



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **112056** (13) **C2**
(51) МПК (2016.01)

A01H 5/00

A01H 5/10 (2006.01)

A01N 63/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C07K 14/325 (2006.01)

A01P 7/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 08660</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.12.2010</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.07.2016</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/284,289</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 16.12.2009</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.10.2012, Бюл.№ 19</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2016, Бюл.№ 14</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2010/060825, 16.12.2010</p>	<p>(72) Винахідник(и): Мід Томас (US), Нарва Кеннет (US), Сторер Ніколас П. (US), Шитс Джоел Дж. (US), Бертон Стефані Л. (US)</p> <p>(73) Власник(и): ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: ARENCIBIA ARIEL ET AL: "Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack", MOLECULAR BREEDING: NEW STRATEGIES IN PLANT IMPROVEMENT, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, NL, vol. 3, no. 4, 01.01.1997, pages 247-255 US 2008311096 A1, 18.12.2008 WU X ET AL: "Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four Bacillus thuringiensis toxins", JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 100, no. 1, 14.10.2008, pages 29-34</p>
--	--

(54) **ТРАНСГЕННА РОСЛИНА ЦУКОВОЇ ТРОСТИНИ, ЯКА МІСТИТЬ ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Fa, І ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Ab, ДЛЯ БОРОТЬБИ З ВОГНІВКОЮ ЦУКОВОЇ ТРОСТИНИ**

(57) Реферат:

Даний винахід стосується способів і рослин цукрової тростини для боротьби з комахою вогніркою цукрової тростини (SCB), де вказані рослини цукрової тростини містять корові токсиновмісні білки Cry1Fa і Cry1Ab, в комбінації для затримки або попередження розвитку резистентності у SCB.

UA 112056 C2

ОПИС

Рівень техніки

Щорічно мільярди доларів витрачаються на боротьбу з комахами-шкідниками, і ще мільярди доларів втрачаються за рахунок збитку, який вони наносять. Синтетичні органічні хімічні інсектициди були основними інструментами, які використовувалися для боротьби з комахами-шкідниками, але біологічні інсектициди, такі як інсектицидні білки, отримані з *Bacillus thuringiensis* (Bt), в деяких областях зіграли дуже важливу роль. Можливість отримання стійких до комах рослин за допомогою трансформації генів інсектицидних Bt-білків привела до революційних перетворень в сучасному сільському господарстві, і підкреслила важливість і значення інсектицидних білків і їх генів.

Деякі Bt-білки використовували для створення стійких до комах трансгенних рослин, які до теперішнього часу були успішно зареєстровані і стали промислово доступними. Вони включають Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa і Cry3Bb в кукурудзі, Cry1Ac і Cry2Ab в бавовнику і Cry3A в картоплі.

Промислово доступні продукти, які експресують дані білки, експресують один білок, за винятком тих випадків, коли бажаний комбінований спектр 2 інсектицидних білків (наприклад, Cry1Ab і Cry3Bb в комбінації в кукурудзі для забезпечення стійкості відповідно до лускокрилих шкідників і кореневих нематод), або коли незалежна дія білків робить їх придатною як інструмент для затримки розвитку резистентності у чутливих популяцій комах (наприклад, Cry1Ac і Cry2Ab в комбінації в бавовнику для забезпечення керування резистентністю у тютюнової листовійки).

Тобто, деякі властивості стійких до комах трансгенних рослин, які привели до швидкого і широкого впровадження даної технології, також дали підставу вважати, що в популяціях комах буде розвиватися резистентність до інсектицидних білків, які продукуються такими рослинами. Було запропоновано декілька стратегій для того, щоб зберегти застосування Bt-ознак стійкості до комах, які включають застосування діючих білків у високій дозі в комбінації зі "сховищем" і альтернативно зі спільним розміщенням інших токсинів (McGaughey et al. (1998) "B.t. Resistance Management", *Nature Biotechnol.*, 16:144-146).

Для білків, вибраних для застосування в стеках керування резистентністю комах (IRM), потрібно виявляти їх інсектицидний ефект незалежно, так, щоб резистентність, що виникла до одного білка, не додавала резистентності до другого білка (тобто була відсутня перехресна резистентність до білків). Якщо, наприклад, популяція шкідників, вибрана за рахунок наявності резистентності до "білка А", одночасно є сприйнятливою до "білка В", то заявники стверджують, що відсутня перехресна резистентність і що комбінація білка А і білка В буде ефективною в затримці розвитку резистентності до одного білка А.

При відсутності резистентних популяцій комах можна провести прогностичні оцінки, основані на інших характеристиках, ймовірно пов'язаних з механізмом дії і можливістю розвитку перехресної резистентності. Було запропоновано використовувати опосередковане рецептором зв'язування для ідентифікації інсектицидних білків, для яких, ймовірно, не характерна перехресна резистентність (van Mellaert et al., 1999). Ключовим прогностичним показником відсутності перехресної резистентності в даному підході є той факт, що інсектицидні білки не конкурують за рецептори у сприйнятливих видів комах.

У тому випадку, коли два Bt-токсини конкурують у комах за один і той же рецептор, і якщо рецептор мутує у цієї комахи таким чином, що один з токсинів більше не зв'язується з рецептором і в результаті більше не виявляє інсектицидної активності проти цієї комахи, то це може бути випадком, коли у комахі також буде розвиватися резистентність до другого токсину (який конкурентно зв'язаний з тим же рецептором). Однак якщо два токсини зв'язуються з двома різними рецепторами, то це може бути показником того, що комаха не буде одночасно мати резистентність до цих двох токсинів.

Білок Cry1Fa використовується для боротьби з багатьма лускокрилими комахами, включаючи кукурудзяного стеблового метелика (Hübner) і кукурудзяну листову совку (FAW; *Spodoptera frugiperda*), і білок активний проти вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*).

Білок Cry1Fa, продукований в трансгенних рослинах кукурудзи, що містить подію TC1507, відповідальний за провідну в галузі ознаку резистентності комах в заходах для боротьби з FAW. Білок Cry1Fa також входить до складу продуктів Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

Можливість проводити дослідження, основані на зв'язуванні (конкурентному або гомологічному) з рецептором з використанням білка Cry1Fa була обмежена, оскільки доступний звичайний метод введення мітки в білки для детектування в тестах зв'язування з рецептором приводив до інактивації інсектицидної активності білка Cry1Fa.

Cry1Ab і Cry1Fa є інсектицидними білками, які застосовуються в цей час (окремо) в трансгенній кукурудзі для захисту рослин від різних комах-шкідників. Ключовим шкідником кукурудзи, від якого забезпечується захист даними білками, є кукурудзяний стебловий метелик (ECB). Патент США № 2008/0311096 стосується частково застосування Cry1Ab для боротьби з резистентною до Cry1Fa популяцією ECB.

Суть винаходу

Даний винахід частково стосується неймовірного відкриття того, що Cry1Fa є дуже активним проти популяції вогнівки цукрової тростини (SCB), яка є резистентною до Cry1Ab. Як це буде зрозуміло фахівцям в даній галузі за допомогою даного розкриття, рослини цукрової тростини, які продукують Cry1Fa і Cry1Ab (включаючи інсектицидні фрагменти повнорозмірних білків), будуть придатними для затримки або попередження розвитку резистентності у SCB до будь-якого одного з даних інсектицидних білків.

Докладний опис винаходу

Даний винахід частково стосується неймовірного відкриття того, що Cry1Fa є дуже активним проти популяції вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*), яка резистентна до Cry1Ab. Отже, даний винахід частково стосується неймовірного відкриття того, що Cry1Fa можна використовувати в комбінації з або "в стеку" з Cry1Ab в цукровій тростині для боротьби з розвитком резистентності у SCB до будь-якого одного з даних інсектицидних білків. Кажучи інакше, даний винахід частково стосується неймовірного відкриття того, що популяція вогнівки цукрової тростини, вибрана внаслідок резистентності до Cry1Ab, не є резистентною до Cry1Fa; вогнівка цукрової тростини, резистентна до токсину Cry1Ab, чутлива (тобто не має перехресної резистентності) до Cry1Fa. Таким чином, даний винахід включає застосування Cry1Fa-токсину на цукровій тростині для боротьби з популяціями вогнівки цукрової тростини, які резистентні до Cry1Ab.

Як буде зрозуміло фахівцям в даній галузі за допомогою даного розкриття, рослини цукрової тростини, які експресують cry1Fa і cry1Ab (включаючи їх інсектицидні фрагменти), будуть придатними для затримки або попередження розвитку резистентності SCB до будь-якого одного з даних інсектицидних білків.

Даний винахід включає застосування Cry1Fa і Cry1Ab для захисту цукрової тростини від пошкодження і втрат урожаю, викликаного вогнівкою цукрової тростини або популяціями вогнівки цукрової тростини, у яких розвинулася резистентність до Cry1Ab.

Таким чином, даний винахід стосується стека IRM для придушення розвитку резистентності до Cry1Ab і/або Cry1Fa у вогнівки цукрової тростини.

Частково основується на даних, описаних в цьому документі, спільна експресія генів cry1Ab і cry1Fa в цукровій тростині може продукувати високу дозу стека IRM для контролю SCB. До даної комбінації можна додати інші білки для розширення спектра дії.

На основі цих даних можна передбачити, що Cry1Fa буде ефективним в контролі популяцій SCB, у яких розвинулася резистентність до Cry1Ab. Однією можливістю впровадження є застосування даних Cry-білків в географічних зонах, в яких Cry1Ab став неефективним в боротьбі з SCB за рахунок розвитку резистентності. Іншою можливістю впровадження буде застосування одного або обох таких Cry-білків в комбінації з Cry1Ab для придушення розвитку резистентності у SCB до Cry1Ab.

Химерні токсини за даним винаходом включають повний N-кінцевий фрагмент, відповідний коровому токсину Bt-токсину, в тій же точці після кінця фрагмента токсину білок має перехід в гетерологічну послідовність протоксину. N-кінцевий фрагмент токсину в Bt-токсині далі стосується "корового токсину". Перехід в сегмент гетерологічного протоксину має місце приблизно в сполучі токсину/протоксину, або альтернативно фрагмент нативного протоксину (що простягається за фрагментом корового токсину) може зберегтися, з переходом в гетерологічний протоксин, який розташований даунстрім.

Як приклад один химерний токсин за даним винаходом містить повний фрагмент корового токсину Cry1Ab (амінокислоти 1-601) і гетерологічний протоксин (амінокислоти 602 до С-кінця). У одному переважному варіанті здійснення фрагмент химерного токсину, який містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab. Як другий приклад другий химерний токсин за даним винаходом містить повний фрагмент корового токсину Cry1Ca (амінокислоти 1-619) і гетерологічний протоксин (амінокислоти 620 до С-кінця). У переважному варіанті здійснення фрагмент химерного токсину, який містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab (вказане вище також стосується інсектицидних білків Cry1Fa). Якщо не указано інакше, то послідовності можна отримати, як описано в заявці на патент США № 2008/0311096.

Фахівцям в даній галузі, очевидно, зрозуміло, що Bt-токсини, навіть всередині певного класу, такого як Cry1Fa або Cry1Ab, до деякої міри будуть варіювати в довжині і точному положенні

переходу від фрагмента корового токсину до фрагмента протоксину. Як правило, токсини Cry1Fa мають довжину приблизно від 1150 до приблизно 1200 амінокислот. Звичайно перехід від фрагмента токсину до фрагмента протоксину складає приблизно від 50 % до приблизно 60 % від повної довжини токсину. Химерний токсин за даним винаходом буде включати повну експансію даного N-кінцевого фрагмента корового токсину. Таким чином, химерний токсин буде включати щонайменше приблизно 50 % від повної довжини Cry1Fa або Cry1Ab Bt-токсину. Це буде становити щонайменше приблизно 590 амінокислот. Відносно фрагмента протоксину, то повна експансія фрагмента протоксину Cry1Ab простягається від кінця фрагмента токсину до C-кінця молекули. Це приблизно останні 100-150 амінокислот даного фрагмента, які є найбільш важливими для включення в химерний токсин за даним винаходом.

Гени і токсини. Гени і токсини, придатні для застосування за даним винаходом, включають не тільки розкриті повнорозмірні послідовності, але також фрагменти даних послідовностей, варіанти, мутанти і злиті білки, які зберігають специфічну пестицидну активність токсинів, конкретно приведених як приклад. У тому значенні, в якому в даному документі використовуються терміни "варіанти" або "варіації" генів, вони стосуються нуклеотидних послідовностей, які кодують одні і ті ж токсини, або які кодують еквівалентні токсини, що мають пестицидну активність. У тому значенні, в якому в даному документі використовується термін "еквівалентні токсини", він стосується токсинів, що мають таку ж або по суті таку ж біологічну активність проти шкідників-мішеней, як і токсини за даним винаходом.

У тому значенні, в якому в даному документі використовується цей термін, межі становлять приблизно 95 % (Cry1Ab's і Cry1Fa's), 78 % (Cry1Ab's і Cry1Fa's) і 45 % (Cry1's) ідентичність послідовностей згідно з "Revision of the Nomenclature for the Bacillus thuringiensis Pesticidal Crystal Proteins", N. Crickmore, D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998), Vol. 62:807-813. Ці порогові відсікання молекулярної маси також можуть бути застосовні тільки до корових токсинів (для токсинів Cry1Ab і Cry1Fa).

Фахівцям в даній галузі, очевидно, зрозуміло, що гени, що кодують активні токсини, можна ідентифікувати і отримати декількома способами. Конкретні гени або фрагменти генів, приведені як приклад, можна отримати з ізолятів, які депоновані в колекції культур, як описано вище. Дані гени або їх фрагменти, або варіанти, також можна сконструювати синтетичним шляхом, наприклад, при використанні синтезатора генів. Варіації генів можна легко сконструювати з використанням звичайних способів отримання точкових мутацій. Також фрагменти даних генів можна отримати з використанням промислово доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз, слідуючи стандартним процедурам. Наприклад, можна використовувати ферменти, такі як Bal31, або сайт-направлений мутагенез для методичного відсікання нуклеотидів від кінців таких генів. Також гени, які кодують активні фрагменти, можна отримати з використанням різних рестриктаз. Протеази можна використовувати для безпосереднього отримання активних фрагментів даних токсинів.

Фрагменти і еквівалентні варіанти, які зберігають пестицидну активність приведених як приклад токсинів, будуть знаходитися в об'ємі даного винаходу. Також за рахунок виродженості генетичного коду широкий ряд різних ДНК-послідовностей може кодувати амінокислотні послідовності, розкриті в даному документі. Фахівцям в даній галузі добре відоме отримання таких альтернативних ДНК-послідовностей, що кодують одні і ті ж або по суті одні і ті ж токсини. Такі варіантні ДНК-послідовності знаходяться в об'ємі даного винаходу. У тому значенні, в якому в даному документі використовується термін "по суті одні і ті ж" послідовності, він стосується послідовностей, які мають амінокислотні заміни, делеції, додавання або інсерції, які не впливають істотно негативним чином на пестицидну активність. Фрагменти генів, що кодують білки, які зберігають пестицидну активність, також входять в об'єм даного визначення.

Додатковим способом ідентифікації генів, що кодують токсини, і фрагментів генів, придатних для даного винаходу, є застосування олігонуклеотидних зондів. Такі зонди представляють детектовані нуклеотидні послідовності. Ці послідовності можна детектувати з використанням відповідної мітки або їх можна зробити спочатку флуоресцентними, як описано в міжнародній заявці WO93/16094. Як добре відомо в даній галузі, якщо молекула зонда і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються з утворенням сильного зв'язку між двома молекулами, то розумно передбачити, що зонд і зразок мають значну гомологію. Переважно гібридизацію проводять в жорстких умовах з використанням методів, відомих в даній галузі, описаних, наприклад, Keller G.H., M.M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Деякі приклади концентрацій солей і комбінацій температури є наступними (в порядку збільшення жорсткості): 2X SSPE або SSC при кімнатній температурі; 1X SSPE або SSC при 42°C; 0,1X SSPE або SSC при 42°C; 0,1X SSPE або SSC при 65°C. Детектування зонда забезпечує спосіб

визначення відомим шляхом того, чи мала місце гібридизація. Такий аналіз зонда забезпечує швидкий спосіб ідентифікації генів, що кодують токсини за даним винаходом. Нуклеотидні сегменти, які використовуються як зонди за винаходом, можна синтезувати з використанням ДНК-синтезатора і стандартних методів. Такі нуклеотидні послідовності також можна використовувати як ПЛР-праймери для ампліфікації генів за даним винаходом.

Деякі токсини за даним винаходом конкретно приводяться як приклад в даному документі. Оскільки дані токсини є тільки прикладами токсинів за даним винаходом, то, очевидно, зрозуміло, що даний винахід включає варіантні або еквівалентні токсини (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), що мають таку ж або аналогічну пестицидну активність зразкового токсину. Еквівалентні токсини повинні мати амінокислотну гомологію із зразковим токсином. Як правило, така амінокислотна гомологія буде складати більше 75 %, переважно більше 90 % і найбільш переважно більше 95 %. Амінокислотна гомологія буде найбільш високою в найбільш важливих областях токсину, які відповідають за біологічну активність або беруть участь у визначенні тривимірної конфігурації, яка в кінцевому результаті відповідає за біологічну активність. У цьому відношенні прийнятні деякі амінокислотні заміни, і можна очікувати, що такі заміни знаходяться в областях, які не є важливими для прояву активності, або являють собою консервативні амінокислотні заміни, які не впливають негативним чином на тривимірну конфігурацію молекули. Наприклад, амінокислоти можна розділити на наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислі. Консервативні заміни, за допомогою яких амінокислота одного класу замінюється іншою амінокислотою того ж типу, знаходяться в об'ємі даного винаходу, за умови, що заміна істотно не змінює біологічну активність сполуки. Нижче приводиться перелік прикладів амінокислот, що стосуються кожного класу.

Таблиця 1

Клас амінокислот	Приклади амінокислот
Неполярні амінокислот	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Незаряджені полярні амінокислоти	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Кислі амінокислоти	Asp, Glu
Лужні амінокислоти	Lys, Arg, His

У деяких випадках також можна провести неконсервативні заміни. Критичним чинником є те, що такі заміни не повинні істотно знижувати біологічну активність токсину.

Рекомбінантні хазяї. Гени, що кодують токсини за даним винаходом, можна ввести в широкий ряд мікробних або рослинних хазяїв. Експресія гена токсину, прямо або опосередковано, приводить до внутрішньоклітинної продукції і збереження пестициду. Кон'югаційне перенесення і рекомбінантне перенесення можна використовувати для отримання Вt-штаму, який експресує обидва токсини за даним винаходом. Також можна трансформувати інші мікроорганізми-хазяї одним або обома генами токсинів для отримання синергічного ефекту. Відносно відповідних мікроорганізмів-хазяїв, наприклад, *Pseudomonas*, то мікроби можна застосувати в положення шкідника, де вони будуть проліферувати і поглинатися. Результатом є боротьба зі шкідником. Альтернативно мікроорганізм, що містить ген токсину, можна обробити в умовах, які пролонгують активність токсину і стабілізують клітину. Потім на оброблену клітину, яка зберігає токсичну активність, можна впливати середовищем шкідника-мішені.

У тому випадку, коли ген Вt-токсину вводять в мікроорганізм-хазяїн за допомогою відповідного вектора, і на вказаний хазяїн впливають середовищем в живому стані, то важливо, щоб використовувалися певні мікроорганізми-хазяї. Вибирають мікроорганізми-хазяї, про яких відомо, що вони мешкають в "фітосфері" (філоплані, філосфері, ризосфері і/або ризоплані) однієї або більше культур, які цікавлять. Дані мікроорганізми вибирають таким чином, щоб вони були здатні успішно конкурувати в певному навколишньому середовищі (культура і інші комахи-мешканці) з мікроорганізмами дикого типу для забезпечення стабільної підтримки і експресії гена, який експресує поліпептид-пестицид, і бажано, забезпечення підвищеного захисту пестициду від деградації і інактивації в навколишньому середовищі.

Відома велика кількість мікроорганізмів, які мешкають в філоплані (на поверхні листя рослин) і/або ризосфері (в ґрунті, який оточує коріння рослин) широкого ряду важливих сільськогосподарських культур. Такі мікроорганізми включають бактерії, водорості і гриби.

Особливий інтерес представляють мікроорганізми, такі як бактерії, наприклад, родів *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*; гриби, зокрема, дріжджі, наприклад, родів *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес представляють такі види бактерій, які мешкають в фітосфері, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azobacter vinlandii*, і види дріжджів фітосфери, такі як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluentis*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес представляють пігментовані мікроорганізми.

Є велика кількість способів інтродукції Bt-гена, що кодує токсин, в мікроорганізм-хазяїн в умовах, які забезпечують стабільне збереження і експресію гена. Ці способи добре відомі фахівцям в даній галузі і описані, наприклад, в патенті США № 5135867, який включений в даний документ для ознайомлення.

Обробка клітин *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, які експресують Bt-токсини, можна обробити для пролонгування активності токсинів і стабілізації клітини. Пестицидна мікрокапсула, яка утворюється, містить Bt-токсин або Bt-токсини в клітинній структурі, яку стабілізована і буде захищати токсин, коли мікрокапсула піддається впливу навколишнього середовища шкідника-мішені. Прийнятні клітини-хазяї можуть включати прокаріоти або еукаріоти, і звичайно обмежуються клітинами, які не продукують речовин, токсичних для вищих організмів, таких як ссавці. Однак можна використовувати мікроорганізми, які продукують речовини, токсичні для вищих організмів, в тому випадку, коли токсичні речовини є нестабільними, або їх вміст є досить низьким для того, щоб уникнути вияву будь-якої можливої токсичності для ссавця-хазяя. Як хазяї особливий інтерес представляють прокаріоти і нижчі еукаріоти, такі як гриби.

При обробці звичайно клітини повинні бути інтактними і в основному знаходитися в проліферативній формі, краще не в формі спор, хоч, в деяких випадках можна використовувати спори.

Обробку клітини мікроорганізму, наприклад, мікроорганізму, що містить ген або гени Bt-токсину, можна проводити хімічним або фізичним методами, або комбінацією хімічного і/або фізичного методів, при умові, що метод не впливає негативним чином на властивості токсину і не знижує здатності клітин захищати токсин. Прикладами хімічних реагентів є галогеновані йод в м'яких умовах і протягом достатнього періоду часу для досягнення бажаних результатів. Інші відповідні способи включають обробку альдегідами, такими як глутаральдегід; протиінфекційними препаратами, такими як зефіран хлорид і цетилпіридиній хлорид; спиртами, такими як ізопропіловий і етиловий спирт; різними гістологічними фіксаторами, такими як йодний розчин Люголю, фіксатор Буена, різні кислоти і фіксатор Хеллі (дивись Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W.H. Freeman and Company, 1967) або обробку комбінацією фізичного (нагрівання) і хімічного агентів, які зберігають і пролонгують активність токсину, продукуюваного в клітині, коли клітину вводять в середовище хазяя. Прикладами фізичних методів є короткохвильове опромінення, таке як гамма-опромінення, і рентгенівське опромінення, УФ-опромінення, ліофілізація і тому подібне. Способи обробки клітин мікроорганізмів розкриті в патентах США № 4695455 і 4695462, які включені в даний документ для ознайомлення.

Як правило, клітини мають підвищену стабільність структури, яка підвищує стійкість до впливу умов навколишнього середовища. У тих випадках, коли пестицид знаходиться в проформі, то метод обробки клітин потрібно вибрати таким чином, щоб не інгібувати процесинг проформи в зрілу форму пестициду під дією патогену шкідника-мішені. Наприклад, формальдегід буде поперечно зшивати білки і може інгібувати процесинг проформи поліпептиду-пестициду. Спосіб обробки повинен зберігати щонайменше значну частину біологічної доступності або біологічної активності токсину.

Характеристики, що представляють особливий інтерес при виборі клітини-хазяя для цілей продукції, включають простоту введення Bt-гена або Bt-генів хазяю, доступність експресійних систем, ефективність експресії, стабільність пестициду в хазяї і наявність додаткових генетичних властивостей. Характеристики, що представляють особливий інтерес для застосування як мікрокапсул пестициду, включають захисні властивості для пестициду, такі як товщина клітинних стінок, пігментація і внутрішньоклітинна упаковка або утворення тілець

включення; виживаність у водному середовищі; відсутність токсичності для ссавців; привабливість для захоплення шкідниками; простота в індукції загибелі і фіксації без пошкодження токсину і тому подібне. Інші чинники включають простоту формуляції і поводження, економічні міркування, стабільність при зберіганні і тому подібне.

5 Ріст клітин. Клітину-хазяїн, що містить інсектицидний Bt-ген або Bt-гени, можна культивувати в будь-якому звичайному поживному середовищі, в якому ДНК-конструкція забезпечує вибірккову перевагу, забезпечуючи селективне середовище, в якому по суті всі або всі клітини зберігають Bt-ген. Потім можна зібрати такі клітини з використанням звичайних методів. Альтернативно клітини можна обробити до збору.

10 Bt-клітини, які продукують токсини за винаходом, можна культивувати з використанням звичайних в даній галузі середовищ і методів ферментації. Після здійснення циклу ферментації бактерії можна зібрати першим відділенням спор і кристалів Bt з культурального бульйону способами, відомими в даній галузі. Виділені спори і кристали Bt можна формулювати у вигляді змочуваного порошку, рідкого концентрату, гранул і інших препаративних форм з додаванням
15 поверхнево-активних речовин, диспергаторів, інертних носіїв і інших компонентів для полегшення поводження з ними і їх застосування проти конкретних шкідників-мішеней. Такі препаративні форми і способи застосування відомі в даній галузі.

Препаративні форми. Формульовані гранули-приманки, що містять аттрактант і спори, кристали і токсини Bt-ізолятів, або рекомбінантні мікроорганізми, що містять гени, отримані з Bt-ізолятів, розкритих в даному документі, можна вносити в ґрунт. Формульований продукт також можна застосовувати у вигляді покриття насіння або агента для обробки коріння, загальної обробки рослин на більш пізніх стадіях вегетаційного періоду. Для обробки рослин і ґрунту Bt-клітинами можна використовувати змочувані порошки, гранули або дисти, які отримують
25 змішуванням з різними інертними речовинами, такими як неорганічні мінеральні речовини (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати і тому подібне) або матеріали рослинного походження (такі як подрібнена серцевина кукурудзяного качана, рисова лузга, шкаралупа горіхів і тому подібне). Препаративні форми можуть включати ад'юванти прилипачі, стабілізуючі агенти, інші пестицидні добавки або поверхнево-активні речовини. Рідкі препаративні форми можуть бути на водній або неводній основі, і їх можна застосовувати у вигляді пін, гелів, суспензій, емульгованих концентратів або тому подібне. Інгредієнти можуть включати реологічну добавку, поверхнево-активні речовини, диспергатори або полімери.

Фахівцям в даній галузі, очевидно, зрозуміло, що концентрація пестициду буде варіювати в широких межах залежно від природи конкретної формуляції, зокрема, чи є вона концентратом або призначена для безпосереднього застосування. Пестицид буде знаходитися в концентрації, що становить щонайменше 1 % мас., або концентрація може дорівнювати 100 % мас. Сухі препаративні форми будуть містити приблизно 1-95 % мас. пестициду, в той час як рідкі препаративні форми звичайно будуть містити приблизно 1-60 % мас. твердих часток в рідкій фазі. У препаративних формах звичайно буде знаходитися приблизно від 10^2 до приблизно 10^4 клітин/мг. Такі препаративні форми будуть застосовуватися в кількостях приблизно від 50 мг
40 (рідина або суха речовина) до 1 кг або більш на га.

Препаративні форми можна застосовувати в середовищі мешкання лускокрилого шкідника, наприклад, на листя або в ґрунт, обприскуванням, запиленням, поливом або тому подібне.

Трансформація рослин. Переважний рекомбінантний хазяїн для продукції інсектицидних білків за даним винаходом являє собою трансформовану рослину. Гени, що кодують Bt-білки токсини, розкриті в даному документі, можна вставити в рослинні клітини з використанням різних способів, добре відомих в даній галузі. Наприклад, є велика кількість клонуючих векторів, що містять реплікаційну систему *Escherichia coli*, і маркер, який дозволяє відібрати трансформовані клітини для проведення інсерції чужорідних генів у вищі рослини. Вектори включають, серед іншого, наприклад, pBR322, серії pUC, серії M13mp, pACYC184. Отже, фрагмент ДНК, що містить послідовність, що кодує Bt-білок токсин, можна вставити у вектор у відповідному сайті рестрикції. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у відповідному поживному середовищі, потім збирають і лізують. Плазмиду виділяють. Як правило, проводять аналіз послідовності, рестрикційний аналіз, електрофорез і використовують інші біохімічні-молекулярні біологічні методи як методи аналізу.
55 Після кожної маніпуляції використовувану ДНК-послідовність можна розщепити і приєднати до наступної ДНК-послідовності. Кожну послідовність плазмиди можна клонувати в одну і ту ж або різні плазмиди. Залежно від способу вставки бажаних генів в рослину, можуть бути необхідні інші ДНК-послідовності. Наприклад, якщо для трансформації рослинної клітини використовують Ti- або Ri-плазмиду, то щонайменше праву межу, але часто праву і ліву межі T-ДНК Ti- або Ri-плазмиди, потрібно з'єднати у вигляді фланкуючої області генів, призначених для вставки.
60

Застосування Т-ДНК для трансформації рослинних клітин інтенсивно досліджувалося і в достатній мірі описано в Європейському патенті 120516, Lee and Gelvin (2008), Hоекета (1985), Fraley et al. (1986) і An et al. (1985), і добре відоме в даній галузі.

Після інтеграції вставленої ДНК в геном рослини вона є відносно стабільною. Звичайно вектор для трансформації містить селектований маркер, який додає трансформованим рослинним клітинам резистентності, серед іншого, до біоциду або антибіотику, такому як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або пігроміцин. Маркер, що індивідуально використовується, отже, дозволить відібрати трансформовані клітини краще, ніж клітини, які не містять вставлену ДНК.

Є велика кількість методів для інсерції ДНК в рослинну клітину-хазяїн. Такі методи включають трансформацію Т-ДНК з використанням *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як трансформуючий агент, злиття, ін'єкцію, біологічну балістику (бомбардування мікрочастинками) або електропорацію, а також інші можливі методи. Якщо для трансформації використовують *Agrobacteria*, то ДНК, призначену для вставки, клонують в спеціальні плазмід, а саме в проміжний вектор або бінарний вектор. Проміжні вектори можна інтегрувати в Ti- або Ri-плазмід гомологічною рекомбінацією завдяки послідовностям, які є гомологічними до послідовностей Т-ДНК. Ti- або Ri-плазмід також містить *vir*-область, необхідну для перенесення Т-ДНК. Проміжні вектори не можуть реплікуватися самостійно в *Agrobacteria*. Проміжний вектор можна перенести в *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою плазмід-хелпера (кон'югацією). Бінарні вектори можуть реплікуватися в *E. coli* і *Agrobacteria*. Вони включають селективний ген-маркер і лінкер або полілінкер, який вставлений в рамку з правої і лівої приграничних областей Т-ДНК. Їх можна безпосередньо трансформувати в *Agrobacteria* (Holsters et al., 1978). При використанні як клітини-хазяя *Agrobacterium* повинні містити плазмід, яка несе *vir*-область. *Vir*-область необхідна для перенесення Т-ДНК в рослинну клітину. Можуть міститися додаткові Т-ДНК. Трансформовану таким чином бактерію використовують для трансформації рослинних клітин. Експланти рослин переважно можна культивувати з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для перенесення ДНК в рослинну клітину. Потім можна регенерувати цілі рослини з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, шматочків листа, сегментів стебла, коріння, а також протопластів або культивованих в суспензії клітин) у відповідному середовищі, яке може містити антибіотики або біоциди за винаходом. Потім отримані таким чином рослини можна тестувати на присутність вставленої ДНК. Відсутні особливі вимоги відносно плазмід у разі методів ін'єкції і електропорації. Можна використовувати звичайні плазмід, наприклад, такі як похідні pUC.

Трансформовані клітини розвиваються в рослинах звичайним шляхом. Вони можуть утворити зародкові клітини і передати трансформовану ознаку(ознаки) потомству рослин. Такі рослини можна вирощувати звичайним шляхом і схрещувати з рослинами, які мають ті ж трансформовані спадкові чинники або інші спадкові чинники. Отримані гібриди мають відповідні фенотипічні властивості.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу рослини потрібно трансформувати генами, в яких кодон переважно оптимізований для застосування в рослинах. Дивись, наприклад, патент США № 5380831, який включений в даний документ для ознайомлення. Незважаючи на те, що в даному документі як приклад приводяться зрізані токсини, добре відомо в області Bt-токсинів, що токсини масою 130 kDa (повна довжина) мають N-кінцевий фрагмент, який є коровим токсином, і C-кінцевий фрагмент є "хвостом" протоксину. Таким чином, відповідні "хвости" можна використовувати зі зрізаними/коровими токсинами за даним винаходом. Дивись, наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Крім того, в даній галузі відомі способи отримання синтетичних Bt-генів для застосування в рослинах (Stewart and Burgin, 2007). Одним необмежувальним прикладом переважної трансформованої рослини є фертильна рослина кукурудзи, що містить експресований в рослині ген, що кодує білок Cry1Fa, і додатково містить другий експресований в рослині ген, що кодує білок Cry1Ab.

Перенесення (або інтрогресію) ознаки(ознак), що визначається Cry1Ab і Cry1Fa, в інбредні лінії кукурудзи можна здійснити рекурентною селекцією, наприклад, зворотним схрещуванням. У цьому випадку необхідну рекурентну батьківську форму спочатку схрещують з інбредним донором (нерекурентною батьківською формою), який несе відповідний ген(и) для ознак, що визначаються Cry1Ab і Cry1Fa. Потомство даного гібрида потім зворотно схрещують з рекурентною батьківською формою з подальшою селекцією отриманого потомства на необхідну ознаку(ознаки), яка призначена для перенесення від нерекурентної батьківської форми. Після трьох, переважно, чотирьох, більш переважно п'яти і більше поколінь зворотних гібридів з рекурентною батьківською формою з селекцією на необхідну ознаку(ознаки), потомство буде гетерозиготним відносно локусів, контролюючих ознаку(ознаки), яка переноситься, але буде

такою ж як рекурентна батьківська форма відносно більшості або майже всіх інших генів (дивись, наприклад, Poehlmann & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4th Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376).

Стратегії керування резистентністю комах (IRM). Наприклад, Roush et al. описують стратегії, основані на двох токсинах, так зване "нагромадження" або "стекинг" для контролю інсектицидних трансгенних культур (The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777-1786). На веб-сайті Агентства по захисту навколишнього середовища США (epa.gov/oprbppd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) приводяться наступні вказівки для забезпечення нетрансгенних сховищ (розділ не-Bt культури/кукурудзи) для застосування з трансгенними культурами.

"Специфічними структурованими вимогами для Bt-захищеної (Cry1Ab і Cry1Fa) кукурудзи від кукурудзяного стеблового метелика продукти є наступними:

структуровані сховища: 20 % сховищ не-лускокрилих з Bt-кукурудзою в Кукурудзяному поясі; 50 % сховищ не-лускокрилих з Bt-кукурудзою в Кукурудзяному поясі

Блоки

1. Внутрішній (тобто в Bt-поле)

2. Зовнішній (тобто окремі поля в межах 1/2 милі (1/4 милі, якщо можливо) від Bt-поля для максимального довільного схрещування)

Смуги в полі

Смуги повинні мати ширину щонайменше 4 ряди (переважно 6 рядів) для зниження ефектів, пов'язаних з пересуванням личинок".

Крім того, Національна Асоціація виробників кукурудзи на їх веб-сайті (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn) також приводить аналогічні вказівки відносно вимог для сховищ. Наприклад:

"Вимоги відносно IRM кукурудзяного стеблового метелика:

засадити щонайменше 20 % територій з кукурудзою гібридами сховища;

у районах з виробництвом бавовни сховище повинне складати 50 %;

повинні висаджуватися в межах 1/2 милі від гібридів сховища;

сховище можна засівати у вигляді смуг у Bt-полі; смуги сховища повинні бути шириною щонайменше 4 ряди;

сховище можна обробити звичайними пестицидами тільки, якщо досягаються економічні пороги для шкідника-мішені;

не можна використовувати розпилювані інсектициди на основі Bt на кукурудзі сховища;

відповідне сховище повинне бути засаджене у кожному господарстві з Bt-кукурудзою".

Як стверджує Roush et al. (на сторінках 1780 і 1784 правої колонки, наприклад), "стекинг" або "накопичення" дозволяє використовувати менше сховище. Roush пропонує приблизно 10 % сховища при наявності успішного стека в порівнянні (і нижче) із приблизно 30-40 %.

Будь-який з вищевказаних відсотків (такий як для 1F/1Ab) або аналогічні співвідношення сховищ можна використовувати для подвійних або потрійних стеків або пірамід за даним винаходом на цукровій тростині.

Є різні шляхи забезпечення сховища, включаючи різні геометричні патерни висадження в полях (згадані вище) і суміші насіння у мішках, як додатково обговорюється Roush et al. (вище) і в патенті США № 6551962.

Усі патенти, заявки на патент, попередні заявки і публікації, що стосуються або цитовані в даному документі, у повному обсязі включені в даний документ для посилання в тому ступені, до якого вони не суперечать положенням даної заявки.

Наступні приклади ілюструють винахід. Приклади не слід розглядати як обмежувальні винахід.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Резюме - Відповідь чутливої і резистентної до Cry1Ab вогнівки цукрової тростини на Cry-білок *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa

Білок Cry1Fa виявляв інсектицидну активність як проти Bt-чутливих (Bt-SS), так і проти Bt-резистентних (Bt-RR) штамів вогнівки цукрової тростини *Diatraea saccharalis*. Штам Bt-RR *D. saccharalis* показав 142-кратну резистентність до трипсин-активованого білка Cry1Ab. Даний Bt-резистентний штам *D. saccharalis* виявив деяку перехресну резистентність до Cry1Fa, але співвідношення резистентності були достовірно нижчими (в 4 рази). На основі цих результатів можна передбачити, що Cry1Fa може бути ефективним в керуванні резистентністю до Cry1Ab у *D. saccharalis* і інших видів вогнівки кукурудзи.

Приклад 2 - Матеріали і методи

Cry-білки *Bacillus thuringiensis*

Очищений трипсин-активований білок Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* (Bt) отримували від Dr. Marianne Puztai-Carey, кафедра біохімії, Університет Кейс Вестерн Резерв, Клівленд, штат Огайо. Cry1Fa отримували від Dow AgroSciences Company (Indianapolis, IN) в буферному розчині. Cry1Ab ліофілізували з чистотою 99,9 %.

5 Джерела комах

Bt-чутливий штам (Bt-SS) *D. saccharalis* отримували з використанням личинок, зібраних на кукурудзяних полях біля Віннсборо в Північній Луїзіані в 2004 р. Bt-резистентний штам (Bt-RR) *D. saccharalis* отримували з сімейства однієї ізоляції з використанням скринінгу покоління F₂. Дані Bt-резистентні комахи завершили розвиток личинкової стадії на виробничих гібридах кукурудзи Cry1Ab і виявили високу резистентність до очищеного трипсин-активованого Cry1Ab-токсину. Під час підтвердження наявності Bt-резистентності окремі особні Bt-резистентного штаму піддавали зворотному схрещуванню з Bt-чутливим штамом і повторно відбирали по резистентності на тканині листа кукурудзи з Cry1Ab в F₂-поколінні гібрида, отриманого зворотним схрещуванням.

15 Біологічні тести з комахами

Чутливість штамів Bt-SS і Bt-RR *D. saccharalis* до Cry1Ab і Cry1Fa визначали з використанням методу включення в корм. У кожному біологічному тесті використовували 6 або 7 концентрацій Cry-білка. Межі концентрацій Bt складали від 0,03125 до 32 мкг/г білка Cry1Ab і від 0,03125 до 128 мкг/г для оцінки білка Cry1Fa. Розчини Cry-білків готували змішуванням Bt-білків з відповідною кількістю дистильованої води для дослідів з Cry1Ab або буфера для дослідів з Cry1Fa. Потім розчини Bt змішували з *meridic* кормом перед розливом корму в окремі ямки в 128-ямковому підносі (Bio-Ba-128, C-D International, Pitman, NJ). У біологічних тестах приблизно 0,7 мл обробленого корму вміщували в кожну ямку з використанням шприців на 10 мл (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Корм, оброблений тільки дистильованою водою (чистий контроль) або буфером, використовували для контрольних обробок. Одна новонароджена особина *D. saccharalis* (протягом <24 год.) вивільнялася на поверхні корму в кожній ямці. Після інокуляції личинок ямки покривали кришками з вентиляційними отворами (C-D International, Pitman, NJ). Підноси для постановки біологічних тестів вміщували в кліматичну камеру при 28°C, 50 % відносній вологості і фотоперіоді 16:8 (світло:темрява). Реєстрували загибель личинок, масу личинок і число личинок, що вижили, у яких був відсутній приріст маси тіла (<0,1 мг на личинку) на 7 добу після інокуляції. Кожну комбінацію штаму комах по концентрації Cry-білка повторювали чотири рази з 16-32 личинками в кожній повторності.

Аналіз даних

Загибель личинок оцінювали по "фактичній" загибелі личинок, коли враховували число фактично загіблених личинок і число личинок, що вижили, без достовірних приростів маси тіла (<0,1 мг на личинку), тобто як мертвих або не споживаючих корм комах. Фактичну загибель *D. saccharalis* в досліді розраховували з використанням рівняння: фактична загибель (%) = $100 \times \frac{\text{число мертвих личинок} + \text{число личинок, що вижили, без достовірних приростів маси тіла} (<0,1 \text{ мг на личинку})}{\text{загальна кількість тестованих комах}}$. У значення показника "фактичної" загибелі (нижче просто "загибель") личинок кожного штаму *D. saccharalis* вносили поправку на загибель личинок, що знаходяться на необробленому контрольному кормі при аналізі Cry1Ab або на кормі, обробленому тільки буфером при оцінці Cry1Fa. Потім скориговані дані по концентрації/загибелі обробляли пробіт-аналізом для визначення концентрацій Cry-білка, які викликали 50 % загибель личинок (LC₅₀), і відповідних 95 % довірчих інтервалів (CI). Обробки, використані в пробіт-аналізі, включали найбільш високу концентрацію, яка викликала нульову загибель, найменшу концентрацію, яка приводила до 100 % загибелі, і всі дані між цим крайніми значеннями. Розраховували співвідношення резистентності розподілом значення LC₅₀ для штаму Bt-RR на даний показник для штаму Bt-SS. Тест співвідношення летальних доз використовували для визначення того, чи є співвідношення резистентності достовірними при рівні значущості $\alpha=0,05$. Двосторонній аналіз ANOVA використовували для аналізу даних по загибелі з подальшим проведенням тесту LSMEANS при рівні значущості $\alpha=0,05$ для визначення відмінностей в обробці.

Інгібування росту личинок *D. saccharalis* на кормі з білком Cry1Ab розраховували з використанням формули: інгібування росту личинок (%) = $100 \times \frac{\text{маса тіла личинок на необробленому контрольному кормі} - \text{маса тіла личинок на Bt-кормі}}{\text{маса тіла личинок на необробленому контрольному кормі}}$, в той час як для аналізу Cry1Fa цей показник розраховували з використанням наступної формули: інгібування росту личинок (%) = $100 \times \frac{\text{маса тіла личинок на контрольному кормі, обробленому тільки буфером} - \text{маса тіла личинок на Bt-кормі}}{\text{маса тіла личинок на контрольному кормі, обробленому тільки буфером}}$. 100 %

інгібування росту личинок відносили за рахунок реплікації, якщо були відсутні личинки, які мали достовірні прирости маси тіла ($<0,1$ мг/личинка). Дані по інгібуванню росту аналізували двостороннім аналізом ANOVA з штамом комах і концентрацією білка Cry як два основні чинники. Тести LSMEANS використовували для визначення відмінностей між обробками при рівні значущості $\alpha=0,05$. Нетрансформовані дані приведені на фігурах і в таблицях.

Приклад 3 - Результати

Загибель личинок штамів Bt-SS і Bt-RR *D. saccharalis* на кормі, обробленому Cry-білками

Білок Cry1Ab (фігура 1): концентрація білка Cry1Ab впливала достовірний чином на загибель личинок *D. saccharalis* обох штамів Bt-SS і Bt-RR ($F=90,67$; $df=6,42$; $P<0,0001$) (фіг. 1). Загибель личинок зростала по мірі збільшення концентрації білка Cry1Ab. Достовірне підвищення загибелі личинок штаму Bt-SS спостерігали в концентрації 0,031 мкг/г або вище, і загибель досягала майже 100 % при 32 мкг/г. Для штаму Bt-RR достовірну загибель спостерігали в концентрації 2 мкг/г, і цей показник досягав 61 % в концентрації 32 мкг/г. Спостерігали достовірні відмінності в загибелі личинок між двома штамми комах ($F=346,73$; $df=1,42$; $P<0,0001$). Загибель личинок, що стосуються штаму Bt-RR, була достовірно нижча ($P<0,05$) в порівнянні з комахами Bt-SS у всіх перевірених концентраціях Cry1Ab. Взаємозв'язок штаму комах і концентрації був також достовірним ($F=18,82$; $df=6,42$; $P<0,0001$). Загибель личинок штаму Bt-RR зростала повільніше в порівнянні зі штамом Bt-SS по мірі підвищення концентрації Cry1Ab.

Розрахункові значення LC_{50} , основані на загибелі личинок, для штамів Bt-SS і Bt-RR склали відповідно 0,13 і 18,46 мкг/г (таблиця 1). Різниця в 142 рази в значеннях LC_{50} між двома штамми була статистично достовірною ($P<0,05$), засновуючись на тесті відношення летальних концентрацій.

Білок Cry1Fa (фіг. 2): білок Cry1Fa виявив інсектицидну активність і тільки деяку перехресну резистентність. Концентрація Cry-білка впливала достовірним чином на загибель личинок *D. saccharalis* для обох штамів Bt-SS і Bt-RR ($F=251,78$; $df=8,54$; $P<0,0001$). Достовірні показники загибелі личинок спостерігали в концентрації 0,125 мкг/г для штаму Bt-SS і в концентрації 0,5 мкг/г для штаму Bt-RR, і цей показник досягав 100 % в концентрації 8 мкг/г для обох штамів. Відмінності в загибелі личинок також були достовірними між двома штамми комах ($F=11,82$; $df=1,54$; $P<0,0011$). Штам Bt-RR мав достовірно більш низьку загибель ($P<0,05$) в концентраціях 0,125; 0,5 і 2 мкг/г в порівнянні зі штамом Bt-SS. Взаємозв'язок штаму і концентрації також був достовірним ($F=8,61$; $df=8,54$; $P<0,0001$). Загалом, загибель личинок штаму Bt-RR в концентраціях Cry-білка <8 мкг/г підвищувалася повільніше в порівнянні зі штамом Bt-SS.

Розрахункові значення LC_{50} , основані на показниках загибелі личинок, для штамів Bt-SS і Bt-RR склали відповідно 0,29 і 1,15 мкг/г (таблиця 1). Різниця в 4 рази в значеннях LC_{50} між двома штамми була статистично достовірною ($P<0,05$), основуючись на тесті відношення летальних концентрацій.

Інгібування росту личинок *D. saccharalis* на кормі, обробленому Cry-білком

Білок Cry1Ab (фіг. 3): інгібування росту личинок штамів Bt-SS і Bt-RR *D. saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому Cry1Ab, статистично достовірно розрізнялося серед концентрацій ($F=175,07$; $df=5,36$; $P<0,0001$). Ріст личинок Bt-SS і Bt-RR знижувався по мірі підвищення концентрацій Cry1Ab. Вплив штаму комах на інгібування росту статистично розрізнявся між штамми Bt-SS і Bt-RR ($F=1182,51$; $df=1,36$; $P<0,0001$). Інгібування росту личинок штаму Bt-SS було достовірно вище в порівнянні зі штамом Bt-RR в діапазоні всіх перевірених концентрацій Bt. У концентрації 0,031 мкг/г, найнижча перевірена концентрація, Bt-RR не виявляв якого-небудь інгібування росту, але ріст личинок Bt-SS інгібувався на >90 % в порівнянні з контролем. У концентрації 0,5 мкг/г штам Bt-RR показував 27 % інгібування росту, в той час як ріст личинок Bt-SS практично повністю зупинявся. Взаємозв'язок штаму комах і концентрації Bt також був достовірним ($F=110,72$; $df=5,36$; $P<0,0001$). Загалом, інгібування росту штаму Bt-RR зростало повільніше по мірі збільшення концентрації Cry1Ab в порівнянні зі штамом Bt-SS.

Білок Cry1Fa (фіг. 4): інгібування росту личинок штамів Bt-SS і Bt-RR *D. saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому білком Cry1Fa, статистично достовірно розрізнялося серед концентрацій ($F=301,69$; $df=7, 48$; $P<0,0001$). Інгібування росту личинок Bt-SS було статистично достовірно вищим ($P<0,05$) в порівнянні з личинками Bt-RR в концентраціях 0,125; 0,5 і 2 мкг/г. Вплив штаму комах на інгібування росту статистично розрізнявся між двома штамми комах ($F=45,88$; $df=1,48$; $P<0,0001$), і взаємозв'язок штаму комах і концентрації Bt також достовірно розрізнявся ($F=18,38$; $df=7,48$; $P<0,0001$). Інгібування росту личинок штаму Bt-SS зростало швидше в порівнянні з цим показником для штаму Bt-RR. Достовірне інгібування росту личинок обох штамів комах спостерігали в концентрації 0,03125 мкг/г. Ріст личинок штаму

Bt-SS повністю інгібувався в концентрації 2 мкг/г, в той час як для Bt-RR це мало місце тільки в концентрації 8 мкг/г.

Джерела літератури

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, England.

- 5 Hua, G., L. Masson, J.L. Jurat-Fuentes, G. Schwab, and M.J. Adang. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Applied and Environmental Microbiology* 67[2], 872-879. 2001.

LeOra Software. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit and logit analysis. Berkeley, CA.

- 10 McGaughey, W.H., F. Gould, and W. Gelernter. Bt resistance management. *Nature Biotechnology* 16[2], 144-146. 1998.

Marcon, P.R.G.C, L.J. Young, K. Steffey, and B.D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92 (2): 280-285.

- 15 Robertson, L.J. and H.K. Preisler. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC Press, Boca Ranton, FL.

SAS Institute Inc. 1988. SAS procedures guide, Release 6.03 edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Stone, B.F. 1968. A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial inheritance of resistance to chemicals. *Bull. WHO* 38:325-329.

- 20 Van Mellaert, FL, J. Botterman, J. Van Rie, and H. Joos. Transgenic plants for the prevention of development of insects resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. (Plant Genetic Systems N.V., Belg. 89-401499[400246], 57-19901205. EP. 5-31-1989.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AGROSCIENCES LLC

<120> КОМБІНОВАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БІЛКІВ CRY1FA І CRY1AB ДЛЯ БОРОТЬБИ З
ВОГНІВКОЮ ЦУКРОВОЇ ТРОСТИНИ, РЕЗИСТЕНТНОЮ ДО CRY-БІЛКА, І ДЛЯ
КЕРУВАННЯ РЕЗИСТЕНТІСТЮ КОМАХ НА ЦУКРОВІЙ ТРОСТИНИ

<130> DAS-P0162-US-03

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 605

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Cry1Fa

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Trp Glu Ala Asn Pro Asn Asn Ala Gln Leu Arg Glu Asp Val
115 120 125

Arg Ile Arg Phe Ala Asn Thr Asp Asp Ala Leu Ile Thr Ala Ile Asn
130 135 140

Asn Phe Thr Leu Thr Ser Phe Glu Ile Pro Leu Leu Ser Val Tyr Val
145 150 155 160

Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Ala Val Ser Phe
165 170 175

Gly Gln Gly Trp Gly Leu Asp Ile Ala Thr Val Asn Asn His Tyr Asn
180 185 190

Arg Leu Ile Asn Leu Ile His Arg Tyr Thr Lys His Cys Leu Asp Thr
195 200 205

Tyr Asn Gln Gly Leu Glu Asn Leu Arg Gly Thr Asn Thr Arg Gln Trp
210 215 220

Ala Arg Phe Asn Gln Phe Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu Asp
225 230 235 240

Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Val Arg Thr Tyr Pro Ile Gln
245 250 255

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Ser Ser Val Ile Glu
260 265 270

Asp Ser Pro Val Ser Ala Asn Ile Pro Asn Gly Phe Asn Arg Ala Glu
275 280 285

Phe Gly Val Arg Pro Pro His Leu Met Asp Phe Met Asn Ser Leu Phe
290 295 300

Val Thr Ala Glu Thr Val Arg Ser Gln Thr Val Trp Gly Gly His Leu
305 310 315 320

Val Ser Ser Arg Asn Thr Ala Gly Asn Arg Ile Asn Phe Pro Ser Tyr
325 330 335

Gly Val Phe Asn Pro Gly Gly Ala Ile Trp Ile Ala Asp Glu Asp Pro
340 345 350

Arg Pro Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Pro Val Phe Val Arg Gly Gly
355 360 365

Phe Gly Asn Pro His Tyr Val Leu Gly Leu Arg Gly Val Ala Phe Gln
370 375 380

Gln Thr Gly Thr Asn His Thr Arg Thr Phe Arg Asn Ser Gly Thr Ile
385 390 395 400

Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asp Asn Ser Gly Ala Pro Trp
405 410 415

Asn Asp Tyr Ser His Val Leu Asn His Val Thr Phe Val Arg Trp Pro
420 425 430

Gly Glu Ile Ser Gly Ser Asp Ser Trp Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp
435 440 445

Thr His Arg Ser Ala Thr Pro Thr Asn Thr Ile Asp Pro Glu Arg Ile
450 455 460

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala His Thr Leu Gln Ser Gly Thr Thr
465 470 475 480

Val Val Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
485 490 495

Ser Gly Gly Pro Phe Ala Tyr Thr Ile Val Asn Ile Asn Gly Gln Leu
500 505 510

Pro Gln Arg Tyr Arg Ala Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu
515 520 525

Arg Ile Tyr Val Thr Val Ala Gly Glu Arg Ile Phe Ala Gly Gln Phe
530 535 540

Asn Lys Thr Met Asp Thr Gly Asp Pro Leu Thr Phe Gln Ser Phe Ser
545 550 555 560

Tyr Ala Thr Ile Asn Thr Ala Phe Thr Phe Pro Met Ser Gln Ser Ser
565 570 575

Phe Thr Val Gly Ala Asp Thr Phe Ser Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile
580 585 590

Asp Arg Phe Glu Leu Ile Pro Val Thr Ala Thr Leu Glu
595 600 605

<210> 2
<211> 612
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Cry1Ab

<400> 2

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 Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
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 Ala 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 Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg 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 Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
 275 280 285
 Arg 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 Leu Tyr Arg
 355 360 365
 Arg 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
    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 Val 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

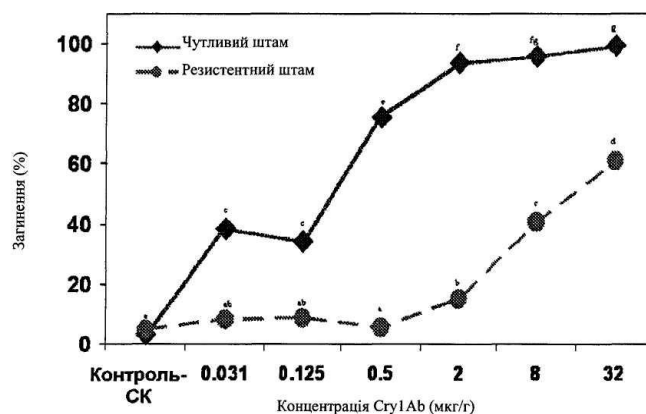
Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu
    595                                600                                605

Val Thr Phe Glu
    610

```

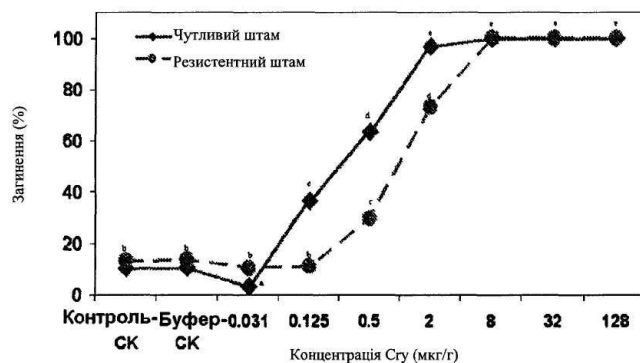
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Трансгенна рослина цукрової тростини, яка містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab.
2. Трансгенна рослина цукрової тростини за п. 1, в якій ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Fa, і ДНК, що кодує коровий токсиновмісний білок Cry1Ab, інтрогресовані у вказану рослину цукрової тростини.
- 10 3. Частина трансгенної рослини за п. 1, яка містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab.
4. Плід розмноження живцюванням або клонального розмноження трансгенної рослини за п. 1, який містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab.
- 15 5. Сукупність рослин, що містить не-Bt-рослини сховища і множину трансгенних рослин за п. 1, де вказані рослини сховища складають менше ніж 40 % від всіх рослин у вказаній сукупності рослин.
6. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини сховища складають менше ніж 30 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
- 20 7. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини сховища складають менше ніж 20 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
8. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини сховища складають менше ніж 10 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
9. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини сховища складають менше ніж 5 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
- 25 10. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини сховища знаходяться в блоках або смугах.
11. Сукупність за п. 5, де вказані рослини цукрової тростини займають площу більше 10 акрів.
12. Рослина цукрової тростини за п. 1, де вказаний білок Cry1Fa щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:1, і вказаний білок Cry1Ab щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:2.
- 30



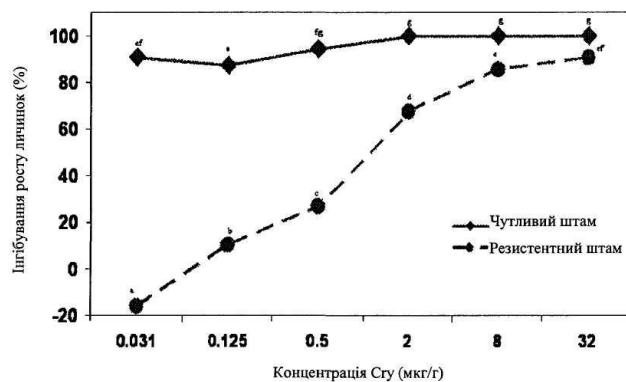
Загибель (% середнє±стандартна помилка середнього) Bt-чутливих і Bt-резистентних штамів *Diatraea saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому білком Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* на 7 добу після інюкуляції. Показник загибелі визначали у вигляді числа мертвих личинок плюс личинки, що вижили, у яких були відсутні достовірні прирости маси тіла (<0,1 мг/личинка) в 7-денному біологічному тесті, поділене на загальне число личинок в тесті. Середні значення по всіх обробках під однією буквою статистично не достовірні ($P<0,05$; тест LSMEANS)

Фіг. 1



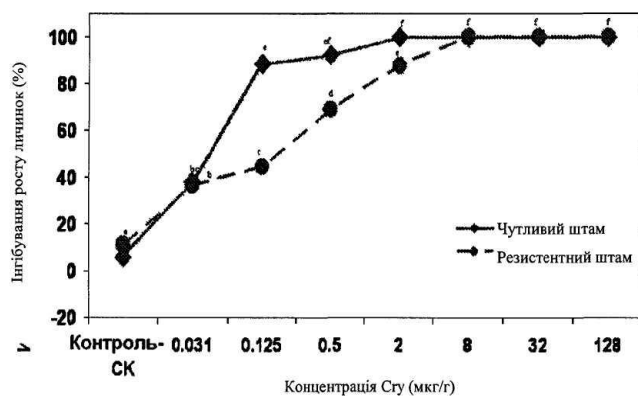
Загибель (% середнє±стандартна помилка середнього) Bt-чутливих і Bt-резистентних штамів *Diatraea saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому білком Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* на 7 добу після інюкуляції. Показник загибелі визначали у вигляді числа мертвих личинок плюс личинки, що вижили, у яких були відсутні достовірні прирости маси тіла (<0,1 мг/личинка) в 7-денному біологічному тесті, поділене на загальне число личинок в тесті. Середні значення по всіх обробках під однією буквою статистично не достовірні ($P<0,05$; тест LSMEANS).

Фіг. 2



Інгібування росту личинок (% середнє±стандартна помилка середнього) Bt-чутливих і Bt-резистентних штамів *Diatraea saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому білком Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* на 7 добу після інюкуляції. Процентні значення розраховували з використанням формули: інгібування росту (%) = $100 \times (\text{маса тіла личинок, що знаходилися на необробленому контрольному кормі} - \text{маса тіла личинок, що знаходилися на кормі з Cry1Ab}) / (\text{маса тіла личинок, що знаходилися на необробленому контрольному кормі})$. 100% інгібування росту відносили до реплікації, якщо були відсутні достовірні прирости (<0,1 мг/личинка). Середні значення по всіх обробках під однією буквою статистично не достовірні ($P < 0,05$; тест LSMEANS).

Фіг. 3



Інгібування росту личинок (% середнє±стандартна помилка середнього) Bt-чутливих і Bt-резистентних штамів *Diatraea saccharalis*, що знаходяться на кормі, обробленому білком Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* на 7 добу після інюкуляції. Процентні значення розраховували з використанням формули: інгібування росту (%) = $100 \times (\text{маса тіла личинок, що знаходилися на контрольному кормі, обробленому тільки буфером} - \text{маса тіла личинок, що знаходилися на Bt-кормі або необробленому кормі (чистий контроль)}) / (\text{маса тіла личинок, що знаходилися на контрольному кормі, обробленому тільки буфером})$. 100% інгібування росту відносили до реплікації, якщо були відсутні достовірні прирости (<0,1 мг/личинка). Середні значення по всіх обробках під однією буквою статистично не достовірні ($P < 0,05$; тест LSMEANS).

Фіг. 4

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601