors wie ein selektierbares Markergen, wie das neo-Gen (EP 0,242,236), das Kanamycinresistenz codiert, eingeschleust werden, so dass die Pflanze ein Fusionsprotein exprimiert.

[0033] Das ganze bTS02618A-Gen oder ein Teil davon, das bzw. der ein Protein gegen Lepidoptera codiert, kann auch für die Transformation von anderen Bakterien, wie ein *B. thuringiensis* mit insektizider Wirksamkeit

gegen Lepidoptera oder Coleoptera, transformieren. So kann ein transformierter Bt-Stamm hergestellt werden, der sich für die Bekämpfung von verschiedensten Lepidoptera- und Coleoptera-Schadinsekten oder für die Bekämpfung von weiteren Lepidoptera-Schadinsekten eignet. Die Transformation von Bakterien mit dem ganzen bTS02618A-Gen oder einem Teil davon, das bzw. der in ein geeignetes Klonierungskonstrukt eingebaut ist, kann auf traditionelle Weise erfolgen, vorzugsweise unter Verwendung von traditionellen Elektroporationstechniken wie bei Mahillon et al. (1989) und in PCT-Patent-Schrift WO 90/06999 beschrieben.

[0034] Der Stamm BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E kann auch mit dem ganzen oder einem insektizid wirksamen Teil von einem oder mehreren fremden Bt-Genen transformiert werden, zum Beispiel dem bt18-Gen (EP 0,358,557) oder einem anderen Bt-Gen, das für ein Protein gegen Lepidoptera codiert; und dem bt109P-Gen (PCT-Schrift WO 91/16433), das für ein Protein gegen Coleoptera codiert. So kann ein transformierter Bt-Stamm erzeugt werden, der sich für die Bekämpfung von noch mehr Schadinsekten (z. B. Coleoptera und/oder weiteren Lepidoptera) eignet.

[0035] Die Transformation des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E mit dem ganzen Fremd-Bt-Gen oder einem Teil eines Fremd-Bt-Gens, das bzw. der in ein traditionelles Klonierkonstrukt eingebaut ist, kann auf gut bekannte Weise, vorzugsweise mit traditionellen Elektroporationstechniken (Chassy et al., 1988) oder anderen Verfahren, z. B. wie von Lereclus et al. (1992) beschrieben, durchgeführt werden.

[0036] Jeder der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E kann für eine hohe Zellernte auf traditionelle Weise fermentiert werden (Dulmage, 1981; Bernhard und Utz, 1993). Unter geeigneten Bedingungen, die gut bekannt sind (Dulmage, 1981), sporulieren die Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E jeweils unter Bildung von Kristallproteinen, die das BTS02168A-Protoxin in hoher Ausbeute enthalten.

[0037] Eine erfindungsgemäße insektizide Zusammensetzung, insbesondere eine Zusammensetzung gegen Lepidoptera kann auf traditionelle Weise unter Verwendung des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E oder vorzugsweise ihrer jeweiligen Kristalle, Kristallproteine oder des BTS02168A-Protoxins, -Toxins oder dessen insektizid wirksamen Protoxinabschnitts als Wirkstoff gemeinsam mit geeigneten Trägern, Verdünnungsmitteln, Emulgatoren und/oder Dispergiemitteln (z. B. wie von Bernhard und Utz, 1993 beschrieben) formuliert werden. Diese Insektizidzusammensetzung kann als Spritzpulver, Pellets, Granulat oder Staub oder als flüssige Formulierung mit wässrigen oder nichtwässrigen Lösungsmitteln als Schaum, Gel, Suspension, Konzentrat usw. formuliert werden. Die Konzentration der BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Stämme, -Kristalls, -Kristallproteins oder des BTS02618A-Protoxins, -Toxins oder dessen insektizid wirksame Protoxinabschnitte in solch einer Zusammensetzung hängen von der Art der Formulierung und dem Verwendungszweck ab. Im Allgemeinen kann eine Insektizidzusammensetzung der vorliegenden Erfindung dazu verwendet werden, um ein Feld mit jeder Ausbringung der Zusammensetzung 2 bis 4 Wochen gegen Lepidoptera zu schützen. Für eine längere Schutzdauer (z. B. eine ganze Wachstumsperiode) sollten zusätzliche Mengen der Zusammensetzung von Zeit zu Zeit ausgebracht werden.

[0038] Ein erfindungsgemäßes Verfahren für die Bekämpfung von Insekten, insbesondere Lepidoptera, umfasst vorzugsweise, dass man einen zu schützenden Standort (Bereich) mit einer insektiziden Menge des/der BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Stands, -Sporen, Kristalle -Kristallproteine oder des BTS02168A-Protoxins, -Toxins oder dessen insektizid wirksamen Protoxinabschnitts, vorzugsweise des BTS02168A-Toxins, behandelt (z. B. spritzt). Der zu schützende Standort kann zum Beispiel den Lebensraum der Schadinsekten oder wachsendes Pflanzenmaterial oder einen Ort, an dem Pflanzenmaterial angebaut werden soll, beinhalten.

[0039] Zur Gewinnung des BTS02618A-Protoxins oder -Toxins können Zellen des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E auf traditionelle Art auf einem geeigneten Kulturmedium gezüchtet und dann auf geeignete Weise, wie durch Enzymabbau oder Detergentien oder dergleichen lysiert werden. Das Protoxin kann anschließend nach Standardmethoden wie Chromatographie, Extraktion, Elektrophorese oder dergleichen abgetrennt und gereinigt werden. Das Toxin kann dann durch Trypsinverdau des Protoxins gewonnen werden.

[0040] Die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Zellen können auch geerntet und dann intakt, und zwar lebend oder tot, vorzugsweise getrocknet, auf den zu schützenden Standort aufgebracht werden. Diesbezüglich wird bevorzugt, dass ein gereinigter BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Stamm (lebend oder tot) verwendet wird, insbesondere eine Zellmasse, die 90,0 bis 99,9% des

BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Stammes ist.

[0041] Die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Zellen, -Kristalle oder -Kristallproteine oder das BTS02618A-Protoxin, -Toxin oder dessen insektizid wirksamer Protoxinabschnitt können in einer insektiziden Zusammensetzung auf verschiedene Art und Weise mit einer beliebigen Anzahl traditioneller Zusatzmittel, naß oder trocken, je nach Verwendungszweck formuliert werden. Zusatzstoffe können Netzmittel, Detergentien, Stabilisatoren, Haftmittel, Spreizmittel und Streckmittel beinhalten. Beispiele für solch eine Zusammensetzung beinhalten Pasten, Stäubemittel, Spritzpulver, Granulate, Köder und Aerosol-Sprays. Gemeinsam mit den BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Zellen, -Kristallen oder -Kristallproteinen oder dem BTS02618A-Protoxin, -Toxin oder dessen insektizid wirksamen Protoxinabschnitten können auch andere Bt-Zellen, -Kristalle, -Kristallproteine, -Protoxine, -Toxine oder insektizid wirksame BTS02618A-Protoxinabschnitte und andere Insektizide, sowie Fungizide, Biozide, Herbizide und Dünger verwendet werden, um zusätzliche Vorteile oder Nutzen zu erzielen. Solch eine insektizide Zusammensetzung kann auf traditionelle Weise hergestellt worden, und die Menge an verwendeten BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Zellen, -Kristallen oder -Kristallproteinen oder des BTS02618A-Protoxins, -Toxins oder insektizid wirksamen BTS02618A-Protoxinabschnitts hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie dem zu bekämpfenden Schadinsekt, der verwendeten Zusammensetzung, der Natur des Orts, auf den die Zusammensetzung aufgebracht werden soll, sowie den vorherrschenden Wetterbedingungen. Im Allgemeinen wird die Konzentration des BTS02618A-Protoxins, der insektizid wirksamen BTS02618A-Protoxinabschnitte oder des BTS02618A-Toxins mindestens ungefähr 0,1 Gew.-% der Formulierung bis ungefähr 100 Gew.-% der Formulierung, öfter ungefähr 0,15 Gew.-% bis ungefähr 0,8 Gew.-% der Formulierung, betragen.

[0042] In der Praxis kann manchen Insekten das BTS02618A-Protoxin, -Toxin, der insektizid wirksame BTS02618A-Protoxinabschnitt oder Mischungen davon an dem geschützten Ort verabreicht werden, also an einem Ort, wo solch ein Protoxin, Toxin und/oder insektizid wirksamer Protoxinabschnitt aufgebracht worden ist. Manchen Insekten können jedoch intakte, lebende Zellen des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E oder der Transformanten verabreicht werden, so dass die Insekten einen Teil des Protoxins des Stamms nahrungsmäßig aufnehmen und absterben oder geschädigt werden.

[0043] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Die in den Beispielen erwähnte Abbildung und Sequenzbeschreibung lautet:

Abb. 1

[0044] Southern-Blot-Analyse von mit Alul verdauter Gesamt-DNA des BTS02618A-Stamms HD 127 (Bahn 1), des Stamms BTS02618A (Bahn 2), des Bt-Stamms BTS02459 (der cryIA(c), 81k, cryIC und cryIE enthält, Bahn 3) und des Bt-Stamms BTS02480E (der die gleichen Gene wie HD-127 enthält, Bahn 4) mit einer Mischung von DNA-Sonden für cryI-Kristallproteingene, darunter auch die cryIG-Sonde (SEQ ID Nr. 1). Jede Bande entspricht einem bestimmten Kristallproteingenen. Mit diesen Sonden stellt sich heraus, dass der Stamm BTS02618A das cryIA(b)-Gen und ein neues Gen, nämlich das bTS02618A-Gen, das mittels eines ungefähr 530 Bp Alul-Fragments, das mit der cryIG-Sonde von SEQ ID Nr. 1 hybridisiert, identifiziert wird, enthält. Die Bezeichnungen der anerkannten cryI-Gene sowie die Größe von manchen Fragmenten sind angegeben. Das bTS02618A-Gen ist durch drei Sternchen erkenntlich gemacht; „?“ bedeutet ein unbekanntes Genfragment.

Sequenzbeschreibung

[0045] SEQ ID Nr. 1 – Nukleotidsequenz der für die Isolation des bTS02618A-Gens verwendeten DNA-Sonde. Diese Sonde leitet sich von einem Teil der cryIG-DNA-Sequenz ab und ist zu den Nukleotiden 2732–2750 der von Smulevitch et al. (1991) beschriebenen DNA-Sequenz komplementär.

[0046] SEQ ID Nr. 2 – Die in 5'-Richtung gelegene Nukleotidteilsequenz des bTS02618A-Gens, die das mutmaßliche Translationsinitiationscodon in Nukleotidposition 195–197 umfasst.

[0047] SEQ ID Nr. 3 – Die in 3'-Richtung gelegene Nukleotidteilsequenz des bTS02618A-Gens (N: unbekanntes Nukleotid), die das mutmaßliche Translationsstopcodon in Nukleotidposition 1146–1148 umfasst.

[0048] SEQ ID Nr. 4 – Nukleotidteilsequenz des bTS02618A-Gens und translatierte Aminosäuresequenz des BTS02618A-Protoxins. Das offene Leseraster des Protoxins erstreckt sich von Nukleotid 668 bis Nukleotid 4141. Das Translationsinitiationscodon liegt in Nukleotidposition 668–670, das Translationsstopcodon in Nukleotidposition 4139–4141.

[0049] Falls in den Beispielen nicht anders erwähnt, werden alle Vorgehensweisen für die Herstellung und Manipulation von rekombinanter DNA nach den in Sambrook et al. beschriebenen Standardvorgehensweisen durchgeführt.

[0050] Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989).

Beispiel 1: Charakterisierung der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E

[0051] Der Stamm BTS02617A, BTS02618A und BTS02654B wurde aus Getreidestaub, der in Cadlan, Provinz Bicol, Philippinen, entnommen wurde, isoliert und bei der BCCM-LMG am 2. Juli 1992 mit den Hinterlegungsnummern LMG P-12592, LMG P-12593 bzw. LMG P-12594 hinterlegt. Der Stamm BTS02652E wurde ebenfalls von Getreidestaub von den Philippinen isoliert und am 1. März 1993 bei der BCCM-LMG mit den Hinterlegungsnummern LMG P-13493 hinterlegt.

[0052] Jeder Stamm kann aus traditionellen Standardmedien, vorzugsweise T₃-Medium (Trypton 3 g/l, Tryptose 2 g/l, Hefeextrakt 1,5 g/l, 5 mg MnCl₂, 0,05 M Na₂PO₄, pH 6,8 und 1,5% Agar), vorzugsweise bei 28°C, gezüchtet werden. Für die Langzeitlagerung wird bevorzugt, dass gleiche Volumina einer Sporen-Kristallsuspension und 50%igem Glycerin vermischt werden und diese Mischung bei -70°C aufbewahrt oder als Sporen-Kristallsuspension lyophilisiert wird. Für die Sporulation bevorzugt man 48 Stunden Wachstum auf T₃-Medium bei 28°C und anschließend Lagerung bei 4°C. Während der vegetativen Phase kann jeder Stamm auch unter fakultativ-anaeroben Bedingungen gezüchtet werden, eine Sporulation findet jedoch nur unter aeroben Bedingungen statt.

[0053] Die Sterilisation jedes Stamms erfolgt durch 20 minütige Behandlung im Autoklaven bei 120°C (1 Bar Druck). Durch solch eine Behandlung werden die Sporen und die BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- und BTS02652E-Protoxine vollständig inaktiviert. Die Sporen werden auch durch UV-Strahlung (254 nm) inaktiviert.

[0054] Nach eintägiger Kultivierung auf Nutrient-Agar („NA“, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) bilden die Kolonien jedes der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E opake weiße Kolonien mit unregelmäßigen Rändern. Zellen von jedem Stamm (grampositive Stäbchen mit einer Größe von 1,7 × 5,6–7,7 µm) sporulieren nach 48 Stunden Kultur auf T₃-Agar bei 28°C. Die während der Sporulation produzierten Kristallproteine werden in Kristalle der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E verpackt. Außergewöhnlich ist, dass nach der Sporulation das Kristall an der Spore haften bleibt.

[0055] Der Bt-Serotyp der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E wurde als Serotyp tolworthi H9 für alle diese Stämme bestimmt, was durch traditionelle Serotypbestimmungsverfahren, wie sie vom WHO Collaborating Center for Entomopathogenetic Bacillus durchgeführt werden, bestimmt wurde.

Beispiel 2: Insektizide Wirksamkeit der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E und des BTS02618A-Protoxins gegen Noctuidae spp., Yponomeutidae spp und Pyralidae spp.

[0056] Die Toxizitätstests wurden an neu geschlüpften Larven (bei *Plutella xylostella* wurden Larven des dritten Stadiums verwendet) durchgeführt, denen ein Kunstfutter, das schichtenweise mit Sporenkristallmischungen von einem der Stämme BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E oder dem BTS02618A-Protoxin oder -Toxin durchsetzt war, verabreicht wurde. Das Kunstfutter wurde in Näpfchen von Costar-Platten mit 24 Näpfchen verabreicht. Das Futter war formaldehydfrei. 50 µl einer Probenverdünnung wurde auf die Oberfläche des Futters aufgetragen und in einer sterilen Werkbank getrocknet. Für die LC₅₀-Tests wurden die Verdünnungen mit PBS-BSA-Puffer vorgenommen, und es wurden fünf Verdünnungen aufgetragen. In jedes Näpfchen wurden zwei Larven gesetzt, und pro Probenverdünnung wurden 24 Larven verwendet. Am fünften Tag wurden die toten und lebenden Larven von *M. brassica*, *S. frugiperda*, *H. virescens*, *O. nubilalis*, *Plutella xylostella* und *S. exiqua* ausgezählt und am sechsten Tag wurden die toten und lebenden Larven von *A. ipsilon* und *S. littoralis* ausgezählt. Die LC₅₀- und LC₉₅-Werte (die Konzentrationen, die erforderlich sind, um 50% bzw. 95% der geprüften Insekten abzutöten, in Anzahl Sporen/Kristalle/cm² oder ng (Pro-)Toxin/cm² ausgedrückt) wurden mittels Probit-Analyse (Finney, 1971) berechnet, und die Ergebnisse sind unten angegeben.

Spodoptera littoralis

Versuch/Stamm 1	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
Versuch 1				
BTS02618A	2,4	7,7	1,5-3,4	3,2
HD 127 ^c	2,5	168	1,2-7,4	1,0
Versuch 2				
BTS02618A	1,1	4	0,8-1,6	3,0
HD 127	21,2	133,7	14,4-31,9	2,0

^a 10⁵ Sporen/Kristalle pro cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

^c von der Howard Dulmage Sammlung, am Northern Region Research Center, 1815 North University, Peoria, Ill, USA. Kurator: Dr. L. Nakamura.

[0057] Versuche mit gereinigtem BTS02618A-Protoxin zeigen auch, dass dieses Protoxin eine signifikante Toxizität gegen *S. littoralis*-Larven aufweist.

Spodoptera exiqua

1. Kristall/Sporen-Mischungen

Versuch/Stamm	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
Versuch 1				
BTS02618A	1,4	7,9	0,48-3,9	2,2
HD 127	8,2	163,5	5,1-15,7	1,3
Versuch 2				
BTS02618A	1,2	3,56	0,91-1,57	3,5
BTS02617A	0,79	2,12	0,61-1,03	3,81
HD 127	3,5	44,2	1,36-11,5*	1,5
Florbac	4,1	53,9	1,5-17,0*	1,47
BTS00170U ^c	5,1	46,5	1,83-24,4*	1,71
Versuch 3				
Javelin ^d	23,12	195,7	14,6-56,7	1,77
Versuch 4				
BTS02618A	1,07	2,91	0,83-1,39	3,8
BTS02617A	0,87	4,7	0,59-1,21	2,22
HD 127	4,7	56,9	1,85-18,7*	1,52
Florbac ^e	2,53	48,1	0,79-6,71*	1,29
BTS00170U	1,94	56,3	0,55-5,4*	1,12

^a 10⁵ Sporen/Kristalle pro cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte; mit Sternchen gekennzeichnete Werte sind 90% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

^c PCT-Patent-Schrift WO 90/06999

^d aus Javelin[®] isolierter Stamm (Sandoz, Lichtstrasse, Basel, Schweiz)

^e Stamm von Florbac[®] (Novo Nordisk, Novo Alle, Bagsvaerd, Dänemark)

2. Toxin/Protoxin-Assays

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
BTS02618A	Protoxin	26,6	100,6	20,9-33,9	2,8
CryIC	Toxin	68,9	313,2	50,5-94,1	2,5
CryID	Toxin	118,6	870,6	82,7-170,0	1,9

^a ng/cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

Mamestra brassica

1. Kristall/Sporen-Mischungen

Versuch/Stamm	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
HD 127	37,8	297,6	17,8-91,1	1,8
BTS02618A	8,6	59,6	6,0-12,2	1,9
BTS02617A	5,2	25,8	3,7-7,1	2,4
BTS02652E	12,9	44,2	9,7-17,2	3,0
BTS02654B	14,2	60,5	10,8-19,9	2,6

^a 10⁵ Sporen/Kristalle pro cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

2. Protoxin-Assays

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
BTS02618A	Protoxin	25,3	125,1	19,3-33,2	2,4
CryIC	Protoxin	22,0	62,9	16,3-29,6	3,6
CryIA(b)	Protoxin	162,4	7169	93,2-283,1	1,0

^a ng/cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

Agrotis ipsilon

1. Kristall/Sporen-Mischungen

Stamm	Mortalität ^a	Gene ^b
Btgall. ^c	1/20	<u>cryIF</u> , <u>cryIG</u> , <u>cryII</u> , <u>81k</u>
HD 127 ^d	2/20	<u>cryIAa</u> , <u>cryIAb</u> , <u>cryIC</u> , <u>cryID</u> , <u>cryII</u> , <u>81k</u>
BTS02618A	16/20 ^e	<u>cryIAb</u> , <u>cryII</u> , <u>bTS02618A</u> ,
Puffer	1/20	keine

^a Anzahl der Larven im 1. Stadium, die nach 6 Tagen abgetötet wurden (10⁷ Sporen/Kristalle/cm²)

^b Gene, von denen bekannt ist, dass sie in diesen Stämmen vorhanden sind

^c Btgall. wie von Smulevitch et al (1991) beschrieben

^d HD 127 ist bei der Howard Dulmage Collection (NRRC, siehe oben) erhältlich

^e überlebende Larven mit stark gehemmtem Wachstum

Stamm	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
BTS02618A	84,4	207,9	65,9-109,6	4,2
HD 127	>250			
BTS02617A	53,4	261,0	27,7-112,3	2,4

^a 10⁶ Sporen/cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

2. Toxin/Protoxin-Assay

ICP		LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
CryIAc	Toxin	>1350			
BTS02618A	Protoxin	212,2	1973	168,1-267,9	1,7

^a ng/cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

[0058] Da eine gewisse Wirksamkeit des CryIAc-Toxins gegen *A. ipsilon* von MacIntosh et al. (1990) beschrieben worden war, wurde gereinigtes CryIAc-Toxin aus Vergleichsgründen an diesem Insekt geprüft, verursachte jedoch keine signifikante Mortalität bei *A. ipsilon*.

Heliiothis virescens

1. Kristall/Sporen-Mischungen

Versuch/Stamm	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
BTS02617A	1,69	14,99	0,67-2,89	1,73
BTS02618A	2,71	25,4	0,88-6,99	1,69
BTS00170U ^c	15,1	398,7	8,3-41,2	1,15
Dipel ^d	2,99	14,11	1,25-7,76	2,45

^a 10³ Sporen/Kristalle pro cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

^c PCT-Patentschrift WO 90/06999

^d von DipelTM (Abott Laboratories, North Chicago, Ill., USA) isolierter Stamm

2. Toxin/Protoxin-Assay

ICP		LC ₅₀ ^a	FL _{min-max} ^b	LC ₉₅ ^a	Steigung
BTS02618A	Protoxin	31,6	20-50	182,7	2,1
CryIAb	Toxin	7,2	4,9-10,5	169,1	1,2

^a ng/cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

Ostrina nubilalis

1. Kristall/Sporen-Mischungen

Versuch/Stamm	LC ₅₀ ^a	LC ₉₅ ^a	FL _{min-max} ^b	Steigung
BTS02617A	4,92	12,49	2,45-6,81	4,0
BTS02618A	6,17	39,7	2,93-9,74	2,0
Dipel ^c	>30			

^a 10⁵ Sporen/Kristalle pro cm²

^b 95% Fiduzial-Konfidenzintervall der LC₅₀-Werte

^c von DipelTM (Abott Laboratories) isolierter Stamm

2. Assay mit aufgereinigtem Protoxin

ICP		100% Mortalität ^a
CryIAb	Toxin	1350
CryIB	Toxin	1350
BTS02618A	Protoxin	100

^a Konzentration, bei der 100% Mortalität beobachtet wurde (in ng/cm²)

[0059] Im Vergleich mit den CryI-Toxinen, die am stärksten gegen *Ostrinia* wirken, wies das aufgereinigte BTS02618A-Protoxin auch eine signifikante Toxizität gegen *Ostrinia nubilalis*-Larven auf.

Plutella xylostella

[0060] Eine signifikante Mortalität trat in mehreren Versuchen auch bei *Plutella xylostella*-Larven auf, nachdem aufgereinigtes BTS02618A-Toxin auf ihr Kunstfutter aufgebracht wurde.

Spodoptera frugiperda

[0061] Es wurde auch gefunden, dass Kristall/Sporen-Mischungen eines mit einem bTS02618A-Gen transformierten Kristall-minus-Bt-Stamms (Mahillon et al., 1989) in Insektenfütterungsversuchen das Larvenwachstum von *S. frugiperda*-Larven signifikant hemmen.

[0062] Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die erfindungsgemäßen Stämme und das erfindungsgemäße BTS02618A-Protein eine starke insektizide Wirksamkeit gegen verschiedenste Insekten, die gegenüber keinem einzigen derzeit verfügbaren Bt-Protein empfindlich sind, aufweisen und eine Wirksamkeit gegen mindestens drei *Spodoptera* spp. und gegen andere Noctuidae, wie *A. ipsilon*, *M. brassica* und *H. virescens*, sowie gegen Pyralidae wie *O. nubilalis* und Yponomeutidae wie *Plutella xylostella* aufweisen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 1, die das einzigartige Spektrum der Insekten, die gegenüber dem BTS02618A-Protein empfindlich sind, zeigt vergleichend mit Ergebnissen, die mit anderen CryI-Genen erhalten wurden (Van Frankenhuyzen, 1993), zusammengefaßt.

Beispiel 3: Identifikation des bTS02618A-Gens

[0063] Das bTS02618A-Gen wurde in dem Stamm BTS02618A mittels Southern-Blot-Analyse ([Fig. 1](#)) von mit Alul verdauter Gesamt-DNA des Stamms unter Standard-Hybridisierungsbedingungen mit der DNA-Sequenz des cryIG-Gens (Gleave et al., 1992) mit der SEQ ID Nr. 1 als DNA-Sonde identifiziert. DNA-Partialsequenzen des bTS02618A-Gens, die seine 5'- und 3'-terminalen Abschnitte zeigen, sind in SEQ ID Nr. 2 bzw. 3 dargestellt und die gesamte DNA-Sequenz des bTS02618A-Gens und die vollständige Aminosäuresequenz des BTS02618A-Proteins sind in SEQ ID Nr. 4 dargestellt.

[0064] Aufgrund der Partialsequenzen der SEQ ID Nr. 2 und 3 kann das bTS02618A-Gen in den Stämmen BTS02617A, BTS02654B und BTS02652E aufgefunden werden und die Konstruktion von Sonden für die Identifikation und Isolation der vollständigen Gensequenz in diesen und anderen Bt-Stämmen ermöglicht werden. Das Translationsinitiationscodon des bTS02618A-Gens wird in Nukleotidposition 195–197 in SEQ ID Nr. 2, die der Nukleotidposition 668–670 in SEQ ID Nr. 4 entspricht, identifiziert. Das Translationsstopcodon wird an Nukleotidposition 1146–1148 in SEQ ID Nr. 3, die der Nukleotidposition 4139–4141 in SEQ ID Nr. 4 entspricht, identifiziert.

[0065] Auch das bTS02618A-Gen wurde in den Stämmen BTS02617A, BTS02654B und BTS02652E mit der DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 als Sonde sowie anderen DNA-Sonden von konservierten DNA-Fragmenten in cryI-Genen identifiziert.

[0066] Es wurde gefunden, dass das Volllängen-Gen bTS02618A ein 129,9 kD großes Protoxin codiert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit anderen bekannten CryI-Proteinen ergab, dass das C-terminale Ende (C-terminal des konservierten Sequenzblocks 5) (zu 88%) mit CryIG homolog war. Die beste Homologie für den N-terminalen Teil (das Toxin) wurde mit dem CryIB-Toxin gefunden, es wurde jedoch gefunden, dass sie weniger als 50% betrug (die Homologie wird als Anzahl vollständiger Übereinstimmungen dividiert durch die Anzahl Aminosäuren des längsten Fragments ausgedrückt).

[0067] Es wird angenommen, dass das kleinste insektizide Protein ein 69 kD (615 Aminosäuren) großes Protein, das sich von der Aminosäure Nummer 44 bis zu Aminosäure Nummer 658 in SEQ ID Nr. 4 erstreckt, ist. Ein kleineres Trypsinfragment mit einer Größe von 55 kD (494 Aminosäuren), das sich von Aminosäure Nummer 165 bis Aminosäure Nummer 658 in SEQ ID Nr. 4 erstreckt, weist zwar eine insektizide Wirksamkeit gegen *S. exigua* auf, diese Wirksamkeit ist jedoch signifikant reduziert. So codiert ein verkürztes bTS02618A-Gen oder ein äquivalentes verkürztes Gen, vorzugsweise das 69 kD große Protein des BTS02618A-Prototoxins von SEQ ID Nr. 4 wie oben beschrieben.

Beispiel 4: Klonierung und Expression des bTS02618A-Gens

[0068] Um das bTS02618A-Gen zu isolieren, wurde Gesamt-DNA aus dem Stamm BTS02618A präpariert und mit Sau3A teilweise verdaut. Die verdaute DNA wurde der Größe nach auf einen Saccharosegradienten fraktioniert, und Fragmente von 7 kB bis 10 kB wurden mit dem mit BamHI-verdauten und mit BAP-behandelten Klonierungsvektor pUC19 (Yannisch-Perron et al., 1985) ligiert. Rekombinante E. coli-Klone, die den Vektor enthielten, wurden anschließend mit der cryIG-DNA-Sonde von SEQ ID Nr. 1, die in Beispiel 3 beschrieben ist, durchmustert, um Klone, die das bTS02618A-Gen enthielten, zu identifizieren.

[0069] Die so identifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend nach Maxam und Gilbert (1980) sequenziert. Partiaalsequenzen des bTS02618A-Gens sind in SEQ ID Nr. 2 und 3 gezeigt, und die vollständige Sequenz des bTS02618A-Gens und des BTS02618A-Proteins ist in SEQ ID Nr. 4 dargestellt. Basierend auf der DNA-Sequenz-Analyse wird das Gen mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, wodurch man zu dem verkürzten bTS02618A-Gen, das das BTS02618A-Toxin codiert, zu gelangen. Eine Expression des Gens in E. coli wurde nach Standardvorgehensweisen induziert (Sambrook et al., 1989, supra).

[0070] Das bTS02618A-Gen wird auch routinemäßig in einen Kristall-minus-Bt-Stamm eingeschleust, und zwar mit den Bt-Plasmiden PGI2 oder PGI3 (Mahillon und Seurinck 1988; Mahillon et al., 1988).

Beispiel 5: Insertion des bTS02618A-Gens und des verkürzten bTS02618A-Gens in E. coli, und Insertion des verkürzten bTS02618A-Gens in Pflanzen

[0071] Um das bTS02618A-Gen und das verkürzte bTS02618A-Gen von Beispiel 4 in E. coli und in Pflanzen zu exprimieren, wurden nach der in EPA 86/300291.1 und EPA 88/402115.5 beschriebenen Vorgehensweise unterschiedliche Genkassetten in E. coli hergestellt.

[0072] Um eine signifikante Expression in Pflanzen zu ermöglichen, wurden Kassetten, die a) das verkürzte Gen oder b) ein Hybridgen, das eine Fusion von i) dem verkürzten Gen und ii) dem Neo-Gen ist, jeweils: zwischen die T-DNA-Bordersequenzen von Pflanzenexpressionszwischenvektoren wie in EPA 86/300291.1 beschrieben inseriert; mit Transkriptbildungs- und Polyadenylierungssignalen in den Pflanzenexpressionsvektoren fusioniert; unter die Kontrolle des konstitutiven Blumenkohlmosaikviruspromotors, der das 35S3-Transkript (Hull und Howell, 1987) oder des 2'-Promotors der TR-DNA des Oktopin-Ti-Plasmids (Velten et al., 1984) gestellt; sowie mit den Transkriptbildungs- und Polyadenylierungssignalen des Oktopinsynthesegens am 3'-Ende fusioniert (Gielen et al., 1984).

[0073] Die Pflanzenexpressionszwischenvektoren, die das verkürzte bTS02618A-Gen enthalten, werden nach Standardvorgehensweisen (Deblaere et al., 1985) in den Agrobacterium-Stamm C58C1Rif^R (US-Patentanmeldung 821,582; EPA 86/300,291.1), der das entwaffnete Ti-Plasmid pGV2260 (Vaeck et al., 1987) trägt, transferiert. Durch Selektion auf Spectinomycinresistenz erhält man cointegrierte Plasmide, die aus pGV2260 und den entsprechenden Pflanzenexpressionszwischenvektoren bestehen. Mit jedem dieser rekombinanten Agrobacterium-Stämme werden dann unterschiedliche Baumwollpflanzen transformiert, so dass das verkürzte bTS02618A-Gen in unterschiedlichen Pflanzenzellen vorhanden und von unterschiedlichen Pflanzenzellen exprimiert wird.

Beispiel 6: Expression des verkürzten bTS02618A-Gens in Pflanzen

[0074] Die insektizide gegen Lepidoptera gerichtete Wirksamkeit des Expressionsprodukts des verkürzten bTS02618A-Gens in Blättern von transformierten Pflanzen, die aus den transformierten Pflanzenzellen von Beispiel 5 erzeugt werden, wird dadurch ausgewertet, dass man die Wachstumsrate und Mortalität von Larven von Agrotis und Spodoptera spp., die diese Blätter fressen, aufzeichnet. Diese Ergebnisse werden mit der Wachstumsrate von Larven, die Blätter von nicht-transformierten Pflanzen fressen, verglichen. Die Assays der Toxizität gegen Agrotis und Spodoptera spp. werden wie in EP 0,358,557, US-Patentanmeldung 821,582 und EPA 86/300,291.1 beschrieben durchgeführt. Bei Larven, die Blätter von transformierten Pflanzen, die das verkürzte bTS02618A-Gen und das verkürzte bTS02618A-neo-Hybridgen enthalten, fressen, gelangt man zu einer signifikant höheren Mortalitätsrate als bei Larven, die die Blätter von nicht-transformierten Pflanzen fressen. Es wurde auch gefunden, dass die transformierten Pflanzen aufgrund ihrer Expression des BTS02618A-Proteins gegen Befall mit Ostrinia nubilalis, Mamestra brassica, Heliothis virescens und Plutella xylostella resistent sind.

[0075] Es ist selbstverständlich, dass die vorliegende Erfindung nicht auf den Stamm BTS02617A (BC-

CM-LMG-P-12592), den Stamm BTS02618A (BCCM-LMG-P-12593), den Stamm BTS02654B (BCCM-LMG-P-12594) und den Stamm BTS02652E (BCCM-LMG-P-13493) beschränkt ist. Vielmehr beinhaltet die Erfindung jegliche Mutante oder Variante des Stamms BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E, die Kristalle, Kristallproteine, Protoxin oder Toxin mit im Wesentlichen den gleichen Eigenschaften, besonders Eigenschaften gegen Lepidoptera, ganz besonders Eigenschaften gegen Noctuidae, gegen Yponomeutidae und gegen Pyralidae, insbesondere Eigenschaften gegen Spodoptera, gegen Plutella, gegen Ostrinia, gegen Mamestra; gegen Heliothis und gegen Agrotis, wie die entsprechenden BTS02617A-, BTS02618A-, BTS02654B- oder BTS02652E-Kristalle oder -Kristallproteine oder das BTS02618A-Protoxin oder -Toxin aufweisen, produziert. Die vorliegende Erfindung beinhaltet auch das bTS02618A-Gen und alle insektizid wirksamen Teile davon, wie das verkürzte bTS02618A-Gen. Diesbezüglich bedeutet der Begriff „bTS02618A-Gen“ im vorliegenden Zusammenhang, das aus dem Stamm BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B oder BTS02652E isolierte Gen, das mit der Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 hybridisiert und jegliches äquivalente Gen, das ein Protoxin mit im Wesentlichen der gleichen Aminosäuresequenz und insektiziden Wirksamkeit wie das BTS02618A-Protoxin codiert und vorzugsweise die in SEQ ID Nr. 2 und 3 gezeigten Partialnukleotidsequenzen oder die in SEQ ID Nr. 4 gezeigte vollständige Sequenz enthält.

[0076] Die vorliegende Erfindung ist auch nicht auf mit dem verkürzten bTS02618A-Gen transformierte Baumwollpflanzen beschränkt. Sie beinhaltet jegliche Pflanze, wie Tomate, Tabak, Raps, Alfalfa, Sonnenblume, Salat, Kartoffel, Mais, Reis, Sojabohne, Brassica-Arten, Zuckerrübe und sonstige Leguminosen und Gemüse, die mit einem insektizid wirksamen Teil des bTS02618A-Gens oder einem äquivalenten Gen transformiert sind.

[0077] Die vorliegende Erfindung ist auch nicht auf die Transformation von Pflanzenzellen mit einem insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil auf die Verwendung von Agrobacterium tumefaciens-Ti-Plasmiden beschränkt. Andere bekannte Techniken für Pflanzenzelltransformationen, wie mittels Liposomen, durch Elektroporation, durch Vektorsysteme, die auf Pflanzenviren oder Pollen beruhen, können für die Transformation von Monocotyledonen und Dicotyledonen mit solch einem Anteil verwendet werden.

[0078] Außerdem können für die Transformation von Pflanzen und Bakterien andere DNA-Sequenzen, als diejenigen, die natürlich in den Stämmen BTS02617A, BTS02618A, BTS02654B und BTS02652E vorhanden sind und das BTS02618A-Protoxin und -Toxin codieren, verwendet werden. Diesbezüglich kann die natürliche DNA-Sequenz dieser Gene durch folgendes modifiziert werden: 1) Ersetzen von manchen Codons durch andere, die entweder für die gleichen oder unterschiedliche, vorzugsweise die gleichen, Aminosäuren codieren; 2) Entfernen oder Hinzufügen von manchen Codons; und/oder 3) reziproke Rekombination wie von Ge et al. (1991) beschrieben; mit der Maßgabe, dass solche Modifikationen die Eigenschaften, besonders die insektiziden Eigenschaften, insbesondere Eigenschaften gegen Lepidoptera, der codierten, insektizid wirksamen Abschnitte des BTS02618A-Prottoxins (z. B. Toxin) nicht wesentlich verändern. So könnte statt einem natürlich insektizid wirksamen bTS02618A-Genteil in einem erfindungsgemäßen chimären bTS02618A-Gen für die Modifikation von Pflanzen ein erfindungsgemäßes künstliches bTS02618A-Gen bzw. ein erfindungsgemäßer künstlicher bTS02618A-Genteil wie oben beschrieben, das bzw. der eine modifizierte Codon-Verwendung aufweist, verwendet werden.

[0079] Die vorliegende Erfindung umfasst auch andere DNA-Rekombinanten, die das ganze bTS02618A-Gen oder einen Teil davon in Kombination mit sonstiger Fremd-DNA, besonders der DNA von Vektoren, die sich für die Transformation von Pflanzen und anderen Mikroorganismen als E. coli eignen. Diesbezüglich ist die Erfindung nicht auf die spezifischen Plasmide, die das bTS02618A-Gen oder Teile davon, das bzw. die bis jetzt beschrieben wurde(n) beschränkt; die vorliegende Erfindung umfasst vielmehr beliebige DNA-Rekombinanten, die DNA-Sequenzen, die ihr Äquivalent sind, enthalten. Die Erfindung betrifft weiterhin alle DNA-Rekombinanten, die das ganze bTS02618A-Gen oder einen Teil davon enthalten und die sich für die Transformation von Mikroorganismen (z. B. mit Pflanzen assoziierte Bakterien wie andere Bacillus thuringiensis-Stämme, Bacillus subtilis, Pseudomonas und Xanthomonas oder Hefen wie Streptomyces cerevisiae) unter Bedingungen, die es dem ganzen Gen oder einem Teil des Gens ermöglichen, exprimiert zu werden und von diesen Mikroorganismen gewonnen zu werden oder auf eine Pflanzenzelle transferiert zu werden, eignen.

Tabelle 1

Wirksamkeit von CryI-Proteinen auf verschiedene Lepidoptera-Schadinsekten: + und - bedeutet das Vorhandensein bzw. Fehlen einer insektiziden Wirksamkeit, +/- bedeutet schwache Wirksamkeit (gemäß Van Frankenhuyzen (1993)), DNV bedeutet Daten nicht verfügbar, das Protein BTS02618A ist zu 2618A abgekürzt (Daten gemäß Van Frankenhuyzen (1993) sowie gemäß der vorliegenden Erfindung (für A. ipsilon und 2618A)).

	2618A	IAb	IAc	IB	IC	IF
<u>S. exigua</u>	+	+/-	-	-	+	+
<u>S. littoralis</u>	+	-	-	-	+	DNV
<u>H. virescens</u>	+	+	+	-	+/-	+

<u>A. ipsilon</u>	+	DNV	-	DNV	DNV	DNV
<u>O. nubilalis</u>	+	+	+	DNV	DNV	+
<u>P. xylostella</u>	+	+	+	+	+	DNV
<u>M. brassica</u>	+	+	-	-	+	DNV

Literaturangaben

- Bernhard K. und Utz R. „Production of Bacillus thuringiensis insecticides for experimental and commercial uses“, In Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, S. 255–267, Hrsg. Entwistle P. F., Cory J. S., Bailey M. J. und Higgs S., John Wiley and Sons, New York (1993).
- Chassy B. M., Mercenier A. und Flickinger J., Trends Biotechnol. 6, 303–309 (1988)
- Datta S., Peterhans A., Datta K. und Potrykus I., Bio/Technology 8, 736–740 (1990)
- Deblaere R., Bijtbeier B., De Greve H., Debock F., Schell J., Van Montagu M. und Leemans J., Nucleic Acids Research 13, 4777–4788 (1985)
- Dulmage H. T. „Production of Bacteria for Biological Control of Insects“ in Biological Control in Crop Production, Hrsg. Pappas D. C., Osmun Publishers, Totowa, N. J., USA, S. 129–141 (1981)
- Finney, Probit Analysis, 3. Auflage, Cambridge University Press (1971)
- Franck, Guilley, Jonard, Richards und Hirth, Cell 21, 285–294 (1980)
- French B. T., Maul H. N. und Maul G. G., Anal. Biochem. 156, 417–423 (1986)
- Fromm M., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J. und Klein T., Bio/Technology 8, 833–839 (1990)
- Gardner, Howarth, Hahn, Brown-Luedi, Shepard und Messing, Nucleic Acids Research 9, 2871–2887 (1981)
- Ge A., Rivers D., Milne R. und Dean D., J. Biol. Chem. 266, 17954–17958 (1991)
- Gielen J., De Beukeleer M., Seurinck J., Deboeck F., De Greve H., Lemmers M., Van Montagu M. und Schell J., EMBO J 3, 835–845 (1984)
- Gleave A. P., Hedges R. J. und Broadwell A. H., J. Gen. Microbiol. 138, 55–62 (1992)
- Gordon-Kamm W., Spencer M., Mangano M., Adams T., Daines R., Start W., O'Brien J., Chambers S., Adams W., Willets N., Rice T., Mackey C., Krueger R., Kausch A. und Lemaux P., The Plant Cell 2, 603–618 (1990)
- Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E. C., Peterson G. und Smith R. H., Plant Physiol. 95, 426–434 (1991)
- Höfte H., De Greve H., Seurinck J., Jansens S., Mahillon J., Ampe, Vandekerckhove J., Vanderbruggen H., Van Montagu M., Zabeau M. und Vaeck M., Eur. J. Biochem. 161, 273–280 (1986)
- Höfte H., VanRie J., Jansens S., Van Houtven., Verbruggen H. und Vaeck M., Applied and Environmental Microbiology 54, 2010–2017 (1988)
- Höfte H. und Whiteley H. R., Microbiological Review 53, 242–255 (1989)

- Hull und Howell, *Virology* 86, 482–493 (1987)
- Lereclus D., Vallade M., Chaufox J., Arantes O. & Rambaud S., *Bio/Technology* 10, 418 (1992)
- MacIntosh S. C. et al., *J. Invertebrate Patholog.* 56, 258–266 (1990)
- Mahillon J. und Delcour J., *J. Microbiol. Methods* 3, 69–73 (1984)
- Mahillon J. und Seurinck J., *Nucl. Acids Res.* 16, 11827–11828 (1988)
- Mahillon et al., *Plasmid* 19, 169–173 (1988)
- Mahillon et al., *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205–210 (1989)
- Maxam A. M. und Gilbert W., *Methods in Enzymol.* 65, 499–560 (1980)
- Murray E., Lotzer J. und Eberle M., *Nucleic Acids research* 17(2), 477–498 (1989)
- Shimamoto K., Terada R., Izawa T. und Fujimoto H., *Nature* 338, 274–276 (1989)
- Smulevitch S. V., Osterman A. L., Shevelev A. B., Kaluger S. V., Karasin A. I., Kadyrov R. M., Zagnitko o. P., Chestukhina G. G., und Stepanov V. M., *FEBS Lett.* 293, 1(2), 25–28 (1991)
- Stanssens P., Opsomer C., McKeown Y., Kramer W., Zabeau M. und Fritz H. J., *Nucleic Acids Research* 12, 4441–4454 (1989)
- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M. und Leemans J., *Nature* 327, 33–37 (1987)
- Van Frankenhuyzen „The Challenge of *Bacillus thuringiensis*“, in „*Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice“, S. 1–35, Hrsg. Entwistle P. F., Cory J. S., Bailey M. J. und Higgs S., John Wiley and Sons, New York (1993)
- Velten J., Velten L., Hain R. und Schell J., *EMBO J* 3, 2723–2730 (1984)
- Velten J. und Schell J. *Nucleic Acids Research* 13, 6981–6998 (1985)
- Visser B., Bosch D. und Honée G. „Domain-Structure Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach“, in „*Bacillus thuringiensis*. An Environmental Biopesticide: Theory and Practice“, S. 71–88, Hrsg. Entwistle P. F., Cory J. S., Bailey M. J. und Higgs S., John Wiley and Sons, New York (1993)
- Yannisch-Perron C., Vierra J. und Messing J. *Gene* 33, 103–119 (1985)

Blocksequenzbeschreibung

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER

- (A) NAME: PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.
- (B) STRASSE: Plateaustraat 22
- (C) ORT: Gent
- (E) LAND: Belgien
- (F) PLZ: 9000
- (G) TELEFON: 32 9 235 84 54
- (H) TELEFAX: 32 9 224 06 94
- (I) TELEX: 11.361 Pgsgen

(ii) ANMELDETITEL: Bacillus thuringiensis und dessen insektizide Proteine

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) SEQUENZLÄNGE: 19 Nukleotide
- (B) SEQUENZART: Nukleinsäuresonde
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: synthetische DNA

(ix) MERKMALE: Die Sonde ist ein Teil des DNA-Codierstrangs des cryIG-Gens, beschrieben von Smulevitch et al. (1991).

(x) EIGENSCHAFTEN: Die Sonde wird für die Isolation des bTS02618A-Gens aus dem Stamm, der es enthält, verwendet.

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 1:

5'-TTCTGTACTATTGATTGTA-3'

(3) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) SEQUENZLÄNGE: 1561 Basenpaare
- (B) SEQUENZART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS. Bacillus thuringiensis
- (B) STRANG: BTS02618A

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature
- (D) SONSTIGE INFORMATION: /function="enthält das Translationsinitiationsodon des bTS02618A-Gens"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 2:

AAAAAGAAAT AGGAATAAAT ACTATCCATT TTTTCAAGAA ATATTTTTTT ATTAGAAAGG	60
AATCTTTCTT ACACGGGAAA ATCCTAAGAT TGAGAGTAAA GATATATATA TATAAATACA	120
ATAAAGAGTT TGTCAGGATT TTTGAAAGAT ATGATATGAA CATGCACTAG ATTTATAGTA	180
TAGGAGGAAA AAGTATGAAT CGAAATAATC AAAATGAATA TGAAATTATT GATGCCCCCC	240
ATTGTGGGTG TCCATCAGAT GACGATGTGA GGTATCCTTT GGCAAGTGAC CCAAATGCAG	300
CGTTACAAAA TATGAACTAT AAAGATTACT TACAAATGAC AGATGAGGAC TACTCTGATT	360
CTTATATAAA TCCTAGTTTA TCTATTAGTG GTAGAGATGC AGTTCAGACT GCGCTTACTG	420
TTGTTGGGAG AATACTCGGG GCTTTAGGTG TTCCGTTTTC TGGACAAATA GTGAGTTTTT	480
ATCAATTCCT TTTAAATACA CTGTGGCCAG TTAATGATAC AGCTATATGG GAAGCTTTCA	540
TGCGACAGGT GGAGGAACTT GTCAATCAAC AAATAACAGA ATTTGCAAGA AATCAGGCAC	600
TTGCAAGATT GCAAGGATTA GGAGACTCTT TTAATGTATA TCAACGTTCC CTTCAAAATT	660
GTTTGGCTGA TCGAAATGAT ACACGAAATT TAAGTGTGT TCGTGCTCAA TTTATAGCTT	720
TAGACCTTGA TTTTGTAAAT GCTATTCCAT TGTTTGCAGT AAATGGACAG CAGGTTCCAT	780
TACTGTCACT ATATGCACAA GCTGTGAATT TACATTTGTT ATTATTAAAA GATGCATCTC	840
TTTTTGGAGA AGGATGGGGA TTCACACAGG GGGAAATTTC CACATATTAT GACCGTCAAT	900
TGGAACCTAAC CGCTAAGTAC ACTAATTACT GTGAACTTG GTATAATACA GGTTTAGATC	960
GTTTAAGAGG AACAAATACT GAAAGTTGGT TAAGATATCA TCAATTCCTG AGAGAAATGA	1020
CTTTAGTGGT ATTAGATGTT GTGGCGCTAT TTCCATATTA TGATGTACGA CTTTATCCAA	1080
CGGGATCAAA CCCACAGCTT ACACGTGAGG TATATACAGA TCCGATTGTA TTTAATCCAC	1140
CAGCTAATGT TGGACTTTGC CGACGTTGGG GACTAATCC CTATAATACT TTTTCTGAGC	1200
TCGAAATGC CTTCAATTCG CCACCAATC TTTTGTATAG GCTGAATAGC TTAACAATCA	1260
GCAGTAATCG ATTTCCAGTT TCATCTAATT TTATGGATTA TTGGTCAGGA CATACGTTAC	1320
GCCGTAGTTA TCTGAACGAT TCAGCAGTAC AAGAAGATAG TTATGGCCTA ATTACAACCA	1380
CAAGAGCAAC AATTAATCCC GGAGTTGATG GAACAAACCG CATAGAGTCA ACGGCAGTAG	1440
ATTTTCGTTT TGCATGATA GGTATATATG GCGTGAATAG AGCTTCTTTT GTCCCAGGAG	1500
GCTTGTAA TGGTACGACT TCTCCTGCTA ATGGAGGATG TAGAGATCTC TATGATACAA	1560
A	1561

(4) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) SEQUENZLÄNGE: 1554 Basenpaare
- (B) SEQUENZART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Bacillus thuringiensis

(B) STRANG: BTS02618A

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: misc_feature

(B) LAGE: 1146..1148

(D) SONSTIGE INFORMATION: /function= "mut-
maßliches Translationsstopcodon des
bTS02618A-Gens"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 3:

```

AAAATTATCC AACATACATT TATCAAAAAG TAGATGCATC GGTGTAAAG CCTTATACAC      60
GCTATAGACT AGATGGATTT GTGAAGNGTA GTCAAGATTT AGAATTGAT CTCATCCACC      120
ATCATAAAGT CCATCTTGTA AAAAAATGAC CAGATAATTT AGTATCTGAT ACTTACTCAG      180
ATGGTTCTTG CAGCGGAATC AACCGTTGTG ATGAACAGCA TCAGGTAGAT ATGCAGCTAG      240
ATGCGGAGCA TCATCCAATG GATTGCTGTG AAGCGGCTCA AACACATGAG TTTTCTTCCT      300
ATATTAATAC AGGGGATCTA AATGCAAGTG TAGATCAGGG CATTTGGGTT GTATTA AAAAG      360
TTCGAACAAC AGATGGGTAT GCGACGTTAG GAAATCTTGA ATTGGTAGAG GTTGGGCCAT      420
TATCGGGTGA ATCTCTAGAA CGGGAACAAA GAGATAATGC GAAATGGAAT GCAGAGCTAG      480
GAAGAAAACG TGCAGAAATA GATCGTGTGT ATTTAGCTGC GAAACAAGCA ATTAATCATC      540
TGTTTGTAGA CTATCAAGAT CAACAATTA AATCCAGAAAT TGGGCTAGCA GAAATTAATG      600
AAGCTTCAAA TCTTGTAGAG TCAATTTCCG GTGTATATAG TGATACACTA TTACAGATTC      660
CTGGGATTA AATACGAAAT TACACAGAGT TATCCGATCG CTTACAACAA GCATCGTATC      720
TGTATACGTC TAGAAATGCG GTGCAAAATG GAGACTTTAA CAGTGGTCTA GATAGTTGGA      780
ATACAACAT GATGCATCG GTTCAGCAAG ATGGCAATAT GCATTTCTTA GTTCTTTCCG      840
ATTGGGATGC ACAAGTTTCC CAACAATTGA GAGTAAATCC GAATTGTAAG TATGTCCTAC      900
GTGTGACAGC AAGAAAAGTA GGAGGCGGAG ATGGATACGT CACAATCCGA GATGGCGCTC      960
ATCACCAAGA AACTCTTACA TTTAATGCAT GTGACTACGA TGTAATGGT ACGTATGTCA     1020
ATGACAATTC GTATATAACA GAAGAAGTGG TATTCTACCC AGAGACAAA CATATGTGGG     1080
TAGAGGTGAG TGAATCCGAA GGTTCATTCT ATATAGACAG TATTGAGTTT ATTGAAACAC     1140
AAGAGTAGAA GAGGGGGATC CTAACGTATA GCAACTATGA GAGGATACTC CGTACAAACA     1200

```

AAGATTAAAA AAAGGTA AAAA TGAATAGAAC CCCCTACTGG TAGAAGGACC GATAGGGGGT	1260
TCTTACATGA AAAAATGTAG CTGTTTACTA AGGTGTATAA AAAACAGCAT ATCTGATAGA	1320
AAAAAGTGAG TACCTTATAA AGAAAGAATT CCATTCACAG TTTCGGTATC ATATAAATAA	1380
TGATAGGGGT ATCCTTCTTA TTTACATTAT TTTTCGCAAT TATCTCGACG TTCTTCTTTC	1440
CGCTCACAAT GATGATGATC ATGACAACAA TCGCGTCCAT AGCGAACTCT TTCGATATTA	1500
ATAATATCTA AACTCGTGTA GCAGTCATTT CCATTTTTTTT TGATCCAGTA AATA	1554

(2) INFORMATION ZU SEQ ID Nr. 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) SEQUENZLÄNGE: 4344 Basenpaare
- (B) SEQUENZART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 668..4141
- (D) SONSTIGE INFORMATION: umfasst die gesamte Sequenz von SEQ ID Nr. 2: von Nukleotidposition 474 bis 2034 in SEQ ID Nr. 4; umfasst auch einen Teil der Sequenz von SEQ ID Nr. 3: von Nukleotidposition 2994 bis Nukleotidposition 4344 in SEQ ID Nr. 4; SEQ ID Nr. 3 weist zusätzliche Nukleotide auf, die stromabwärts (3') von der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Sequenz liegen (Nukleotidposition 1352 bis Nukleotidposition 1554 in SEQ ID Nr. 3)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr. 4

GAATTCGAGC TCGGTACCTT TTCAGTGTAT CGTTTCCCTT CCATCAGGTT TTCAAATTGA	60
AAAGCCGAAT GATTTGAAAC TTGTTTACGA TGTAAGTCAT TTGTCTATGA CGAAAGATAC	120
CTGTAAAAAA CGTATTGAGA TTGATGAATG TGGACAAGTA GAAATTGACT TACAAGTATT	180
AAAGATTAAG GGTGTCCTTT CTTTTATCGG AAATTTCTCT ATTGAACCTA TTCTGTGTGA	240
AAACATGTAT ACAACGGTTG ATAGAGATCC GTCTATTTCC TTAAGTTTCC AAGATACGGT	300
ATATGTGGAC CATATTTTAA AATATAGCCT CCAACAATA CCATATTATG TAATTGATGG	360
TGATCATATT CAAGTACGTG ATTTACAAT CAACTGATG AAAGAGAATC CGCAATCTGC	420
TCAAGTATCA GGTGTGTTTT GTTTTGTATA TGAGTAAGAA CCGAAGGTTT GTAAAAAGA	480
AATAGGAATA AATACTATCC ATTTTTCAA GAAATATTTT TTTATTAGAA AGGAATCTTT	540
CTTACACGGG AAAATCCTAA GATTGAGAGT AAAGATATAT ATATATAAAT ACAATAAAGA	600
GTTTGTGAGG ATTTTTGAAA GATATGATAT GAACATGCAC TAGATTTATA GTATAGGAGG	660
AAAAAGT ATG AAT CGA AAT AAT CAA AAT GAA TAT GAA ATT ATT GAT GCC	709
Met Asn Arg Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala	
1 5 10	
CCC CAT TGT GGG TGT CCA TCA GAT GAC GAT GTG AGG TAT CCT TTG GCA	757
Pro His Cys Gly Cys Pro Ser Asp Asp Asp Val Arg Tyr Pro Leu Ala	
15 20 25 30	
AGT GAC CCA AAT GCA GCG TTA CAA AAT ATG AAC TAT AAA GAT TAC TTA	805
Ser Asp Pro Asn Ala Ala Leu Gln Asn Met Asn Tyr Lys Asp Tyr Leu	
35 40 45	
CAA ATG ACA GAT GAG GAC TAC ACT GAT TCT TAT ATA AAT CCT AGT TTA	853
Gln Met Thr Asp Glu Asp Tyr Thr Asp Ser Tyr Ile Asn Pro Ser Leu	
50 55 60	

TCT ATT AGT GGT AGA GAT GCA GTT CAG ACT GCG CTT ACT GTT GTT GGG Ser Ile Ser Gly Arg Asp Ala Val Gln Thr Ala Leu Thr Val Val Gly 65 70 75	901
AGA ATA CTC GGG GCT TTA GGT GTT CCG TTT TCT GGA CAA ATA GTG AGT Arg Ile Leu Gly Ala Leu Gly Val Pro Phe Ser Gly Gln Ile Val Ser 80 85 90	949
TTT TAT CAA TTC CTT TTA AAT ACA CTG TGG CCA GTT AAT GAT ACA GCT Phe Tyr Gln Phe Leu Leu Asn Thr Leu Trp Pro Val Asn Asp Thr Ala 95 100 105 110	997
ATA TGG GAA GCT TTC ATG CGA CAG GTG GAG GAA CTT GTC AAT CAA CAA Ile Trp Glu Ala Phe Met Arg Gln Val Glu Glu Leu Val Asn Gln Gln 115 120 125	1045
ATA ACA GAA TTT GCA AGA AAT CAG GCA CTT GCA AGA TTG CAA GGA TTA Ile Thr Glu Ser Phe Ala Arg Asn Gln Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu 130 135 140	1093
GGA GAC TCT TTT AAT GTA TAT CAA CGT TCC CTT CAA AAT TGG TTG GCT Gly Asp Ser Phe Asn Val Tyr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Trp Leu Ala 145 150 155	1141
GAT CGA AAT GAT ACA CGA AAT TTA AGT GTT GTT CGT GCT CAA TTT ATA Asp Arg Asn Asp Thr Arg Asn Leu Ser Val Val Arg Ala Gln Phe Ile 160 165 170	1189
GCT TTA GAC CTT GAT TTT GTT AAT GCT ATT CCA TTG TTT GCA GTA AAT Ala Leu Asp Leu Asp Phe Val Asn Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Asn 175 180 185 190	1237
GGA CAG CAG GTT CCA TTA CTG TCA GTA TAT GCA CAA GCT GTG AAT TTA Gly Gln Gln Val Pro Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Val Asn Leu 195 200 205	1285
CAT TTG TTA TTA TTA AAA GAT GCA TCT CTT TTT GGA GAA GGA TGG GGA His Leu Leu Leu Leu Lys Asp Ala Ser Leu Phe Gly Glu Gly Trp Gly 210 215 220	1333
TTC ACA CAG GGG GAA ATT TCC ACA TAT TAT GAC CGT CAA TTG GAA CTA Phe Thr Gln Gly Glu Ile Ser Thr Tyr Tyr Asp Arg Gln Leu Glu Leu 225 230 235	1381
ACC GCT AAG TAC ACT AAT TAC TGT GAA ACT TGG TAT AAT ACA GGT TTA Thr Ala Lys Tyr Thr Asn Tyr Cys Glu Thr Trp Tyr Asn Thr Gly Leu 240 245 250	1429
GAT CGT TTA AGA GGA ACA AAT ACT GAA AGT TGG TTA AGA TAT CAT CAA Asp Arg Leu Arg Gly Thr Asn Thr Glu Ser Trp Leu Arg Tyr His Gln 255 260 265 270	1477
TTC CGT AGA GAA ATG ACT TTA GTG GTA TTA GAT GTT GTG GCG CTA TTT Phe Arg Arg Glu Met Thr Leu Val Val Leu Asp Val Val Ala Leu Phe 275 280 285	1525
CCA TAT TAT GAT GTA CGA CTT TAT CCA ACG GGA TCA AAC CCA CAG CTT Pro Tyr Tyr Asp Val Arg Leu Tyr Pro Thr Gly Ser Asn Pro Gln Leu 290 295 300	1573

ACA CGT GAG GTA TAT ACA GAT CCG ATT GTA TTT AAT CCA CCA GCT AAT Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Ile Val Phe Asn Pro Pro Ala Asn 305 310 315	1621
GTT GGA CTT TGC CGA CGT TGG GGT ACT AAT CCC TAT AAT ACT TTT TCT Val Gly Leu Cys Arg Arg Trp Gly Thr Asn Pro Tyr Asn Thr Phe Ser 320 325 330	1669
GAG CTC GAA AAT GCC TTC ATT CGC CCA CCA CAT CTT TTT GAT AGG CTG Glu Leu Glu Asn Ala Phe Ile Arg Pro Pro His Leu Phe Asp Arg Leu 335 340 345 350	1717
AAT AGC TTA ACA ATC AGC AGT AAT CGA TTT CCA GTT TCA TCT AAT TTT Asn Ser Leu Thr Ile Ser Ser Asn Arg Phe Pro Val Ser Ser Asn Phe 355 360 365	1765
ATG GAT TAT TGG TCA GGA CAT ACG TTA CGC CGT AGT TAT CTG AAC GAT Met Asp Tyr Trp Ser Gly His Thr Leu Arg Arg Ser Tyr Leu Asn Asp 370 375 380	1813
TCA GCA GTA CAA GAA GAT AGT TAT GGC CTA ATT ACA ACC ACA AGA GCA Ser Ala Val Gln Glu Asp Ser Tyr Gly Leu Ile Thr Thr Thr Arg Ala 385 390 395	1861
ACA ATT AAT CCC GGA GTT GAT GGA ACA AAC CGC ATA GAG TCA ACG GCA Thr Ile Asn Pro Gly Val Asp Gly Thr Asn Arg Ile Glu Ser Thr Ala 400 405 410	1909
GTA GAT TTT CGT TCT GCA TTG ATA GGT ATA TAT GGC GTG AAT AGA GCT Val Asp Phe Arg Ser Ala Leu Ile Gly Ile Tyr Gly Val Asn Arg Ala 415 420 425 430	1957
TCT TTT GTC CCA GGA GGC TTG TTT AAT GGT ACG ACT TCT CCT GCT AAT Ser Phe Val Pro Gly Gly Leu Phe Asn Gly Thr Thr Ser Pro Ala Asn 435 440 445	2005
GGA GGA TGT AGA GAT CTC TAT GAT ACA AAT GAT GAA TTA CCA CCA GAT Gly Gly Cys Arg Asp Leu Tyr Asp Thr Asn Asp Glu Leu Pro Pro Asp 450 455 460	2053
GAA AGT ACC GGA AGT TCA ACC CAT AGA CTÁ TCT CAT GTT ACC TTT TTT Glu Ser Thr Gly Ser Ser Thr His Arg Leu Ser His Val Thr Phe Phe 465 470 475	2101
AGC TTT CAA ACT AAT CAG GCT GGA TCT ATA GCT AAT GCA GGA AGT GTA Ser Phe Gln Thr Asn Gln Ala Gly Ser Ile Ala Asn Ala Gly Ser Val 480 485 490	2149
CCT ACT TAT GTT TGG ACC CGT CGT GAT GTG GAC CTT AAT AAT ACG ATT Pro Thr Tyr Val Trp Thr Arg Arg Asp Val Asp Leu Asn Asn Thr Ile 495 500 505 510	2197
ACC CCA AAT AGA ATT ACA CAA TTA CCA TTG GTA AAG GCA TCT GCA CCT Thr Pro Asn Arg Ile Thr Gln Leu Pro Leu Val Lys Ala Ser Ala Pro 515 520 525	2245
GTT TCG GGT ACT ACG GTC TTA AAA GGT CCA GGA TTT ACA GGA GGG GGT Val Ser Gly Thr Thr Val Leu Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Gly 530 535 540	2293

ATA CTC CGA AGA ACA ACT AAT GGC ACA TTT GGA ACG TTA AGA GTA ACG Ile Leu Arg Arg Thr Thr Asn Gly Thr Phe Gly Thr Leu Arg Val Thr 545 550 555	2341
GTT AAT TCA CCA TTA ACA CAA CAA TAT CGC CTA AGA GTT CGT TTT GCC Val Asn Ser Pro Leu Thr Gln Gln Tyr Arg Leu Arg Val Arg Phe Ala 560 565 570	2389
TCA ACA GGA AAT TTC AGT ATA AGG GTA CTC CGT GGA GGG GTT TCT ATC Ser Thr Gly Asn Phe Ser Ile Arg Val Leu Arg Gly Gly Val Ser Ile 575 580 585 590	2437
GGT GAT GTT AGA TTA GGG AGC ACA ATG AAC AGA GGG CAG GAA CTA ACT Gly Asp Val Arg Leu Gly Ser Thr Met Asn Arg Gly Gln Glu Leu Thr 595 600 605	2485
TAC GAA TCC TTT TTC ACA AGA GAG TTT ACT ACT ACT GGT CCG TTC AAT Tyr Glu Ser Phe Phe Thr Arg Glu Phe Thr Thr Thr Gly Pro Phe Asn 610 615 620	2533
CCG CCT TTT ACA TTT ACA CAA GCT CAA GAG ATT CTA ACA GTG AAT GCA Pro Pro Phe Thr Phe Thr Gln Ala Gln Glu Ile Leu Thr Val Asn Ala 625 630 635	2581
GAA GGT GTT AGC ACC GGT GGT GAA TAT TAT ATA GAT AGA ATT GAA ATT Glu Gly Val Ser Thr Gly Gly Glu Tyr Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Ile 640 645 650	2629
GTC CCT GTG AAT CCG GCA CGA GAA GCG GAA GAG GAT TTA GAA GCG GCG Val Pro Val Asn Pro Ala Arg Glu Ala Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala 655 660 665 670	2677
AAG AAA GCG GTG GCG AGC TTG TTT ACA CGT ACA AGG GAC GGA TTA CAG Lys Lys Ala Val Ala Ser Leu Phe Thr Arg Thr Arg Asp Gly Leu Gln 675 680 685	2725
GTA AAT GTG ACA GAT TAT CAA GTG GAC CAA GCG GCA AAT TTA GTG TCA Val Asn Val Thr Asp Tyr Gln Val Asp Gln Ala Ala Asn Leu Val Ser 690 695 700	2773
TGC TTA TCC GAT GAA CAA TAT GGG CAT GAC AAA AAG ATG TTA TTG GAA Cys Leu Ser Asp Glu Gln Tyr Gly His Asp Lys Lys Met Leu Leu Glu 705 710 715	2821
GCG GTA AGA GCG GCA AAA CGC CTC AGC CGC GAA CGC AAC TTA CTT CAA Ala Val Arg Ala Ala Lys Arg Leu Ser Arg Glu Arg Asn Leu Leu Gln 720 725 730	2869
GAT CCA GAT TTT AAT ACA ATC AAT AGT ACA GAA GAG AAT GGC TGG AAG Asp Pro Asp Phe Asn Thr Ile Asn Ser Thr Glu Glu Asn Gly Trp Lys 735 740 745 750	2917
GCA AGT AAC GGT GTT ACT ATT AGC GAG GGC GGT CCA TTC TTT AAA GGT Ala Ser Asn Gly Val Thr Ile Ser Glu Gly Gly Pro Phe Phe Lys Gly 755 760 765	2965
CGT GCA CTT CAG TTA GCA AGC GCA AGA GAA AAT TAT CCA ACA TAC ATT Arg Ala Leu Gln Leu Ala Ser Ala Arg Glu Asn Tyr Pro Thr Tyr Ile 770 775 780	3013

TAT CAA AAA GTA GAT GCA TCG GTG TTA AAG CCT TAT ACA CGC TAT AGA Tyr Gln Lys Val Asp Ala Ser Val Leu Lys Pro Tyr Thr Arg Tyr Arg 785 790 795	3061
CTA GAT GGA TTT GTG AAG AGT AGT CAA GAT TTA GAA ATT GAT CTC ATC Leu Asp Gly Phe Val Lys Ser Ser Gln Asp Leu Glu Ile Asp Leu Ile 800 805 810	3109
CAC CAT CAT AAA GTC CAT CTT GTA AAA AAT GTA CCA GAT AAT TTA GTA His His His Lys Val His Leu Val Lys Asn Val Pro Asp Asn Leu Val 815 820 825 830	3157
TCT GAT ACT TAC TCA GAT GGT TCT TGC AGC GGA ATC AAC CGT TGT GAT Ser Asp Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Cys Ser Gly Ile Asn Arg Cys Asp 835 840 845	3205
GAA CAG CAT CAG GTA GAT ATG CAG CTA GAT GCG GAG CAT CAT CCA ATG Glu Gln His Gln Val Asp Met Gln Leu Asp Ala Glu His His Pro Met 850 855 860	3253
GAT TGC TGT GAA GCG GCT CAA ACA CAT GAG TTT TCT TCC TAT ATT AAT Asp Cys Cys Glu Ala Ala Gln Thr His Glu Phe Ser Ser Tyr Ile Asn 865 870 875	3301
ACA GGG GAT CTA AAT GCA AGT GTA GAT CAG GGC ATT TGG GTT GTA TTA Thr Gly Asp Leu Asn Ala Ser Val Asp Gln Gly Ile Trp Val Val Leu 880 885 890	3349
AAA GTT CGA ACA ACA GAT GGG TAT GCG ACG TTA GGA AAT CTT GAA TTG Lys Val Arg Thr Thr Asp Gly Tyr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu 895 900 905 910	3397
GTA GAG GTT GGG CCA TTA TCG GGT GAA TCT CTA GAA CCG GAA CAA AGA Val Glu Val Gly Pro Leu Ser Gly Glu Ser Leu Glu Arg Glu Gln Arg 915 920 925	3445
GAT AAT GCG AAA TGG AAT GCA GAG CTA GGA AGA AAA CGT GCA GAA ATA Asp Asn Ala Lys Trp Asn Ala Glu Leu Gly Arg Lys Arg Ala Glu Ile 930 935 940	3493
GAT CGT GTC TAT TTA GCT GCG AAA CAA GCA ATT AAT CAT CTG TTT GTA Asp Arg Val Tyr Leu Ala Ala Lys Gln Ala Ile Asn His Leu Phe Val 945 950 955	3541
GAC TAT CAA GAT CAA CAA TTA AAT CCA GAA ATT GGG CTA GCA GAA ATT Asp Tyr Gln Asp Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ile Gly Leu Ala Glu Ile 960 965 970	3589
AAT GAA GCT TCA AAT CTT GTA GAG TCA ATT TCG GGT GTA TAT AGT GAT Asn Glu Ala Ser Asn Leu Val Glu Ser Ile Ser Gly Val Tyr Ser Asp 975 980 985 990	3637
ACA CTA TTA CAG ATT CCT GGG ATT AAC TAC GAA ATT TAC ACA GAG TTA Thr Leu Leu Gln Ile Pro Gly Ile Asn Tyr Glu Ile Tyr Thr Glu Leu 995 1000 1005	3685
TCC GAT CGC TTA CAA CAA GCA TCG TAT CTG TAT ACG TCT AGA AAT GCG Ser Asp Arg Leu Gln Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Ser Arg Asn Ala 1010 1015 1020	3733

GTG CAA AAT GCA GAC TTT AAC AGT GGT CTA GAT AGT TGG AAT ACA ACT Val Gln Asn Gly Asp Phe Asn Ser Gly Leu Asp Ser Trp Asn Thr Thr 1025 1030 1035	3781
ATG GAT GCA TCG GTT CAG CAA GAT GGC AAT ATG CAT TTC TTA GTT CTT Met Asp Ala Ser Val Gln Gln Asp Gly Asn Met His Phe Leu Val Leu 1040 1045 1050	3829
TCG CAT TGG GAT GCA CAA GTT TCC CAA CAA TTG AGA GTA AAT CCG AAT Ser His Trp Asp Ala Gln Val Ser Gln Gln Leu Arg Val Asn Pro Asn 1055 1060 1065 1070	3877
TGT AAG TAT GTC TTA CGT GTG ACA GCA AGA AAA GTA GGA GGC GGA GAT Cys Lys Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Val Gly Gly Gly Asp 1075 1080 1085	3925
GGA TAC GTC ACA ATC CGA GAT GGC GCT CAT CAC CAA GAA ACT CTT ACA Gly Tyr Val Thr Ile Arg Asp Gly Ala His His Gln Glu Thr Leu Thr 1090 1095 1100	3973
TTT AAT GCA TGT GAC TAC GAT GTA AAT GGT ACG TAT GTC AAT GAC AAT Phe Asn Ala Cys Asp Tyr Asp Val Asn Gly Thr Tyr Val Asn Asp Asn 1105 1110 1115	4021
TCG TAT ATA ACA GAA GAA GTG GTA TTC TAC CCA GAG ACA AAA CAT ATG Ser Tyr Ile Thr Glu Glu Val Val Phe Tyr Pro Glu Thr Lys His Met 1120 1125 1130	4069
TGG GTA GAG GTG AGT GAA TCC GAA GGT TCA TTC TAT ATA GAC AGT ATT Trp Val Glu Val Ser Glu Ser Glu Gly Ser Phe Tyr Ile Asp Ser Ile 1135 1140 1145 1150	4117
GAG TTT ATT GAA ACA CAA GAG TAGAAGAGGG GGATCCTAAC GTATAGCAAC Glu Phe Ile Glu Thr Gln Glu 1155	4168
TATGAGAGGA TACTCCGTAC AAACAAAGAT TAAAAAAGG TAAAATGAAT AGAACCCCT	4228
ACTGGTAGAA GGACCGATAG GGGGTTCTTA CATGAAAAAA TGTAGCTGTT TACTAAGGTG	4288
TATAAAAAAC AGCATATCTG ATAGAAAAAA GTGAGTACCT TATAAAGAAA GAATTC	4344

Patentansprüche

1. Ein insektizides Protein, das einen insektizid wirksamen Teil des Proteins mit der unter SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz aufweist, oder eine Mutante oder Variante davon, wobei manche Aminosäuren entfernt, ersetzt oder hinzugefügt wurden, ohne die insektizide Wirksamkeit des Proteins wesentlich zu beeinflussen.
2. Das Protein nach Anspruch 1, das für *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Mamestra brassica*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* und *Plutella xylostella* eine insektizide Wirkung aufweist.
3. Das Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, das die in SEQ ID Nr. 4 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.
4. Das Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, das einen insektizid wirksamen Teil des Proteins mit unter SEQ ID Nr. dargestellten Aminosäuresequenz aufweist.
5. Das Protein nach Anspruch 4, das die in SEQ ID Nr. dargestellten Aminosäuren der Position 44 bis zur Position 658 aufweist.
6. Das Protein nach Anspruch 4, das die in SEQ ID Nr. dargestellten Aminosäuren der Position 165 bis zur Position 658 aufweist.
7. Das Protein nach Anspruch 4, das die in SEQ ID Nr. dargestellten Aminosäuren der Position 1 bis zur Position 658 aufweist.
8. Das Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 2, erhältlich aus Stamm BTS02618A, hinterlegt bei BC-CM-LMG unter der Zugangsnummer P-12593.
9. Das Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das zusätzlich die Aminosäuresequenz eines Selektions-Marker-Proteins aufweist.

10. Eine DNA, enthaltend eine codierende Sequenz, codierend ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Eine DNA, enthaltend eine codierende Sequenz, codierend ein Protein, welches die in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuren der Position 44 bis zur Position 658 aufweist.
12. Eine DNA, die die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 4 von der Nukleotidposition 797 bis zur Nukleotidposition 2641 aufweist.
13. Die DNA-Sequenz nach Anspruch 10, erhältlich aus Stamm BTS02618A, hinterlegt bei BCCM-LMG unter der Zugangsnummer P-12953, wobei die DNA Sequenz für ein Protein mit insektizider Wirkung auf *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Mamestra brassica*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* und *Plutella xylostella* codiert.
14. Eine DNA, die ein Protein mit der insektiziden Wirkung des unter SEQ ID Nr. 4 dargestellten Proteins codiert, wobei besagte DNA unter stringenten Bedingungen mit der unter SEQ ID No. 4 dargestellten Nukleotidsequenz von Nukleotidposition 668 bis Nukleotidposition 4138 hybridisiert.
15. Eine DNA, die ein Protein mit der insektiziden Wirkung des unter SEQ ID Nr. 4 dargestellten Proteins von Aminosäureposition 44 bis Aminosäureposition 658 codiert, wobei besagte DNA unter stringenten Bedingungen mit der DNA mit der unter SEQ ID Nr. 4 dargestellten Nukleotidsequenz von der Nukleotidposition 797 bis Nukleotidposition 2641 hybridisiert.
16. Die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 15, worin die Kodon-Verwendung der codierenden Sequenz so modifiziert wurde, dass sie von einer Pflanze bevorzugt wird.
17. Die DNA nach Anspruch 16, worin die besagte Pflanze Mais ist.
18. Die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 17, die ein Monokotyledonen-Intron enthalten.
19. Ein chimäres Gen, enthaltend die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 und einen Promotor, der die Expression in den Zellen einer Pflanze regeln kann.
20. Das chimäre Gene aus nach Anspruch 19, worin die besagte DNA die Nucleotide von Position 668 bis 2641 der unter SEQ ID Nr. 4 dargestellten DNA-Sequenz umfasst.
21. Ein *Bacillus thuringiensis* Stamm, ausgewählt aus folgender Gruppe: Stamm BTS02617A mit der Hinterlegungsnummer BCCM-LMG P-12592, Stamm BTS02618A mit der Hinterlegungsnummer BCCM-LMG P-12593, Stamm BTS02654B mit der Hinterlegungsnummer BCCM-LMG P-12594 und Stamm BTS02652E mit der Hinterlegungsnummer BCCM-LMG P-13493.
22. Eine Kristall-Sporen-Mischung des Stammes nach Anspruch 21.
23. Eine insektizide Zusammensetzung, enthaltend aktive Bestandteile, ausgewählt aus folgender Gruppe: das Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, den Stamm nach Anspruch 21 und die Kristall-Sporen-Mischung nach Anspruch 22.
24. Die Zusammensetzung nach Anspruch 23, die wirksam gegen Insekten, ausgewählt aus folgender Gruppe ist: *Agrotis* spp., *Spodoptera* spp., *Plutella* spp., *Mamestra* spp., *Heliothis* spp. und *Ostrinia* spp., *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mamestra brassica*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis* und *Plutella xylostella*.
25. Ein transformierter Mikroorganismus, der eine DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 enthält.
26. Eine Pflanzenzelle, enthaltend die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20.
27. Eine Pflanze, enthaltend die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20.

28. Eine Pflanze nach Anspruch 27, die aus folgenden ausgewählt wird: Baumwolle, Tomate, Tabak, Raps, Alfalfa, Sonnenblume, Salat, Kartoffel, Mais, Reis, Sojabohne, Brassica-Arten und Zuckerrübe.

29. Ein Pflanzengewebe, enthaltend die Pflanzenzelle nach Anspruch 26.

30. Samen einer Pflanze, enthaltend die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20.

31. Ein Verfahren, mit dem eine Pflanze resistent gegen Lepidoptera gemacht wird, dadurch charakterisiert, dass eine Pflanze mit der DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder mit dem chimären Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20 ausgestattet wird.

32. Das Verfahren nach Anspruch 31, worin besagte Lepidoptera aus folgender Gruppe ausgewählt werden: *Agrotis* spp., *Spodoptera* spp., *Plutella* spp., *Mamestra* spp., *Heliothis* spp., *Ostrinia* spp., *Agrotis* ipsilon, *Spodoptera* exigua, *Spodoptera* littoralis, *Spodoptera* frugiperda, *Mamestra* brassica, *Heliothis* virescens, *Ostrinia* nubilalis und *Plutella* xylostella.

33. Ein Verfahren für die Produktion von Pflanzen und Reproduktionsmaterial besagter Pflanzen, die gegen Lepidoptera resistent sind, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung transformierter Pflanzenzellen, die die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20 enthalten,
- b) Regeneration von Pflanzen oder Reproduktionsmaterial davon, enthaltend die DNA nach einem der Ansprüche 10 bis 18 oder das chimäre Gen nach einem der Ansprüche 19 oder 20 ausgehend von den besagten Pflanzenzellen, und wahlweise,
- c) die biologische Nachbildung der besagten regenerierten Pflanzen oder des besagten Reproduktionsmaterials.

34. Ein Verfahren für die Bekämpfung eines Schadinsekts, das einen Schritt enthält, bei dem der Schädling mit dem Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9 kontaktiert wird.

35. Ein Verfahren für die Bekämpfung eines Schadinsekts, das einen Schritt enthält, bei dem der Schädling mit der insektiziden Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 23 oder 24 kontaktiert wird.

36. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 34 oder 35, worin das besagte Schadinsekt aus folgenden ausgewählt werden kann: *Agrotis* spp., *Spodoptera* spp., *Plutella* spp., *Mamestra* spp., *Heliothis* spp., *Ostrinia* spp., *Agrotis* ipsilon, *Spodoptera* exigua, *Spodoptera* littoralis, *Spodoptera* frugiperda, *Mamestra* brassica, *Heliothis* virescens, *Ostrinia* nubilalis und *Plutella* xylostella.

37. Die Pflanze nach einem der Ansprüche 27 oder 28, die heterozygot bezüglich der eingeführten DNA ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1

