



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111935** (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 ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2012 08655</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>16.12.2010</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.07.2016</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/284,290</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.12.2009</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: <b>US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2010/060830, 16.12.2010</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Мід Томас (US), Нарва Кеннет (US), Сторер Ніколас П. (US), Шитс Джоел Дж. (US), Вуслі Аарон Т. (US), Бертон Стефані Л. (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ,</b> 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>AHMAD ANWAAR ET AL: "Expression of synthetic cry1Ab and cry1Ac genes in Basmati rice (Oryza sativa L.) variety 370 via Agrobacterium-mediated transformation for the control of the European corn borer (Ostrinia nubilalis)", IN VITRO CELLULAR &amp; DEVELOPMENT BIOLOGY. PLANT, GAITHERSBURG, MD, US, vol. 38, no. 2, 01.03.2002, pages 213-220 US 2008311096 A1, 18.12.2008</b></p>
--	---

**(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЯКА МІСТИТЬ ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Ab, І ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Be, ДЛЯ КЕРУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ КОМАХ**

**(57) Реферат:**

Даний винахід стосується способів і рослин для боротьби з кукурудзяним стебловим метеликом і/або кукурудзяною листовою совкою, де вказані рослини містять інсектицидний білок Cry1Ab і інсектицидний білок Cry1Be, і різні комбінації інших білків, що містять дану пару білків, для затримки або попередження розвитку резистентності у комах.

UA 111935 C2



## Рівень техніки

Люди вирощують кукурудзу для отримання продуктів харчування і енергії. Люди також обробляють багато інших сільськогосподарських культур, включаючи соєві боби і бавовники. Щорічно мільярди доларів витрачаються на боротьбу з комахами-шкідниками, і ще мільярди

5 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 галузях зіграли досить важливу роль. Можливість отримання стійких до комах рослин за допомогою трансформації генів інсектицидних Bt-білків, привела до

10 революційних перетворень в сучасному сільському господарстві, і підкреслила важливість і значення інсектицидних білків і їх генів.

Деякі Bt-білки використали 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.

15

Промислово-доступні продукти, експресуючі 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

20 затримки розвитку резистентності у чутливих популяцій комах (наприклад, Cry1Ac і Cry2Ab в комбінації в бавовнику для забезпечення керування резистентністю у тютюнової листовійки). Дивись також публікацію заявки на патент США № 2009/0313717, яка стосується білка Cry2 плюс Vip3Aa, Cry1F або Cry1A для боротьби з *Helicoverpa zea* або *armigera*. Міжнародна заявка WO 2009/132850 стосується Cry1F або Cry1A і Vip3Aa для боротьби з *Spodoptera frugiperda*. Публікація заявки на патент США № 2008/0311096 частково стосується Cry1Ab для боротьби з кукурудзяним стебловим метеликом, резистентним до Cry1F (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)).

25

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, продукованих 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 з спільним розміщенням інших токсинів (McGaughey et al. (1998) «B.t. Resistance Management», *Nature Biotechnol.*, 16:144-146).

30

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 іншого 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.

35

При відсутності резистентних популяцій комах можна провести прогностичні оцінки, основані на інших характеристиках, приблизно зв'язаних з механізмом дії і можливістю розвитку перехресної резистентності. Було запропоновано використати 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.

40

У тому випадку, коли два Bt-токсини конкурують у комах за один і той самий 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). Тобто, комаха має перехресну резистентність до обох Bt-токсинів. 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.

45

Наприклад, білок Cry1Fa використовується для боротьби з багатьма лускокрилими комахами, включаючи кукурудзяного стеблового метелика (Hubner) 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

50

55

60

TC1507, відповідальний за ведучу в галузі ознаку резистентності комах в заходах для боротьби з FAW. Білок Cry1Fa також входить до складу продуктів Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

Можливість провести дослідження, ґрунтовані 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.

Додаткові Cry-токсини приводяться на веб-сайті офіційного комітету по номенклатурі У цей час відоме майже 60 основних груп «Cry»-токсинів (Cry1-Cry59) з додатковими Cyt- і VIP-токсинами і тому подібне. Багато з кожної нумераційної групи поділяються на підгрупи під великою літерою, і підгрупи під великою літерою поділяються на підпідгрупи, позначені малою літерою (наприклад, Cry1 має A-L, і Cry1A має a-i).

Суть винаходу

Даний винахід частково стосується дивного відкриття того, що Cry1Ab і Cry1Be не конкурують за сайти зв'язування в мембранних препаратах клітин кишечника кукурудзяного стеблового метелика (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)) або кукурудзяної листової совки (FAW; *Spodoptera frugiperda*). Як це буде зрозуміле фахівцям в даній галузі за допомогою даного розкриття, рослини, які продукують два ці білки (включаючи інсектицидні фрагменти повнорозмірних білків), можуть затримувати або попереджати розвиток резистентності до будь-якого одного з даних інсектицидних білків. Кукурудза і соєві боби є тільки деякими переважними рослинами. ECB представляє переважний шкідник-мішень для даної пари токсинів.

Таким чином, даний винахід частково стосується застосування білка Cry1Ab в комбінації з білком Cry1Be. Рослини (і території, засаджені такими рослинами), які продукують обидва таких білка, включені в об'єм даного винаходу.

Даний винахід також стосується потрібних стеків або «пірамід» з трьох (або більше) токсинів, в яких білки Cry1Ab і Cry1Be є основною парою. У деяких переважних варіантах здійснення пірамід комбінація вибраних токсинів забезпечує три сайти дії проти ECB. Деякі переважні пірамідні комбінації з «трьома місцями дії» включають основну пару білків за даним винаходом плюс Cry2A, Cry1I і DIG-3 як третій білок для цілеспрямованої дії на ECB. Такі конкретні потрібні стеки будуть, за даним винаходом, переважно і разуче забезпечувати три сайти дії проти ECB. Це може допомогти знизити або елімінувати необхідність в територіях-«сховищах».

Незважаючи на те, що даний винахід розкривається в даному документі у вигляді пари токсинів Cry1Ab і Cry1Be, яких окремо або в «піраміді» з трьох або більше токсинів, які забезпечують стійкість кукурудзи до ECB, очевидно, зрозуміло, що комбінації Cry1Ab і Cry1Be, описані в даному документі, також можна використати з додатковими білками для цілеспрямованого впливу на FAW на соєвих бобах і кукурудзі.

Також за даним винаходом можна додати додаткові токсини/гени. Наприклад, якщо Cry1Fa піддають стекингу з парою білків за даним винаходом (Cry1Fa і Cry1Be обидва активні проти FAW і ECB), то додавання одного додаткового білка до даного потрібного стека, де четвертий доданий білок спрямований проти ECB, буде забезпечувати три сайти дії проти FAW, і три сайти дії проти ECB. Такий доданий білок (четвертий білок для направленої дії проти FAW) можна вибрати з групи, що складається з Cry1Fa, Vip3Ab і Cry1E. Це буде приводити до забезпечення стека з чотирьох білків, що має три сайти дії проти двох комах (ECB і FAW).

Короткий опис таблиць

Таблиця 1: приводяться приклади амінокислот з чотирьох класів амінокислот.

Короткий опис фігур

Фіг. 1: представлений графік, що показує зв'язування в процентах міченого Cry1Ab з ECB BBMV в порівнянні з Cry1Be.

Фіг. 2: представлений графік, що показує зв'язування в процентах міченого Cry1Ab з FAW BBMV в порівнянні з Cry1Be.

Фіг. 3: представлений графік, що показує зв'язування в процентах міченого Cry1Be з FAW BBMV в порівнянні з Cry1Ab.

Докладний опис винаходу

Даний винахід частково стосується дивного відкриття того, що Cry1Ab і Cry1Be не конкурують один з одним за сайти зв'язування в кишечнику кукурудзяного стеблового метелика (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hubner)) або кукурудзяної листової совки (FAW; *Spodoptera frugiperda*). Таким чином, білок Cry1Ab можна використати в комбінації з білком Cry1Be в трансгенній кукурудзі (і інших рослинах, наприклад, бавовнику і соєвих бобах) для затримки і попередження розвитку резистентності у ECB до будь-якого одного з даних білків. Пара білків за даним винаходом може бути ефективною в захисті рослин (таких як рослини кукурудзи) від

пошкодження ECB з резистентністю до Cry. Тобто, одним застосуванням даного винаходу є захист кукурудзи і інших економічно важливих видів сільськогосподарських культур від пошкодження і втрат урожаю, викликаного популяціями ECB, в яких може розвинути резистентність до Cry1Ab або Cry1Be.

5 Таким чином, даний винахід стосується стека для керування резистентністю у комах (IRM), що включає Cry1Ab і Cry1Be, для попередження або пригнічення розвитку резистентності ECB до одного або обох даних білків.

Крім того, незважаючи на те, що даний винахід, розкритий в даному документі, стосується стека IRM, що містить Cry1Ab і Cry1Be, для попередження резистентності ECB до одного або 10 обох даних білків, в об'ємі винаходу, розкритого в даному документі, знаходиться те, що один або обидва Cry1Ab і Cry1Be можна адаптувати, самостійно або в комбінації, для попередження резистентності FAW до одного або обох даних білків.

Даний винахід стосується композицій для боротьби з лускокрилими шкідниками, що містять клітини, які продукують істинний токсинвмісний білок Cry1Ab і істинний токсинвмісний білок 15 Cry1Be.

Винахід додатково включає хазяїна, трансформованого для продукції як інсектицидного білка Cry1Ab, так і інсектицидного білка Cry1Be, де вказаний хазяїн є мікроорганізмом або рослинною клітиною. Полінуклеотид(и) за даним винаходом переважно знаходиться в генетичній конструкції під контролем не-Bacillus thuringiensis промотору(ів). Полінуклеотиди за 20 даним винаходом можуть містити кодон, переважний для застосування в рослинах для підвищеної експресії.

Додатково передбачається, що винахід стосується способу боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає контактування вказаних шкідників або навколишнього середовища вказаних шкідників з ефективною кількістю композиції, яка містить інсектицидний білок Cry1Ab і 25 додатково містить інсектицидний білок Cry1Be.

Варіант здійснення винаходу стосується рослини кукурудзи, що містить експресований в рослині ген, що кодує істинний токсинвмісний білок Cry1Be, і експресований в рослині ген, що кодує істинний токсинвмісний білок Cry1Ab, і насіння такої рослини.

Додатковий варіант здійснення винаходу стосується рослини кукурудзи, де експресований в 30 рослині ген, що кодує істинний токсинвмісний білок Cry1Be, і експресований в рослині ген, що кодує істинний токсинвмісний білок Cry1Ab, інтрогресовані у вказану рослину кукурудзи, і насіння такої рослини.

Як описано в прикладах, досліді з конкурентним зв'язуванням з рецептором з використанням мічених радіоактивною міткою білків Cry1Ab і Cry1Be показують, що білок 35 Cry1Be не конкурує за зв'язування в тканинах ECB або FAW, з якими зв'язується Cry1Ab. Дані результати також вказують на те, що комбінація білків Cry1Ab і Cry1Be може бути ефективним засобом для пригнічення розвитку резистентності в популяціях ECB і FAW до одного з двох даних білків. Таким чином, основуючись частково на даних, описаних в цьому документі, вважається, що спільна продукція (стекинг) білків Cry1Ab і Cry1Be може використовуватися для 40 високоефективного стека IRM для ECB.

До цієї пари можна додати інші білки. Наприклад, даний винахід також частково стосується 45 потрібних стеків або «пірамід» з трьох (або більше) токсинів, в яких Cry1Ab і Cry1Be є основною парою. У деяких переважних варіантах здійснення пірамід вибрані токсини мають три окремих сайти дії проти FAW. Деякі переважні пірамідні комбінації з «трьома сайтами дії» включають основну пару за даним винаходом плюс Cry1Fa, Vip3Ab, Cry1C, Cry1D або Cry1E як третій білок для цілеспрямованої дії на FAW. Дані конкретні потрібні стеки за даним винаходом будуть переважно і разюче забезпечувати три місця сайти проти FAW. Це допоможе знизити або елімінувати потребу в територіях-сховищах. Під виразом «окремі сайти дії» розуміється, що 50 будь-який з даних білків не викликає перехресної резистентності в іншому.

До даного винаходу також можна додати додаткові токсини/гени. Наприклад, якщо Cry1Fa 55 входить до складу стека з парою білків за даним винаходом (обидва Cry1Ab і Cry1Be активні проти обох FAW і кукурудзяного стеблового метелика (ECB)), то додавання одного додаткового білка до даного потрібного стека, де четвертий доданий білок направлений проти ECB, буде забезпечуватися три сайти дії проти FAW і три сайти дії проти ECB. Даний доданий білок (четвертий білок) можна вибрати з групи, що складається з Cry2A, Cry1I і DIG-3 (дивись заявку на патент США № 61/284278 (подану 16 грудня 2009) і заявку на патент США № 2010/00269223). Це буде приводити до отримання стека з чотирьох білків, що містить три сайти дії проти комах (ECB і FAW).

Таким чином, однією можливістю впровадження є застосування пари білків за даним 60 винаходом в комбінації з третім токсином/геном і застосування даного потрібного стека для

пригнічення розвитку резистентності у ECB і/або FAW до будь-якого з даних токсинів. Отже, даний винахід також частково стосується потрійних стеків або «пірамід» з трьох (або більше) токсинів. У деяких переважних варіантах здійснення пірамід вибрані токсини мають три окремі сайти дії проти ECB і/або FAW.

5 Серед можливостей впровадження за даним винаходом буде застосування двох, трьох або більше білків з білків за даним винаходом в районах з обробкою сільськогосподарських культур, де можуть розвинутиися резистентні популяції ECB і/або FAW.

Керівництво по застосуванню Cry1Fa і Cry1Be (для боротьби з ECB і/або FAW) дивись в заявці на патент США № 61/284290 (поданої 16 грудня 2009). З Cry1Fa, активним проти ECB (і FAW), Cry1Ab плюс Cry1Be, плюс Cry1Be за даним винаходом переважно і дивно забезпечуються три сайти дії проти ECB. Це може допомогти знизити або елімінувати потребу в територіях-сховищах.

15 Білок Cry1Fa входить до складу продуктів Herculex<sup>®</sup>, SmartStax<sup>™</sup> і WideStrike<sup>™</sup>. Пару генів за даним винаходом (Cry1Ab і Cry1Be) можна об'єднати, наприклад, в продукті на основі Cry1Fa, такому як Herculex<sup>®</sup>, SmartStax<sup>™</sup> і WideStrike<sup>™</sup>. Отже, пара білків за даним винаходом може бути ефективною в зниженні тиску відбору на дані і інші білки. Таким чином, пару білків за даним винаходом можна використати в комбінаціях з трьох генів для кукурудзи і інших рослин (наприклад, бавовнику і соєвих бобів).

20 Як вже обговорювалося вище, до даного винаходу також можна додати додаткові токсини/гени. Для цілеспрямованого впливу на ECB можна використати Cry2A, Cry1I і/або DIG-3. Дивись, наприклад, заявку на патент США № 61/284278 (подану 16 грудня 2009) і заявку на патент США № 2010/00269223. Інформацію по комбінації Cry1F і Cry1Ab (для боротьби з ECB) дивись в публікації заявки на патент США № 2008/0311096.

25 Рослини (і території, засаджені такими рослинами), які продукують будь-яку з комбінацій білків за даним винаходом, включаються в об'єм даного винаходу. Також можна додати додаткові токсини/гени, але конкретні стеки, обговорені вище, переважно і разуче забезпечують численні сайти дії проти ECB і/або FAW. Це може допомогти знизити або елімінувати потребу в територіях-сховищах. Таким чином, поле площею більше 10 акрів, засаджене такими рослинами, включається в об'єм винаходу.

30 GENBANK також можна використати для отримання послідовностей будь-якого з генів і білків, які обговорюються в даному документі. Дивись Додаток А нижче. Також можна використати патенти. Наприклад, в патенті США № 5188960 і патенті США № 5827514 описані істинний токсинвмісні білки Cry1F, відповідні для застосування в здійсненні винаходу. У патенті США № 6218188 описані ДНК-послідовності, оптимізовані для застосування в рослинах, кодуєчі істинні токсинвмісні білки Cry1Fa, які підходять для використання в даному винаході.

35 Комбінації білків, описані в даному документі, можна використати для боротьби з лускокрилими шкідниками. Дорослі лускокрилі комахи і метелики харчуються, головним чином, нектаром квітів і є основними ефекторами загибелі. Майже всі личинки лускокрилих комах, тобто гусениці, харчуються на рослинах, і багато хто з них є серйозними шкідниками. Гусениці харчуються на поверхні і всередині листя, або на корінні або стеблині рослин, тим самим лишаючи рослину поживних речовин і часто руйнуючи фізичну підтримуючу структуру рослини. Крім того, гусениці харчуються на фруктах, бавовні і зернах, що зберігаються, а також квітах, руйнуючи ці продукти, призначені для продажу, або серйозно знижують їх якість. У тому значенні, в якому в даному документі використовується термін «лускокрилі шкідники», він

45 стосується різних стадій розвитку шкідника, включаючи личинкові стадії. Деякі химерні токсини за даним винаходом включають повний N-кінцевий фрагмент, відповідний істинному токсину Bt-токсину, в тій же точці після кінця фрагмента істинного токсину білок має перехід в гетерологічну послідовність протоксину. N-кінцевий, активний як інсектицид фрагмент токсину в Bt-токсині, далі стосується «істинного токсину». Перехід сегмента істинного токсину в сегмент гетерологічного протоксину знаходиться приблизно в з'єднанні токсину/протоксину, або альтернативно фрагмент нативного протоксину (що тягнеться за фрагментом істинного токсину) може зберегтися, з переходом в гетерологічний протоксин, що розташовується даунстрім.

50 Як приклад один химерний токсин за даним винаходом має повний фрагмент істинного токсину білка Cry1Ab (амінокислоти 1-601) і/або гетерологічний протоксин (приблизно амінокислоти 602 до C-кінця). В одному переважному варіанті здійснення фрагмент химерного токсину, що містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab. У переважному варіанті здійснення фрагмент химерного токсину, що містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab.

60 Фахівцям в даній галузі, очевидно зрозуміло, що Bt-токсини, навіть всередині певного класу,

такого як Cry1Be, до деякої міри будуть варіювати в довжині і точному положенні переходу від фрагмента істинного токсину до фрагмента протоксину. Як правило, токсини Cry1Be мають довжину приблизно від 1150 до приблизно 1200 амінокислот. Звичайно перехід від фрагмента істинного 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 істинного токсину. Таким чином, химерний токсин буде включати щонайменше приблизно 50% від повної довжини Cry1Be. Це буде становити щонайменше приблизно 590 амінокислот. Відносно фрагмента протоксину, то повна експансія фрагмента протоксину Cry1Ab буде тягнутися від кінця фрагмента істинного токсину до C-кінця молекули.

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, кордони представляють приблизно 95% (Cry1Ab's і Cry1Be's), 78% (Cry1Ab's і Cry1Be'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 пороги відсікання молекулярної маси також можуть бути застосовні тільки до істинних токсинів.

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, депонованих 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 використати 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 використати 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 негативного 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 WO 93/16094. 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 використати як ПЛР-праймери для ампліфікації генів за даним винаходом.

Варіантні токсини. 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 найвищою в найважливіших 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 чекати, що такі заміни знаходяться в областях, які не є важливими для вияву 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 наводиться перелік прикладів амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця 1

Приклади амінокислот в чотирьох класах амінокислот

Клас амінокислоти	Приклади амінокислот
Неполярні	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Незаряджені полярні	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Кислі	Asp, Glu
Основні	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 хазяїни. 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 використати для отримання Bt-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 з 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 Bt-токсину вводять в мікроорганізм-хазяїн за допомогою відповідного вектора, і на вказаний хазяїн впливають середовищем в живому стані, то важливо, щоб використовувалися певні мікроорганізми-хазяїни. Вибирають мікроорганізми-хазяїни, про яких відомо, що вони проживають в «фітосфері» (філоплані, філосфері, ризосфері і/або ризоплані) однієї або більше цікавлячих культур. Дані мікроорганізми вибирають таким чином, щоб вони були здатні успішно конкурувати в певному навколишньому середовищі (культура і інші комахи-жителі) з мікроорганізмами дикого типу для забезпечення стабільної підтримки і експресії гена, що експресує поліпептид-пестицид, і бажано, забезпечення підвищеного захисту пестициду від деградації і інактивації в навколишньому середовищі.

Відома велика кількість мікроорганізмів, які проживають в філоплані (на поверхні листя рослин) і/або ризосфері (в ґрунті, що 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 проживають в фітосфері, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroids*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azotobacter vinlandii*, і види дріжджів фітосфери, такі як *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* 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 зведення.

Обробка клітин. *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, експресуючі Bt-токсини, можна обробити для пролонгування активності токсинів і стабілізації клітини. Пестицидна мікрокапсула, яка утвориться, містить Bt-токсин або Bt-токсини в клітинній структурі, яка стабілізована і буде захищати токсин, коли мікрокапсула піддається впливу навколишнього середовища шкідника-мішені. Відповідні клітини-хазяї можуть включати прокаріоти або еукаріоти, і звичайно обмежуються клітинами, які не продукують речовин, токсичних для вищих організмів, таких як ссавці. Однак можна використати 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-хазяїна. 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, хоча, в деяких випадках можна використати спори.

Обробку клітини мікроорганізму, наприклад, мікроорганізму, що містить ген або гени Bt-токсину, можна провести хімічним або фізичним методами, або комбінацією хімічного і/або фізичного методів, за умови, що метод не впливає негативним чином на властивості токсину і не знижує здатності клітин захищати токсин. Прикладами хімічних реагентів є галогеновані сполуки, зокрема, галогеновмісні сполуки з 17-80 атомами. Конкретніше, можна використати 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 Люголя, 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, продукovanого в клітині, коли клітину вводять в середовище хазяїна. 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 зведення.

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-хазяїна для цілей продукції, включають простоту введення Bt-гена або Bt-генів хазяїну, доступність експресійних систем, ефективність експресії, стабільність пестициду в хазяїні і наявність додаткових генетичних властивостей. Характеристики, що представляють особливий інтерес для застосування як мікрокапсули 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.

Ріст клітин. Клітина-хазяїн, що містить інсектицидний Bt-ген або Bt-гени, можна культивувати в будь-якому звичайному поживному середовищі, в якому ДНК-конструкція забезпечує виборчу 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 збирання.

Bt-клітини, продукуючі 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 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 насінин або агента для обробки коріння, загальної обробки рослин на більш пізніх стадіях вегетаційного періоду. Для обробки рослин і ґрунту Bt-клітинами можна використати змочувані порошки, гранули або дисти, які отримують 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, рисове лушпиння, шкаралупа горіхів і тому подібне). Препаративні форми можуть включати ад'юванти прилипали, 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 подібного. 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 в залежності 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 частинок 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 (рідина або суха речовина) до 1 кг або більше 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. Після кожної маніпуляції ДНК-послідовність, що використовується, 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 правий кордон, але часто правий і лівий кордон T-ДНК Ti- або Ri-плазмиди, потрібно з'єднати у вигляді фланкуючої області генів, призначених для вставки. Застосування T-ДНК для трансформації рослинних клітин інтенсивно

досліджувалося і в достатній мірі описано в Європейському патенті 120516, Lee and Gelvin (2008), Ноекема (1985), Fraley et al. (1986) і An et al. (1985), і добре відомо в даній галузі.

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

Є велика кількість методів для інсерції ДНК в рослинну клітину-хазяїна. Такі методи  
 10 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 плазмідні, а саме в проміжний вектор або бінарний вектор. Проміжні вектори можна інтегрувати в Ti- або  
 15 Ri-плазміді гомологічною рекомбінацією завдяки послідовностям, які є гомологічними до послідовностей Т-ДНК. Ti- або Ri-плазміді 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  
 20 включають селективний ген-маркер і лінкер або полілінкер, який вставлений в рамку правої і лівої приграничних областей Т-ДНК. Їх можна безпосередньо трансформувати в *Agrobacteria* (Holsters et al., 1978). При використанні як клітини-хазяїна *Agrobacterium* повинні містити плазміді, що несе vir-область. Vir-область необхідна для перенесення Т-ДНК в рослинну клітину. Можуть міститися додаткові Т-ДНК. Трансформовану таким чином бактерію  
 25 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 стеблини, коріння, а також протопластів або культивованих в суспензії клітин) у відповідному середовищі, яке може містити антибіотики або  
 30 біоциди за винаходом. Потім отримані таким чином рослини можна тестувати на присутність вставленої ДНК. Відсутні особливі вимоги у відношенні плазмід у випадку методів ін'єкції і електропорації. Можна використати звичайні плазмідні, наприклад, такі як похідні pUC.

Трансформовані клітини розвиваються в рослинах звичайним шляхом. Вони можуть утворити зародкові клітини і передати трансформовану ознаку(и) потомству рослин. Такі  
 35 рослини можна вирощувати звичайним шляхом і схрещувати з рослинами, які мають ті ж трансформовані спадкові фактори або інші спадкові фактори. 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,  
 40 наприклад, патент США № 5380831, який включений в даний документ для зведення. Незважаючи на те, що в даному документі як приклад приводяться зрізані токсини, добре відомо в галузі Bt-токсинів, що токсини масою 130 kDa (повна довжина) мають N-кінцевий фрагмент, який є істинним токсином, і C-кінцевий фрагмент є «хвостом» протоксину. Таким чином, відповідні «хвости» можна використати із зрізаними/істинними токсинами за даним  
 45 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 Cry1Ab, і додатково містить другий експресований в рослині ген, що кодує білок Cry1Be.

Перенесення (або інтрогресію) ознаки(ознак), що визначається Cry1Ab і Cry1Be, в інбредні  
 50 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 Cry1Be. Потомство даного гібрида потім зворотно схрещують з  
 55 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(и), потомство буде гетерозиготним відносно локусів, контролюючих ознаку(и), яка переноситься, але буде таким же  
 60 як рекурентна батьківська форма відносно більшості або майже всіх інших генів (дивись,

наприклад, Poehlman&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 «нагромодження» 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/opppbpd1/biopesticides/pips/bt\_corn\_refuge\_2006.htm) приводяться наступні вимоги для забезпечення нетрансгенних (тобто не-Bt) сховищ (розділ не-Bt культури/кукурудзи) для застосування з трансгенними культурами, продукуючими один Bt-білок, активний проти шкідників-мішеней.

«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 поле

Смуги повинні мати ширину щонайменше 4 ряди (переважно 6 рядів) для зниження ефектів, зв'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 у відношенні вимог для сховищ. Наприклад:

«Вимоги відносно IRM кукурудзяного стеблового метелика:

засадити, щонайменше, 20% територій з кукурудзою гібридами сховища;

у районах з виробництвом бавовни сховище повинно складати 50%;

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

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

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

не можна використовувати інсектициди, що обприскуються, на основі Bt на кукурудзі сховища;

відповідне сховище повинно бути засаджено у кожному господарстві з Bt-кукурудзою».

Як стверджує Roush et al. (на сторінках 1780 і 1784 правого стовпчика, наприклад), «стекинг» або «накопичення» двох різних білків, де кожний ефективний проти шкідників-мішеней і з низькою або відсутністю перехресної резистентності, дозволяє використовувати менше сховище. Roush пропонує, що при наявності успішного стека розмір сховища менше 10% може забезпечити порівнянне з приблизно 50% сховищем керування резистентністю для однієї (непірамідної) ознаки. Для наявних у даний час пірамідованих продуктів Bt-кукурудзи Агентство по охороні навколишнього середовища вимагає наявності значно меншого (у загальному 5%) структурованого сховища для засівання не-Bt-кукурудзою в порівнянні з продуктами з однією ознакою (у загальному 20%).

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

Усі наведені вище або аналогічні співвідношення сховищ можна використовувати для даних подвійних або потрійних стеків або пірамід. Для потрійних стеків із трьома сайтами дії проти однієї шкідника-мішені метою буде нульове сховище (або, наприклад, менше ніж 5% сховище). Це особливо вірно для виробничих земель, наприклад, площею більше 10 акрів.

Усі патенти, заявки на патент, попередні заявки і публікації, що стосуються або цитовані в даному документі, у повному обсязі включені в даний документ для зведення в тій мірі, до якої вони не суперечать положенням даної заявки.

Якщо не зазначено або не мається на увазі інше, то в тому сенсі, в якому в даному документі використовуються терміни в однині, вони означають, «щонайменше один».

Наступні приклади ілюструють способи здійснення винаходу. Приклади не слід розглядати як такі, що обмежують винахід. Усі відсотки виражені в % мас., і всі співвідношення сумішей розчинників виражені в об'ємних співвідношеннях, якщо не зазначено інакше. Усі значення

температури виражені в градусах Цельсію.

#### ПРИКЛАДИ

##### Приклад 1 - Мічення $^{125}\text{I}$ Cry-білків

Йодування Cry-токсинів. Очищені зрізані Cry-токсини йодували з використанням йодогранул або йодогену (Pierce). Коротко, дві йодогранули двічі промивали 500 мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину PBS (20 мМ фосфату натрію, 0,15M NaCl, pH 7,5) і вміщували в центрифугальну пробірку ємністю 1,5 мл за свинцевим екраном. До цього додавали 100 мкл PBS. У витяжній шафі і з використанням необхідних прийомів роботи з радіоактивними речовинами 0,5 мКюрі  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (17,4 кюрі/мг, серія 0114, Amersham) додавали до розчину йодогранул у PBS. Компоненти піддавали взаємодії протягом 5 хв. при кімнатній температурі, потім до розчину додавали 2-25 мкг високоочищеного зрізаного Cry-білка і піддавали взаємодії ще протягом 3-5 хв. Реакцію зупиняли видаленням розчину з йодогранулами і реакційну суміш наносили на спін-колонку Zeba ємністю 0,5 мл для знесолення (InVitrogen), урівноважену PBS. Йодогранули двічі промивали щоразу по 10 мкл PBS і промивний розчин також наносили на колонку для знесолення. Радіоактивний розчин елюювали через колонку для знесолення центрифугуванням при  $1000\times g$  протягом 2 хв. У випадку Cry1Da для введення радіоактивної мітки використовували метод з йодогеном. При використанні даного методу Cry-токсин у 100 мМ фосфатному буфері (pH 8) спочатку очищали від полісахаридів (LPS) пропущенням кілька разів через невелику колонку з поліміксином ємністю 0,5 мл. У пробірку з йодогеном (Pierce Chem., Co) додавали 20 мкг LPS-невмісного Cry1Da-токсину, потім 0,5 мКюрі  $\text{Na}^{125}\text{I}$ . Реакційну суміш струшували протягом 15 хв. при  $25^{\circ}\text{C}$ . Розчин видаляли з пробірки і додавали 0,2M нерадіоактивного Na для гасіння реакції. Білок діалізували проти PBS із 3 змінами буфера для видалення незв'язаного  $^{125}\text{I}$ .

Радіоактивну чистоту йодованих Cry-білків визначали електрофорезом SDS-PAGE, візуалізували з використанням фосфорного екрана й аналізували на гамма-лічильнику. Коротко, 2 мкл радіоактивного білка розділяли SDS-PAGE. Після поділу гелі висушували з використанням апарата для висушування гелів BioRad, за інструкціями виробника. Висушені гелі візуалізували, загорнувши їх у плівку Mylar (товщиною 12 мкм) і експонували на багаторазових фосфорних екранах Dynamics (35×43 см.) протягом 1 год. Пластинки візуалізували з використанням приладу Molecular Dynamics Storm 820 phosphorimager і візуалізовані зображення аналізували з використанням програмного забезпечення ImageQuant<sup>TM</sup>. Радіоактивну смугу разом із зонами безпосередньо вище і нижче смуги вирізували з гелю з використанням леза для бритви і визначали радіоактивність на гамма-лічильнику. Радіоактивність виявляли тільки в смузі Cry-білка й у зонах нижче смуги. Радіоактивність не детектували вище смуги, указуючи на те, що всі радіоактивні домішки склалися з більш дрібних білкових компонентів у порівнянні з Cry-білком. Можливо, дані компоненти являли собою продукти деградації.

##### Приклад 2 - Протокол готування BBMV

Одержання і фракціонування солюбілізованих BBMV. Личинки останньої стадії розвитку *Spodoptera frugiperda*, *Ostrinia nubilalis* або *Heliothis zea* витримували без корму протягом ночі і потім зранку подрібнювали після охолодження на льоді протягом 15 хв. Витягали тканину середньої кишки з порожнини тіла, залишаючи задню кишку, приєднану до інтегументу. Середню кишку поміщали в 9× об'єм охолодженого на льоді буфера для гомогенізації (300 мМ маніту, 5 мМ ЕГТА, 17 мМ Тріс основи, pH 7,5) з додаванням суміші інгібіторів протеаз (кінцева концентрація компонентів суміші (у мМ) складає AEBSF (500), EDTA (250 мМ), бестатин (32), E-64 (0,35), лейпептин (0,25) і апротинін (0,075) (Sigma P-2714), розведеної відповідно до рекомендацій виробника. Тканину гомогенізували 15 ходами скляного гомогенізатора для тканин. BBMV готували осадженням за допомогою  $\text{MgCl}_2$  по методу Wolfersberger (1993). Коротко, рівний об'єм 24 мМ розчину  $\text{MgCl}_2$  у 300 мМ розчині маніту змішували з гомогенатом середньої кишки, перемішували протягом 5 хв. і витримували на льоді протягом 15 хв. Розчин центрифугували при  $2500\times g$  протягом 15 хв. при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатант залишали й осад суспендували у вихідному об'ємі 0,5× розведеного буфера для гомогенізації і знову центрифугували. Два супернатанти поєднували, центрифугували при  $27000\times g$  протягом 30 хв. при  $4^{\circ}\text{C}$  з одержанням фракції BBMV. Осад суспендували в 10 мл буфера для гомогенізації і додавали інгібітори протеаз і знову центрифугували при  $27000\times g$  протягом 30 хв. при  $4^{\circ}\text{C}$  для відмивання BBMV. Отриманий осад суспендували в буфері для збереження BBMV (10 мМ HEPES, 130 мМ KCl, 10% гліцерину, pH 7,4) до концентрації приблизно 3 мг/мл білка. Концентрацію білка визначали з використанням методу Бредфорда (1976) з бичачим сироватковим альбуміном (BSA) як стандарт. Визначення активності лужної фосфатази проводили до заморожування проб з використанням методу Sigma, згідно з інструкціями

виробника. Специфічна активність даного ферменту-маркера у фракції BBMV, як правило, була в 7 разів вище в порівнянні з фракцією гомогенату середньої кишки. BBMV розливали на аліквотні порції по 250 мкл, швидко заморожували в рідкому N<sub>2</sub> і зберігали при -80°C.

Приклад 3 - Спосіб оцінки зв'язування <sup>125</sup>I-мічених Cry-білків з білками BBMV

Зв'язування <sup>125</sup>I-мічених Cry-білків з білками BBMV. Для визначення оптимальної кількості білка BBMV у тестах по оцінці зв'язування будували криву насичення. <sup>125</sup>I-мічений Cry-білок (0,5 нМ) інкубували протягом 1 год. при 28°C з різними кількостями білка BBMV у межах 0-500 мкг/мл у буфері для зв'язування (8 мМ NaHPO<sub>4</sub>, 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 мМ NaCl, 0,1% бичачого сироваткового альбуміну, pH 7,4). Загальний об'єм складав 0,5 мл. Зв'язаний з <sup>125</sup>I Cry-білок відокремлювали від незв'язаного білка добором 150 мкл реакційної суміші в трьох паралелях з центрифугальної пробірки ємністю 1,5 мл у центрифугальну пробірку ємністю 500 мкл і центрифугуванням проб при 14000×g протягом 6 хв. при кімнатній температурі. Супернатант обережно видаляли й осад обережно промивали три рази буфером для зв'язування, охолодженим на льоді. Дно центрифугальної пробірки, що містить осад, відрізали і поміщали в скляну культуральну пробірку розміром 13×75 мм. Визначали радіоактивність проб протягом 5 хв. на гамма-лічильнику. Зі значення радіоактивності проби віднімали фонову радіоактивність (у даному випадку реакцію проводили з будь-яким білком) і будували графік залежності від концентрації білка BBMV. Оптимальна кількість білка, що використовували, склала 0,15 мг/мл білка BBMV.

Для визначення кінетики зв'язування будували криву насичення. Коротко, BBMV (150 мкг/мл) інкубували протягом 1 год. при 28°C зі зростаючими концентраціями <sup>125</sup>I-міченого Cry-токсину в межах від 0,01 до 10 нМ. Загальне зв'язування визначали добором аліквотних порцій 150 мкл кожної концентрації в трьох паралелях, центрифугуванням проби і визначенням радіоактивності, як описано вище. Аналогічним чином визначали неспецифічне зв'язування з додаванням до реакційної суміші 1000 нМ гомологічного трипсинізованого нерадіоактивного Cry-токсину для насичення всіх неспецифічних сайтів зв'язування рецептора. Специфічне зв'язування розраховували, як різницю між загальним зв'язуванням і неспецифічним зв'язуванням.

Тести гомологічного і гетерологічного конкурентного зв'язування проводили з використанням 150 мкг/мл білка BBMV і 0,5 нМ <sup>125</sup>I-міченого Cry-білка. Концентрація конкурентного неміченого Cry-токсину, доданого в реакційну суміш, знаходилася в межах від 0,045 до 1000 нМ і його додавали одночасно з радіоактивним лігандом для гарантії реального конкурентного зв'язування. Інкубацію проводили протягом 1 год. при 28°C і визначали кількість <sup>125</sup>I-міченого Cry-білка, зв'язаного з рецептором токсину, як описано вище, з вирахуванням неспецифічного зв'язування. При повній відсутності ліганду-конкурента детектували 100% загальне зв'язування. За результатами аналізу будували напівлогарифмічний графік залежності загального специфічного зв'язування у відсотках від концентрації доданого конкурентного ліганду.

Приклад 4 - Резюме за результатами

На Фіг. 1 показане специфічне зв'язування у відсотках <sup>125</sup>I Cry1Ab (0,5 нМ) у BBMV з ECB з конкуренцією неміченим гомологічним Cry1Ab (♦) і гетерологічним Cry1Be (•). Крива витиснення для гомологічної конкуренції з Cry1Ab представляє сигмоїдальну за формою криву, що показує 50% витиснення радіоактивного ліганду приблизно при 0,5 нМ Cry1Ab. Cry1Be також витісняє <sup>125</sup>I Cry1Be із сайту зв'язування, але для цього потрібна концентрація приблизно 40 нМ (у 80 разів вище в порівнянні з необхідною концентрацією Cry1Ab) для витиснення 50% <sup>125</sup>I Cry1Ab із сайту зв'язування.

На Фіг. 2 показане специфічне зв'язування у відсотках <sup>125</sup>I Cry1Ab (0,5 нМ) у BBMV з FAW з конкуренцією неміченим гомологічним Cry1Ab (♦) і гетерологічним Cry1Be (•). Крива витиснення для гомологічної конкуренції з Cry1Ab представляє сигмоїдальну за формою криву, що показує 50% витиснення радіоактивного ліганду приблизно при 0,3 нМ Cry1Ab. Cry1Be витісняє <sup>125</sup>I Cry1Ab із сайту зв'язування на 50% у концентрації приблизно 300 нМ або приблизно в 1000 разів вище в порівнянні з необхідною концентрацією для Cry1Ab. Помилки у вигляді рисок представляють межі значень, отриманих за даними подвійних рівнобіжних визначень.

На Фіг. 3 показане специфічне зв'язування у відсотках <sup>125</sup>I Cry1Be (0,5 нМ) у BBMV з FAW з конкуренцією неміченим гомологічним Cry1Be (♦) і гетерологічним Cry1Ab (•). Крива витиснення для гомологічної конкуренції з Cry1Be представляє сигмоїдальну за формою криву, що показує 50% витиснення радіоактивного ліганду приблизно при 2 нМ Cry1Be. Cry1Ab у концентрації 1000 нМ (у 2000 разів вище в порівнянні з витиснутим <sup>125</sup>I Cry1Be) приводить приблизно до 50% витиснення. Мається приблизно в 500 разів нижча афінність Cry1Ab у конкуренції за зв'язування Cry1Be. Помилки у вигляді рисок представляють межі значень, отриманих за даними трьох рівнобіжних визначень.

## Джерела літератури

- Heckel, D.G., Gahan, L.J., Baxter, S.W., Zhao, J.Z., Shelton, A.M., Gould, F., and Tabashnik, B.E. (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J Invertebr Pathol* 95, 192-197.
- 5 Luo, K., Banks, D., and Adang, M.J. (1999). Toxicity, binding, and permeability analyses of four bacillus thuringiensis cryI delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of spodoptera exigua and spodoptera frugiperda. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 457-464.
- Palmer, M, Buchkremer, M, Valeva, A, and Bhakdi, S. Cysteine-specific radioiodination of proteins with fluorescein maleimide. *Analytical Biochemistry* 253, 175-179. 1997. Ref Type: Journal (Full)
- 10 Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory).
- Schlenz, M. L., Babcock, J. M., and Storer, N. P. Response of Cry1F-resistant and Susceptible European Corn Borer and Fall Armyworm Colonies to Cry1A.105 and Cry12Ab2. DAI 0830, 2008. Indianapolis, Dow AgroSciences. Derbi Report.
- 15 Sheets, J.J. and Storer, N.P. Analysis of Cry1Ac Binding to Proteins in Brush Border Membrane Vesicles of Corn Earworm Larvae (*Heliothis zea*). Interactions with Cry1F Proteins and Its Implication for Resistance in the Field. DAI-0417, 1-26. 2001. Indianapolis, Dow AgroSciences.
- Tabashnik, B.E., Liu, Y.B., Finson, N., Masson, L., and Heckel, D.G. (1997). One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1640-1644.
- 20 Tabashnik, B.E., Malvar, T., Liu, Y.B., Finson, N., Borthakur, D., Shin, B.S., Park, S.H., Masson, L., de Maagd, R.A., and Bosch, D. (1996). Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2839-2844.
- Tabashnik, B.E., Roush, R.T., Earle, E.D., and Shelton, A.M. (2000). Resistance to Bt toxins. *Science* 287, 42.
- 25 Wolfersberger, M.G. (1993). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Arch. Insect Biochem. Physiol* 24, 139-147.
- Xu, X., Yu, L., and Wu, Y. (2005). Disruption of acaderhin gene associated with resistance to Cry 1 Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol* 71, 948-954.
- 30

## Додаток А

Перелік дельта-ендотоксинів – з Crickmore et.al., веб-сайт  
(цитовано у заявці)

Інвентарний номер являє собою доступ в NCBI

Назва	Інв. номер	Автори	Рік	Джерело штаму	Коментар
<u>CryIAa1</u>	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAa2</u>	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
<u>CryIAa3</u>	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
<u>CryIAa4</u>	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
<u>CryIAa5</u>	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
<u>CryIAa6</u>	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<u>CryIAa7</u>	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12	
<u>CryIAa8</u>	I26149	Liu	1996		тільки ДНК-послідовність
<u>CryIAa9</u>	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
<u>CryIAa10</u>	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
<u>CryIAa11</u>	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
<u>CryIAa12</u>	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
<u>CryIAa13</u>	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
<u>CryIAa14</u>	AAP40639	Ren et al	2002	unpublished	
<u>CryIAa15</u>	AAV66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	
<u>CryIAb1</u>	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
<u>CryIAb2</u>	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	
<u>CryIAb3</u>	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAb4</u>	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAb5</u>	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
<u>CryIAb6</u>	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
<u>CryIAb7</u>	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
<u>CryIAb8</u>	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
<u>CryIAb9</u>	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
<u>CryIAb10</u>	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAb11</u>	I12419	Ely & Tippet	1995	Bt A20	
<u>CryIAb12</u>	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	тільки ДНК-послідовність
<u>CryIAb13</u>	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
<u>CryIAb14</u>	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	



<u>Cry1Ab15</u>	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<u>Cry1Ab16</u>	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
<u>Cry1Ab17</u>	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
<u>Cry1Ab18</u>	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
<u>Cry1Ab19</u>	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
<u>Cry1Ab20</u>	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
<u>Cry1Ab21</u>	ABS18384	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056	
<u>Cry1Ab22</u>	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	невизначена послідовність
<u>Cry1Ab-like</u>	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
<u>Cry1Ac1</u>	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac2</u>	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenya	
<u>Cry1Ac3</u>	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
<u>Cry1Ac4</u>	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
<u>Cry1Ac5</u>	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
<u>Cry1Ac6</u>	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<u>Cry1Ac7</u>	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac8</u>	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
<u>Cry1Ac9</u>	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
<u>Cry1Ac10</u>	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
<u>Cry1Ac11</u>	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		
<u>Cry1Ac12</u>	112418	Ely & Tippet	1995	Bt A20	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry1Ac13</u>	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry1Ac14</u>	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>Cry1Ac15</u>	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan	
<u>Cry1Ac16</u>	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
<u>Cry1Ac17</u>	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenya HD549	
<u>Cry1Ac18</u>	AAY88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
<u>Cry1Ac19</u>	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
<u>Cry1Ac20</u>	ABB89046	Tan et al	2005		
<u>Cry1Ac21</u>	AAY66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
<u>Cry1Ac22</u>	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1	
<u>Cry1Ac23</u>	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	
<u>Cry1Ac24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	

<u>CryIAc25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>CryIAc26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>CryIAc27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>CryIAc28</u>	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
<u>CryIAd1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS811	
<u>CryIAd2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
<u>CryIAe1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
<u>CryIAf1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
<u>CryIAg1</u>	AAD46137	Mustafa	1999		
<u>CryIAh1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000		
<u>CryIAh2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
<u>CryIAi1</u>	AAO39719	Wang et al	2002		
<u>CryIA-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	невизначена послідовність
<u>CryIBa1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
<u>CryIBa2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
<u>CryIBa3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001		
<u>CryIBa4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
<u>CryIBa5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
<u>CryIBa6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
<u>CryIBb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
<u>CryIBc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
<u>CryIBd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
<u>CryIBd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
<u>CryIBe1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
<u>CryIBe2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003		
<u>CryIBe3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>CryIBf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001		
<u>CryIBf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003		
<u>CryIBg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002		
<u>CryICa1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
<u>CryICa2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS811	
<u>CryICa4</u>	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
<u>CryICa5</u>	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa6</u>	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
<u>CryICa7</u>	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
<u>CryICa8</u>	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
<u>CryICa9</u>	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	

<u>CryICa10</u>	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
<u>CryICa11</u>	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	
<u>CryICb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	тільки ДНК-послідовність
<u>CryICb2</u>	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
<u>CryICb3</u>	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>CryICb-like</u>	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	недостатня послідовність
<u>CryIDa1</u>	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
<u>CryIDa2</u>	I76415	Payne & Sick	1997		
<u>CryIDb1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	тільки ДНК-послідовність
<u>CryIDb2</u>	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>CryIDc1</u>	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	Bt JC291	
<u>CryIEa1</u>	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyaе 4F1	
<u>CryIEa2</u>	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyaе	
<u>CryIEa3</u>	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyaе PS81F	
<u>CryIEa4</u>	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyaе LBIT-147	
<u>CryIEa5</u>	A15535	Botterman et al	1994		тільки ДНК-послідовність
<u>CryIEa6</u>	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
<u>CryIEa7</u>	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
<u>CryIEa8</u>	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
<u>CryIEb1</u>	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
<u>CryIFa1</u>	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
<u>CryIFa2</u>	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS811	
<u>CryIFb1</u>	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>CryIFb2</u>	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
<u>CryIFb3</u>	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
<u>CryIFb4</u>	AAC10641	Payne et al	1997		
<u>CryIFb5</u>	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>CryIFb6</u>	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
<u>CryIFb7</u>	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>CryIGa1</u>	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
<u>CryIGa2</u>	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
<u>CryIGb1</u>	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
<u>CryIGb2</u>	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
<u>CryIGc</u>	AAQ52381	Baum et al	2003		
<u>CryIHa1</u>	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
<u>CryIHb1</u>	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>CryIH-like</u>	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	недостатня послідовність

<u>Cry1Ia1</u>	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
<u>Cry1Ia2</u>	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
<u>Cry1Ia3</u>	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry1Ia4</u>	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
<u>Cry1Ia5</u>	CAA70124	Selvapandiyam	1996	Bt 61	
<u>Cry1Ia6</u>	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
<u>Cry1Ia7</u>	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
<u>Cry1Ia8</u>	AAK66742	Song et al	2001		
<u>Cry1Ia9</u>	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>Cry1Ia10</u>	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
<u>Cry1Ia11</u>	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
<u>Cry1Ia12</u>	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
<u>Cry1Ia13</u>	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
<u>Cry1Ia14</u>	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
<u>Cry1Ia15</u>	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry1Ia16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry1Ib1</u>	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
<u>Cry1Ib2</u>	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61	
<u>Cry1Ib3</u>	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
<u>Cry1Ic1</u>	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
<u>Cry1Ic2</u>	AAE71691	Osman et al	2001		
<u>Cry1Id1</u>	AAD44366	Choi	2000		
<u>Cry1Ie1</u>	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
<u>Cry1If1</u>	AAQ52382	Baum et al	2003		
<u>Cry1I-like</u>	AAC31094	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>Cry1I-like</u>	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	недостатня послідовність
<u>Cry1Ja1</u>	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
<u>Cry1Jb1</u>	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
<u>Cry1Jc1</u>	AAC31092	Payne et al	1998		
<u>Cry1Jc2</u>	AAQ52372	Baum et al	2003		
<u>Cry1Jd1</u>	CAC50779	Arnaut et al	2001	Bt	
<u>Cry1Ka1</u>	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>Cry1La1</u>	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
<u>Cry1-like</u>	AAC31091	Payne et al	1998		недостатня послідовність
<u>Cry2Aa1</u>	AAA22335	Donovan et al	1989	Bt kurstaki	
<u>Cry2Aa2</u>	AAA83516	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1	
<u>Cry2Aa3</u>	D86064	Sasaki et al	1997	Bt sotto	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry2Aa4</u>	AAC04867	Misra et al	1998	Bt kenya HD549	
<u>Cry2Aa5</u>	CAA10671	Yu & Pang	1999	Bt SL39	

<u>Cry2Aa6</u>	CAA10672	Yu & Pang	1999	Bt YZ71
<u>Cry2Aa7</u>	CAA10670	Yu & Pang	1999	Bt CY29
<u>Cry2Aa8</u>	AAO13734	Wei et al	2000	Bt Dongbei 66
<u>Cry2Aa9</u>	AAO13750	Zhang et al	2000	
<u>Cry2Aa10</u>	AAQ04263	Yao et al	2001	
<u>Cry2Aa11</u>	AAQ52384	Baum et al	2003	
<u>Cry2Aa12</u>	ABI83671	Tan et al	2006	Bt Rpp39
<u>Cry2Aa13</u>	ABL01536	Arango et al	2008	Bt 146-158-01
<u>Cry2Aa14</u>	ACF04939	Hire et al	2008	Bt HD-550
<u>Cry2Ab1</u>	AAA22342	Widner & Whiteley	1989	Bt kurstaki HD1
<u>Cry2Ab2</u>	CAA39075	Dankocsik et al	1990	Bt kurstaki HD1
<u>Cry2Ab3</u>	AAG36762	Chen et al	1999	Bt BTC002
<u>Cry2Ab4</u>	AAO13296	Li et al	2001	Bt B-Pr-88
<u>Cry2Ab5</u>	AAQ04609	Yao et al	2001	Bt ly30
<u>Cry2Ab6</u>	AAP59457	Wang et al	2003	Bt WZ-7
<u>Cry2Ab7</u>	AAZ66347	Udayasuriyan et al	2005	Bt 14-1
<u>Cry2Ab8</u>	ABC95996	Huang et al	2006	Bt WB2
<u>Cry2Ab9</u>	ABC74968	Zhang et al	2005	Bt LLB6
<u>Cry2Ab10</u>	EF157306	Lin et al	2006	Bt LyD
<u>Cry2Ab11</u>	CAM84575	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
<u>Cry2Ab12</u>	ABM21764	Lin et al	2007	Bt LyD
<u>Cry2Ab13</u>	ACG76120	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4
<u>Cry2Ab14</u>	ACG76121	Zhu et al	2008	Bt Bts
<u>Cry2Ac1</u>	CAA40536	Aronson	1991	Bt shanghai S1
<u>Cry2Ac2</u>	AAG35410	Song et al	2000	
<u>Cry2Ac3</u>	AAQ52385	Baum et al	2003	
<u>Cry2Ac4</u>	ABC95997	Huang et al	2006	Bt WB9
<u>Cry2Ac5</u>	ABC74969	Zhang et al	2005	
<u>Cry2Ac6</u>	ABC74793	Xia et al	2006	Bt wuhanensis
<u>Cry2Ac7</u>	CAL18690	Saleem et al	2008	Bt SBSBT-1
<u>Cry2Ac8</u>	CAM09325	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT1
<u>Cry2Ac9</u>	CAM09326	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
<u>Cry2Ac10</u>	ABN15104	Bai et al	2007	Bt QCL-1
<u>Cry2Ac11</u>	CAM83895	Saleem et al	2007	Bt HD29
<u>Cry2Ac12</u>	CAM83896	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT3
<u>Cry2Ad1</u>	AAF09583	Choi et al	1999	Bt BR30
<u>Cry2Ad2</u>	ABC86927	Huang et al	2006	Bt WB10
<u>Cry2Ad3</u>	CAK29504	Saleem et al	2006	Bt 5_2AcT(1)
<u>Cry2Ad4</u>	CAM32331	Saleem et al	2007	Bt CMBL-BT2
<u>Cry2Ad5</u>	CAO78739	Saleem et al	2007	Bt HD29
<u>Cry2Ae1</u>	AAQ52362	Baum et al	2003	
<u>Cry2Af1</u>	ABO30519	Beard et al	2007	Bt C81
<u>Cry2Ag</u>	ACH91610	Zhu et al	2008	Bt JF19-2
<u>Cry2Ah</u>	EU939453	Zhang et al	2008	Bt

Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009

<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry3Aa1</u>	AAA22336	Herrnstadt et al	1987	Bt san diego	
<u>Cry3Aa2</u>	AAA22541	Sekar et al	1987	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa3</u>	CAA68482	Hofte et al	1987		
<u>Cry3Aa4</u>	AAA22542	McPherson et al	1988	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa5</u>	AAA50255	Donovan et al	1988	Bt morrisoni EG2158	
<u>Cry3Aa6</u>	AAC43266	Adams et al	1994	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Aa7</u>	CAB41411	Zhang et al	1999	Bt 22	
<u>Cry3Aa8</u>	AAS79487	Gao and Cai	2004	Bt YM-03	
<u>Cry3Aa9</u>	AAW05659	Bulla and Candas	2004	Bt UTD-001	
<u>Cry3Aa10</u>	AAU29411	Chen et al	2004	Bt 886	
<u>Cry3Aa11</u>	AAW82872	Kurt et al	2005	Bt tenebrionis Mm2	
<u>Cry3Aa12</u>	ABY49136	Sezen et al	2008	Bt tenebrionis	
<u>Cry3Ba1</u>	CAA34983	Sick et al	1990	Bt tolworthi 43F	
<u>Cry3Ba2</u>	CAA00645	Peferoen et al	1990	Bt PGS1208	
<u>Cry3Bb1</u>	AAA22334	Donovan et al	1992	Bt EG4961	
<u>Cry3Bb2</u>	AAA74198	Donovan et al	1995	Bt EG5144	
<u>Cry3Bb3</u>	II5475	Peferoen et al	1995		тільки ДНК-послідовність
<u>Cry3Ca1</u>	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki Btl109P	
<u>Cry4Aa1</u>	CAA68485	Ward & Ellar	1987	Bt israelensis	
<u>Cry4Aa2</u>	BAA00179	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Aa3</u>	CAD30148	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4A-like</u>	AAAY96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ba1</u>	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
<u>Cry4Ba2</u>	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba3</u>	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba4</u>	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Ba5</u>	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba-like</u>	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ca1</u>	EU646202	Shu et al	2008		Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry5Aa1</u>	AAA67694	Narva et al	1994	Bt darmstadiensis PS17	
<u>Cry5Ab1</u>	AAA67693	Narva et al	1991	Bt darmstadiensis	

				PS17	
<u>Cry5Ac1</u>	I34543	Payne et al	1997		тільки ДНК-послідовність
<u>Cry5Ad1</u>	ABQ82087	Lenane et al	2007	Bt L366	
<u>Cry5Ba1</u>	AAA68598	Foncerrada & Narva	1997	Bt PS86Q3	
<u>Cry5Ba2</u>	ABW88932	Guo et al	2008	YBT 1518	
<u>Cry6Aa1</u>	AAA22357	Narva et al	1993	Bt PS52A1	
<u>Cry6Aa2</u>	AAM46849	Bai et al	2001	YBT 1518	
<u>Cry6Aa3</u>	ABH03377	Jia et al	2006	Bt 96418	
<u>Cry6Ba1</u>	AAA22358	Narva et al	1991	Bt PS69D1	
<u>Cry7Aa1</u>	AAA22351	Lambert et al	1992	Bt galleriae PGSI245	
<u>Cry7Ab1</u>	AAA21120	Narva & Fu	1994	Bt dakota HD511	
<u>Cry7Ab2</u>	AAA21121	Narva & Fu	1994	Bt kumamotoensis 867	
<u>Cry7Ab3</u>	ABX24522	Song et al	2008	Bt WZ-9	
<u>Cry7Ab4</u>	EU380678	Shu et al	2008	Bt	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry7Ab5</u>	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM- 33	
<u>Cry7Ab6</u>	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	Відсутність зв'язку з NCBI на вересень 2009
<u>Cry7Ab7</u>	FJ940776	Wang et al	2009		Відсутність зв'язку з NCBI на листопад 2009
<u>Cry7Ab8</u>	GU145299	Feng Jing	2009		
<u>Cry7Ba1</u>	ABB70817	Zhang et al	2006	Bt huazhongensis	
<u>Cry7Ca1</u>	ABR67863	Gao et al	2007	Bt BTH-13	
<u>Cry7Da1</u>	ACQ99547	Yi et al	2009	Bt LH-2	
<u>Cry8Aa1</u>	AAA21117	Narva & Fu	1992	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Ba1</u>	AAA21118	Narva & Fu	1993	Bt kumamotoensis	
<u>Cry8Bb1</u>	CAD57542	Abad et al	2002		
<u>Cry8Bc1</u>	CAD57543	Abad et al	2002		
<u>Cry8Ca1</u>	AAA21119	Sato et al.	1995	Bt japonensis Buibui	
<u>Cry8Ca2</u>	AAR98783	Shu et al	2004	Bt HBF-1	
<u>Cry8Ca3</u>	EU625349	Du et al	2008	Bt FTL-23	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
<u>Cry8Da2</u>	BD133574	Asano et al	2002	Bt	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry8Da3</u>	BD133575	Asano et al	2002	Bt	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry8Db1</u>	BAF93483	Yamaguchi et al	2007	Bt BBT2-5	
<u>Cry8Ea1</u>	AAQ73470	Fuping et al	2003	Bt 185	
<u>Cry8Ea2</u>	EU047597	Liu et al	2007	Bt B-DLL	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Fa1</u>	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	Також AAW81032
<u>Cry8Ga1</u>	AAT46073	Shu et al	2004	Bt HBF-18	
<u>Cry8Ga2</u>	ABC42043	Yan et al	2008	Bt 145	
<u>Cry8Ga3</u>	FJ198072	Xiaodong et al	2008	Bt FCD114	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009

<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008		Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenya	
<u>Cry8-like</u>	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry8-like</u>	ABS53003	Mangena et al	2007	Bt	
<u>Cry9Aa1</u>	CAA41122	Shevelev et al	1991	Bt galleriae	
<u>Cry9Aa2</u>	CAA41425	Gleave et al	1992	Bt DSIR517	
<u>Cry9Aa3</u>	GQ249293	Su et al	2009	Bt SC5(D2)	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Aa-like</u>	AAQ52376	Baum et al	2003		неповна послідовність
<u>Cry9Ba1</u>	CAA52927	Shevelev et al	1993	Bt galleriae	
<u>Cry9Bb1</u>	AAV28716	Silva-Werneck et al	2004	Bt japonensis	
<u>Cry9Ca1</u>	CAA85764	Lambert et al	1996	Bt tolworthi	
<u>Cry9Ca2</u>	AAQ52375	Baum et al	2003		
<u>Cry9Da1</u>	BAA19948	Asano	1997	Bt japonensis N141	
<u>Cry9Da2</u>	AAB97923	Wasano & Ohba	1998	Bt japonensis	
<u>Cry9Da3</u>	GQ249295	Su et al	2009	Bt T03B001	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Db1</u>	AAX78439	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ea1</u>	BAA34908	Midoh & Oyama	1998	Bt aizawai SSK-10	
<u>Cry9Ea2</u>	AAO12908	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<u>Cry9Ea3</u>	ABM21765	Lin et al	2006	Bt lyA	
<u>Cry9Ea4</u>	ACE88267	Zhu et al	2008	Bt ywc5-4	
<u>Cry9Ea5</u>	ACF04743	Zhu et al	2008	Bts	
<u>Cry9Ea6</u>	ACG63872	Liu & Guo	2008	Bt 11	
<u>Cry9Ea7</u>	FJ380927	Sun et al	2008		Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001		
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry9Ec1</u>	AAC63366	Wasano et al	2003	Bt galleriae	
<u>Cry9Ed1</u>	AAX78440	Flannagan & Abad	2005	Bt kurstaki DP1019	
<u>Cry9Ee1</u>	GQ249296	Su et al	2009	Bt T03B001	Відсутність зв'язку з NCBI на серпень 2009
<u>Cry9-like</u>	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	недостатня послідовність
<u>Cry10Aa1</u>	AAA22614	Thorne et al	1986	Bt israelensis	
<u>Cry10Aa2</u>	E00614	Aran & Toomasu	1996	Bt israelensis ONR-60A	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry10Aa3</u>	CAD30098	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry10A-like</u>	DQ167578	Mahalakshmi et al	2006	Bt LDC-9	неповна послідовність



<u>Cry11Aa1</u>	AAA22352	Donovan et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa2</u>	AAA22611	Adams et al	1989	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa3</u>	CAD30081	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry11Aa-like</u>	DQ166531	Mahalakshmi et al	2007	Bt LDC-9	неповна послідовність
<u>Cry11Ba1</u>	CAA60504	Delecluse et al	1995	Bt jegathesan 367	
<u>Cry11Bb1</u>	AAC97162	Ordur et al	1998	Bt medellin	
<u>Cry12Aa1</u>	AAA22355	Narva et al	1991	Bt PS33F2	
<u>Cry13Aa1</u>	AAA22356	Narva et al	1992	Bt PS63B	
<u>Cry14Aa1</u>	AAA21516	Narva et al	1994	Bt sotto PS80JJ1	
<u>Cry15Aa1</u>	AAA22333	Brown & Whiteley	1992	Bt thompsoni	
<u>Cry16Aa1</u>	CAA63860	Barloy et al	1996	Cb malaysia CH18	
<u>Cry17Aa1</u>	CAA67841	Barloy et al	1998	Cb malaysia CH18	
<u>Cry18Aa1</u>	CAA67506	Zhang et al	1997	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ba1</u>	AAF89667	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry18Ca1</u>	AAF89668	Patel et al	1999	Paenibacillus popilliae	
<u>Cry19Aa1</u>	CAA68875	Rosso & Delecluse	1996	Bt jegathesan 367	
<u>Cry19Ba1</u>	BAA32397	Hwang et al	1998	Bt higo	
<u>Cry20Aa1</u>	AAB93476	Lee & Gill	1997	Bt fukuokaensis	
<u>Cry20Ba1</u>	ACS93601	Noguera & Ibarra	2009	Bt higo LBIT-976	
<u>Cry20-like</u>	GQ144333	Yi et al	2009	Bt Y-5	тільки ДНК-послідовність
<u>Cry21Aa1</u>	I32932	Payne et al	1996		тільки ДНК-послідовність
<u>Cry21Aa2</u>	I66477	Feitelson	1997		тільки ДНК-послідовність
<u>Cry21Ba1</u>	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
<u>Cry22Aa1</u>	I34547	Payne et al	1997		тільки ДНК-послідовність
<u>Cry22Aa2</u>	CAD43579	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Aa3</u>	ACD93211	Du et al	2008	Bt FZ-4	
<u>Cry22Ab1</u>	AAK50456	Baum et al	2000	Bt EG4140	
<u>Cry22Ab2</u>	CAD43577	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry22Ba1</u>	CAD43578	Isaac et al	2002	Bt	
<u>Cry23Aa1</u>	AAF76375	Donovan et al	2000	Bt	бінарний з Cry37Aa1
<u>Cry24Aa1</u>	AAC61891	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry24Ba1</u>	BAD32657	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
<u>Cry24Ca1</u>	CAJ43600	Beron & Salerno	2005	Bt FCC-41	
<u>Cry25Aa1</u>	AAC61892	Kawalek and Gill	1998	Bt jegathesan	
<u>Cry26Aa1</u>	AAD25075	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1166	
<u>Cry27Aa1</u>	BAA82796	Saitoh	1999	Bt higo	
<u>Cry28Aa1</u>	AAD24189	Wojciechowska et al	1999	Bt finitimus B-1161	
<u>Cry28Aa2</u>	AAG00235	Moore and Debro	2000	Bt finitimus	
<u>Cry29Aa1</u>	CAC80985	Delecluse et al	2000	Bt medellin	

<u>Cry30Aa1</u>	CAC80986	Delecluse et al	2000	Bt medellin	
<u>Cry30Ba1</u>	BAD00052	Ito et al	2003	Bt entomocidus	
<u>Cry30Ca1</u>	BAD67157	Ohgushi et al	2004	Bt sotto	
<u>Cry30Ca2</u>	ACU24781	Sun and Park	2009	Bt jegathesan 367	
<u>Cry30Da1</u>	EF095955	Shu et al	2006	Bt Y41	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry30Db1</u>	BAE80088	Kishida et al	2006	Bt aizawai BUN1-14	
<u>Cry30Ea1</u>	ACC95445	Fang et al	2007	Bt S2160-1	
<u>Cry30Ea2</u>	FJ499389	Jun et al	2008	Bt Ywc2-8	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry30Fa1</u>	ACI22625	Tan et al	2008	Bt MC28	
<u>Cry30Ga1</u>	ACG60020	Zhu et al	2008	Bt HS18-1	
<u>Cry31Aa1</u>	BAB11757	Saitoh & Mizuki	2000	Bt 84-HS-1-11	
<u>Cry31Aa2</u>	AAL87458	Jung and Cote	2000	Bt M15	
<u>Cry31Aa3</u>	BAE79808	Uemori et al	2006	Bt B0195	
<u>Cry31Aa4</u>	BAF32571	Yasutake et al	2006	Bt 79-25	
<u>Cry31Aa5</u>	BAF32572	Yasutake et al	2006	Bt 92-10	
<u>Cry31Ab1</u>	BAE79809	Uemori et al	2006	Bt B0195	
<u>Cry31Ab2</u>	BAF32570	Yasutake et al	2006	Bt 31-5	
<u>Cry31Ac1</u>	BAF34368	Yasutake et al	2006	Bt 87-29	
<u>Cry32Aa1</u>	AAG36711	Balasubramanian et al	2001	Bt yunnanensis	
<u>Cry32Ba1</u>	BAB78601	Takebe et al	2001	Bt	
<u>Cry32Ca1</u>	BAB78602	Takebe et al	2001	Bt	
<u>Cry32Da1</u>	BAB78603	Takebe et al	2001	Bt	
<u>Cry33Aa1</u>	AAL26871	Kim et al	2001	Bt dakota	
<u>Cry34Aa1</u>	AAG50341	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	бінарний з Cry35Aa1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарний з Cry35Aa2
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарний з Cry35Aa3
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарний з Cry35Aa4
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарний з Cry35Ab1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарний з Cry35Ac1
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарний з Cry35Ab2
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	бінарний з Cry35Ab3
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарний з Cry35Ba1
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарний з Cry35Ba2
<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	бінарний з Cry35Ba3
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	бінарний з Cry34Aa1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарний з Cry34Aa2
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарний з Cry34Aa3
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарний з Cry34Aa4
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарний з Cry34Ab1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарний з Cry34Ac2
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	бінарний з Cry34Ab3
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарний з Cry34Ac1

<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарний з <u>Cry34Ba1</u>
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарний з <u>Cry34Ba2</u>
<u>Cry35Ba3</u>	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	бінарний з <u>Cry34Ba3</u>
<u>Cry36Aa1</u>	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt	
<u>Cry37Aa1</u>	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	бінарний з <u>Cry23Aa</u>
<u>Cry38Aa1</u>	AAK64559	Rupar et al	2000	Bt	
<u>Cry39Aa1</u>	BAB72016	Ito et al	2001	Bt aizawai	
<u>Cry40Aa1</u>	BAB72018	Ito et al	2001	Bt aizawai	
<u>Cry40Ba1</u>	BAC77648	Ito et al	2003	Bun1-14	
<u>Cry40Ca1</u>	EU381045	Shu et al	2008	Bt Y41	Відсутність зв'язку з NCBI на липень
<u>Cry40Da1</u>	ACF15199	Zhang et al	2008	Bt S2096-2	
<u>Cry41Aa1</u>	BAD35157	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry41Ab1</u>	BAD35163	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry42Aa1</u>	BAD35166	Yamashita et al	2003	Bt A1462	
<u>Cry43Aa1</u>	BAD15301	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
<u>Cry43Aa2</u>	BAD95474	Nozawa	2004	P. popilliae popilliae	
<u>Cry43Ba1</u>	BAD15303	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
<u>Cry43-like</u>	BAD15305	Yokoyama and Tanaka	2003	P. lentimorbus semadara	
<u>Cry44Aa</u>	BAD08532	Ito et al	2004	Bt entomocidus INA288	
<u>Cry45Aa</u>	BAD22577	Okumura et al	2004	Bt 89-T-34-22	
<u>Cry46Aa</u>	BAC79010	Ito et al	2004	Bt dakota	
<u>Cry46Aa2</u>	BAG68906	Ishikawa et al	2008	Bt A1470	
<u>Cry46Ab</u>	BAD35170	Yamagiwa et al	2004	Bt	
<u>Cry47Aa</u>	AAY24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890	
<u>Cry48Aa</u>	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарний з <u>49Aa</u>
<u>Cry48Aa2</u>	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарний з <u>49Aa2</u>
<u>Cry48Aa3</u>	CAJ86546	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b	бінарний з <u>49Aa3</u>
<u>Cry48Ab</u>	CAJ86548	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарний з <u>49Ab1</u>
<u>Cry48Ab2</u>	CAJ86549	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарний з <u>49Aa4</u>
<u>Cry49Aa</u>	CAH56541	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарний з <u>48Aa</u>
<u>Cry49Aa2</u>	CAJ86541	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарний з <u>48Aa2</u>
<u>Cry49Aa3</u>	CAJ86543	Jones and Berry	2006	BsNHA15b	бінарний з <u>48Aa3</u>
<u>Cry49Aa4</u>	CAJ86544	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарний з <u>48Ab2</u>
<u>Cry49Ab1</u>	CAJ86542	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарний з <u>48Ab1</u>
<u>Cry50Aa1</u>	BAE86999	Ohgushi et al	2006	Bt sotto	
<u>Cry51Aa1</u>	ABI14444	Meng et al	2006	Bt F14-1	
<u>Cry52Aa1</u>	EF613489	Song et al	2007	Bt Y41	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry52Ba1</u>	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry53Aa1</u>	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry53Ab1</u>	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28	Відсутність зв'язку з NCBI на липень
<u>Cry54Aa1</u>	ACA52194	Tan et al	2009	Bt MC28	
<u>Cry55Aa1</u>	ABW88931	Guo et al	2008	YBT 1518	
<u>Cry55Aa2</u>	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
<u>Cry56Aa1</u>	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	Відсутність зв'язку з NCBI на липень 2009
<u>Cry56Aa2</u>	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	Відсутність зв'язку з NCBI на серпень 2009
<u>Cry57Aa1</u>	ANC87261	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim	
<u>Cry58Aa1</u>	ANC87260	Noguera & Ibarra	2009	Bt entomocidus	
<u>Cry59Aa1</u>	ACR43758	Noguera & Ibarra	2009	Bt kim LBIT-980	

Vip3Aa1	Vip3Aa	<a href="#">AAC37036</a>	Estruch et al	1996	<a href="#">PNAS 93, 5389-5394</a>	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	<a href="#">AAC37037</a>	Estruch et al	1996	<a href="#">PNAS 93, 5389-5394</a>	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	<a href="#">US 6137033</a> Жовтень 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	<a href="#">AAR81079</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Грудень 2003	Bt PS36A	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	<a href="#">AAR81080</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Грудень 2003	Bt PS81F	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	<a href="#">AAR81081</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Грудень 2003	Bt	WO9818932(A 2,A3) 7 травня 1998
Vip3Aa7	Vip83	<a href="#">AAK95326</a>	Cai et al	2001	не опубліковано	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	<a href="#">AAK97481</a>	Loguercio et al	2001	не опубліковано	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	<a href="#">CAA76665</a>	Selvapandiyan et al	2001	не опубліковано	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	<a href="#">AAN60738</a>	Doss et al	2002	<a href="#">Protein Expr. Purif. 26, 82- 88</a>	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	<a href="#">AAR36859</a>	Liu et al	2003	не опубліковано	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	<a href="#">AAM22456</a>	Wu and Guan	2003	не опубліковано	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	<a href="#">AAL69542</a>	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	<a href="#">AAQ12340</a>	Polumetla et al	2003	не опубліковано	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	<a href="#">AAP51131</a>	Wu et al	2004	не опубліковано	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	<a href="#">AAW65132</a>	Mesrati et al	2005	<a href="#">FEMS Micro Lett 244, 353-358</a>	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	патент США №6603063 Серпень 2003	Javelin 1990	WO9957282(A 2,A3) 11 листопада 1999

Vip3Aa18		AAx49395	Cai and Xiao	2005	не опубліковано	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	DQ241674	Liu et al	2006	не опубліковано	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	DQ539887	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa20	Vip3A-2	DQ539888	Hart et al	2006	не опубліковано		
Vip3Aa21	Vip	ABD84410	Panbangred	2006	не опубліковано	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	AAy41427	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	AAy41428	Lu et al	2005	не опубліковано	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	не опубліковано	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	не опубліковано		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	не опубліковано	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	не опубліковано	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xieumei et al	2009	не опубліковано	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xieumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	не опубліковано	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	не опубліковано	MD2-1	
					патент США № 6603053		
Vip3Ab1	Vip3B	AAR40284	Feitelson et al	1999		Bt KB59A4-6	WO9957282(A 2,A3) 11 листопада 1999
Vip3Ab2	Vip3D	AAy88247	Feng and Shen	2006	не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al		заявка на патент США 20040128716		
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al		заявка на патент США 20040128716		
Vip3Ad2	ISP3B	CA143276	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Ae1	ISP3C	CA143277	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af1	ISP3A	CA143275	Van Rie et al	2005	не опубліковано	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Ag1	Vip3B	ADN08758	Syngenta		WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008		Bt	
Vip3Ah1	Vip3S	DQ832323	Li and Shen	2006	не опубліковано	Bt	

Vip3Ba1		AAV70653	Rang et al	2004	не опубліковано		
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Dow AGROSCIENCES LLC

<120> ЗАСТОСУВАННЯ CRY1AB В КОМБІНАЦІЇ З CRY1BE ДЛЯ КЕРУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ KOMAX

<130> DAS-P0199-US

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 641

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Cry1Be

<400> 1

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser  
1 5 10 15

Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Ala Gln Met Asn Leu Ser Thr Asp  
20 25 30

Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Ile Ala Glu Gly Asn Asn Ile Asp  
35 40 45

Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly  
50 55 60

Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Ile Ala Ser  
65 70 75 80

Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Arg Gly Arg Asp Pro  
85 90 95

Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val  
100 105 110

Thr Glu Asn Thr Arg Asp Thr Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly  
115 120 125

Asn Ser Phe Arg Ala Tyr Gln Gln Ser Leu Glu Asp Trp Leu Glu Asn  
130 135 140

Arg Asp Asp Ala Arg Thr Arg Ser Val Leu Tyr Thr Gln Tyr Ile Ala  
145 150 155 160

Leu Glu Leu Asp Phe Leu Asn Ala Met Pro Leu Phe Ala Ile Arg Asn  
 165 170 175  
 Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His  
 180 185 190  
 Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Phe Gly Leu  
 195 200 205  
 Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Glu Arg Gln Val Glu Lys Thr  
 210 215 220  
 Arg Glu Tyr Ser Asp Tyr Cys Ala Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Leu Arg Tyr Asn Gln Phe  
 245 250 255  
 Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro  
 260 265 270  
 Ser Tyr Asp Thr Arg Val Tyr Pro Met Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr  
 275 280 285  
 Arg Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Ile Gly Arg Thr Asn Ala Pro Ser Gly  
 290 295 300  
 Phe Ala Ser Thr Asn Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu  
 325 330 335  
 Gln Leu Thr Ile Phe Ser Val Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Tyr  
 340 345 350  
 Met Asn Tyr Trp Val Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Thr Ile Arg Gly  
 355 360 365  
 Ser Leu Ser Thr Ser Thr His Gly Asn Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro  
 370 375 380  
 Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Val Tyr Arg Thr Glu Ser Phe  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Ile Asn Ile Leu Leu Thr Thr Pro Val Asn Gly Val Pro Trp  
 405 410 415

Ala Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Leu  
420 425 430

Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Phe Asp Ser  
435 440 445

Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser  
450 455 460

Tyr Ser His Arg Leu Ser Asn Ile Arg Leu Ile Ser Gly Asn Thr Leu  
465 470 475 480

Arg Ala Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn  
485 490 495

Thr Ile Ser Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ser Phe  
500 505 510

Asn Leu Asn Ser Gly Thr Ser Val Val Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly  
515 520 525

Gly Asp Ile Ile Arg Thr Asn Val Asn Gly Ser Val Leu Ser Met Gly  
530 535 540

Leu Asn Phe Asn Asn Thr Ser Leu Gln Arg Tyr Arg Val Arg Val Arg  
545 550 555 560

Tyr Ala Ala Ser Gln Thr Met Val Leu Arg Val Thr Val Gly Gly Ser  
565 570 575

Thr Thr Phe Asp Gln Gly Phe Pro Ser Thr Met Ser Ala Asn Glu Ser  
580 585 590

Leu Thr Ser Gln Ser Phe Arg Phe Ala Glu Phe Pro Val Gly Ile Ser  
595 600 605

Ala Ser Gly Ser Gln Thr Ala Gly Ile Ser Ile Ser Asn Asn Ala Gly  
610 615 620

Arg Gln Thr Phe His Phe Asp Lys Ile Glu Phe Ile Pro Ile Thr Ala  
625 630 635 640

Thr

<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, яка містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Be.
2. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина додатково містить ДНК, що кодує третій інсектицидний білок, де вказаний третій білок вибраний з групи, що складається з Cry2A, Cry1I і DIG-3.
- 10 3. Трансгенна рослина за п. 2, де вказана рослина додатково містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і ДНК, що кодує четвертий інсектицидний білок, вибраний з групи, яка складається з Cry1Fa, Vip3Ab, Cry1Ca і Cry1E.
4. Трансгенна насіннина рослини за будь-яким з пп. 1-3, яка містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Be.
- 15 5. Сукупність рослин, що містить не-Bt-рослини в сховищі і сукупність трансгенних рослин за будь-яким з пп. 1-3, де вказані рослини в сховищі складають менше ніж 40 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
6. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини в сховищі складають менше ніж 30 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
- 20 7. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини в сховищі складають менше ніж 20 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
8. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини в сховищі складають менше ніж 10 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
9. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини в сховищі складають менше ніж 5 % від всіх злакових рослин у вказаній сукупності рослин.
- 25 10. Сукупність рослин за п. 5, де вказані рослини в сховищі знаходяться в блоках або смугах.
11. Суміш насіння, що містить насіння сховища від не-Bt-рослин в сховищі, і сукупність трансгенного насіння за п. 4, яке містить ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Ab, і ДНК, що кодує інсектицидний білок Cry1Be, в якій вказане насіння сховища складає менше ніж 40 % від
- 30 всього насіння в суміші.
12. Суміш насіння за п. 11, в якій вказане насіння сховища складає менше ніж 30 % від всього насіння в суміші.

13. Суміш насіння за п. 11, в якій вказане насіння сховища складає менше ніж 20 % від всього насіння в суміші.
14. Суміш насіння за п. 11, в якій вказане насіння сховища складає менше ніж 10 % від всього насіння в суміші.
- 5 15. Суміш насіння за п. 11, в якій вказане насіння сховища складає менше ніж 5 % від всього насіння в суміші.
16. Спосіб запобігання розвитку резистентності до Cry-білка у комахи, де вказаний спосіб включає висівання насіння для отримання сукупності рослин за будь-яким з пп. 5-10, і приведення вказаної комахи в контакт із вказаною сукупністю рослин.
- 10 17. Сукупність рослин за будь-яким з пп. 5-10, де вказані рослини займають площу більше 10 акрів.
18. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1-3, де вказана рослина вибрана з групи, що складається з кукурудзи, соєвих бобів і бавовнику.
19. Трансгенна рослина за п. 18, де вказана рослина являє собою рослину кукурудзи.
- 15 20. Рослинна клітина трансгенної рослини за будь-яким з пп. 1-3, де вказана рослинна клітина містить вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Cry1Be, і вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Cry1Ab, де вказаний інсектицидний білок Cry1Be щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:1, і вказаний інсектицидний білок Cry1Ab щонайменше на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:2.
- 20 21. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1-3, де вказаний інсектицидний білок Cry1Be містить послідовність SEQ ID NO:1, і вказаний інсектицидний білок Cry1Ab містить послідовність SEQ ID NO:2.
22. Спосіб боротьби з кукурудзяним стебловим метеликом шляхом приведення вказаної комахи в контакт з інсектицидним білком Cry1Be і інсектицидним білком Cry1Ab.

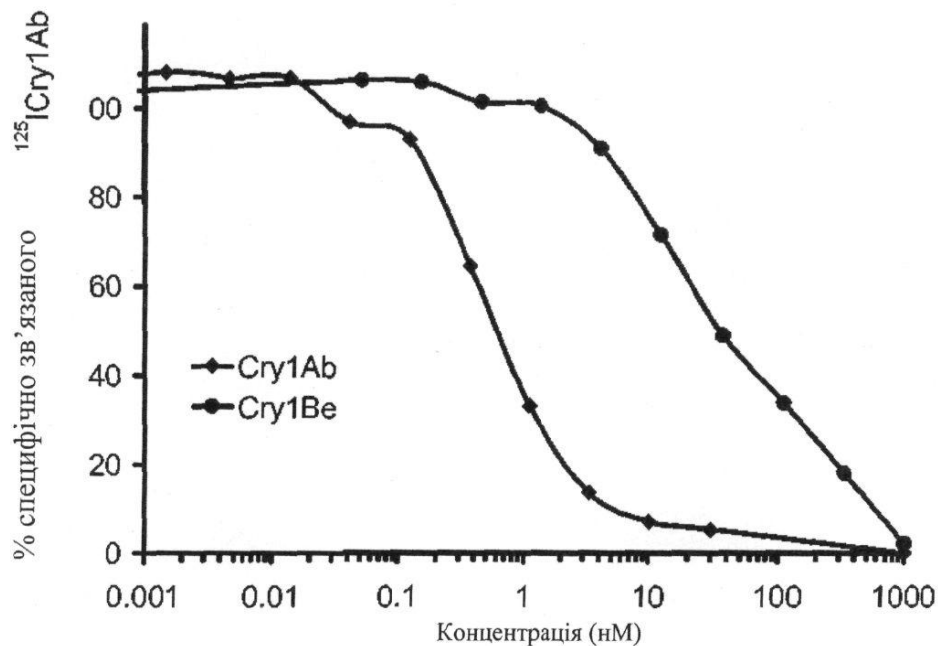
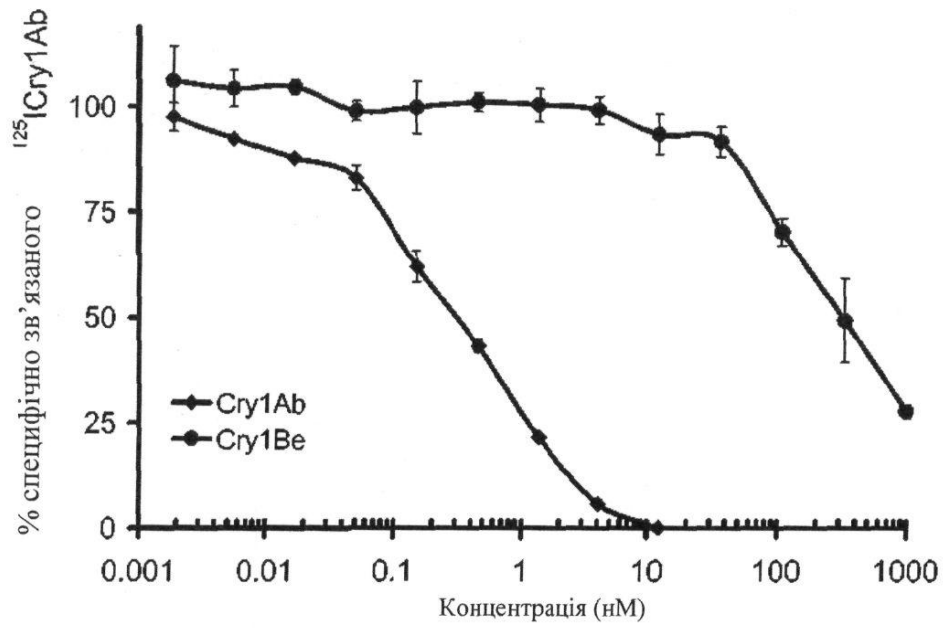
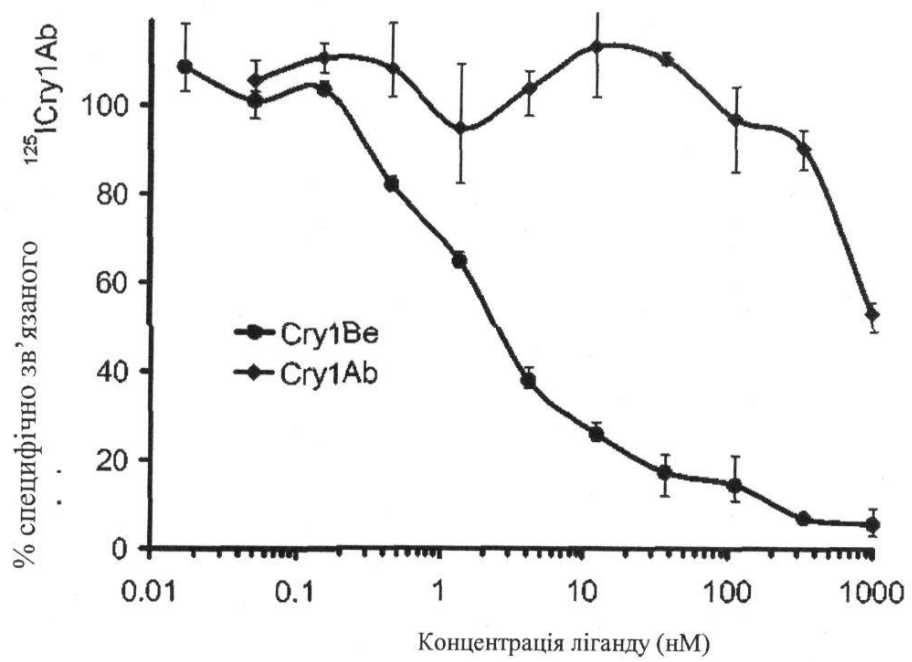


Fig. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

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