



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111936** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)

**A01H 5/00**

**A01H 5/10** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

**A01P 7/04** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2012 08707</b>	<b>(72)</b> 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>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>16.12.2010</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.07.2016</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/284,281, 61/284,275</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>WO 2009132850 A1, 05.11.2009 US 20090038030 A1, 05.02.2009</b>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.12.2009, 16.12.2009</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/US2010/060835, 16.12.2010</b>	

**(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЯКА МІСТИТЬ ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Vip3Ab, І ДНК, ЩО КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Ca, ДЛЯ КЕРУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНІСТЮ КОМАХ**

### (57) Реферат:

Даний винахід включає способи і рослини для контролювання комах - кукурудзяної листової совки, де вказані рослини містять білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, а також різні комбінації інших білків, що містять вказану пару білків, для сповільнення або запобігання розвитку стійкості у комах.

UA 111936 C2



## ОПИС РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Люди вирощують кукурудзу для використання при виробництві їжі і енергії. Люди також вирощують велику кількість інших видів зернових, включаючи сою і бавовну. Комахи поїдають і пошкоджують рослини і, тим самим, підривають зусилля людей. Мільярди доларів щорічно витрачаються на контроль комах-шкідників і, крім цього, мільярди доларів втрачаються у вигляді збитку, нанесеного комахами. Синтетичні органічні хімічні інсектициди є основним інструментом контролю комах-шкідників, але біологічні інсектициди, наприклад, білки, що мають інсектицидну дію, отримані з *Bacillus thuringiensis* (Bt), грають важливу роль в тих же галузях застосування. Можливість отримання стійких до комах рослин шляхом трансформації генами Bt білків, що мають інсектицидну дію, здійснила революцію в сучасному сільському господарстві і підвищила важливість і цінність білків, що мають інсектицидну дію, і їх генів.

Декілька Bt білків були використані для створення стійких до комах трансгенних рослин, які до теперішнього часу успішно зареєстровані і виведені на ринок. Вказані білки включають Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F і Cry3Bb у кукурудзи, Cry1Ac і Cry2Ab у бавовни, і Cry3A у картоплі.

Комерційні продукти, експресуючі ці білки, експресують один білок за винятком випадків, коли бажаний комбінований інсектицидний спектр дії двох білків (наприклад, Cry1Ab і Cry3Bb у кукурудзи) комбінують для забезпечення стійкості, відповідно, до лускокрилих комах-шкідників і кореневих черв'яків), або коли незалежна дія білків дозволяє використовувати їх як засіб, що сповільнює розвиток стійкості в цільовій популяції комах (наприклад, Cry1Ac і Cry2Ab у бавовни) комбінують для забезпечення контролю розвитку стійкості у тютюнової листокрутки-брунькоїда). Див. також публікацію заявки на патент США № 2009/0313717, що стосується білка Cry2 плюс Vip3Aa, Cry1F або Cry1A для контролю *Helicoverpa zea* або *armigerain*. WO 2009/132850 стосується використання Cry1F або Cry1A і Vip3Aa для контролю *Spodoptera frugiperda*. Публікація заявки на патент США №2008/0311096 частково стосується використання Cry1Ab для контролю ECB, стійкого до Cry1F.

Таким чином, деякі властивості трансгенних рослин, стійких до комах, які привели до швидкого і широкого впровадження цієї технології, але також викликали побоювання, що популяції комах-шкідників вироблять стійкість до білків, які мають інсектицидну дію, що продукуються цими рослинами. Було запропоновано декілька стратегій для збереження утилітарності пов'язаних з стійкістю до комах ознак, основаних на Bt, які включали введення білків у високих дозах в комбінації з організацією сховищ (рефугій) і почергове або одночасне введення різних токсинів (McGaughey et al. (1998), "B.t. Resistance Management", *Nature Biotechnol.* 16: 144-146).

Білки, вибрані для використання в наборі для керування стійкістю комах (IRM) повинні виявляти свою інсектицидну дію незалежно таким чином, щоб стійкість, розвинена до одного білка, не спричиняла появи стійкості до другого білка (тобто, щоб була відсутня перехресна стійкість до білків). Наприклад, якщо популяція комах-шкідника, яка виявляє стійкість до "Білка А", є чутливою до "Білка В", можна зробити висновок, що перехресна стійкість відсутня і, що комбінація Білка А і Білка В буде ефективною для сповільнення розвитку стійкості до Білка А, що застосовується ізолювано.

При відсутності популяцій комах, що мають стійкість, може бути проведений аналіз на основі інших характеристик, які, як передбачається, пов'язані з механізмом дії і потенціалом розвитку перехресної стійкості. Були висунуті припущення, згідно з якими для ідентифікації білків, що мають інсектицидну дію, які, ймовірно, не мають властивості перехресної стійкості, можна використовувати рецептор-опосередковане зв'язування (van Mellaert et al. 1999). Ключовий прогностичний параметр відсутності перехресної стійкості, природно властивий такому підходу, полягає в тому, що білки, які мають інсектицидну дію, не конкурують за рецептори у чутливих до них видів комах.

Якщо два Bt токсини конкурують за один і той же рецептор, то у випадку мутації цього рецептора у комах, при якій один з токсинів більше не зв'язується з цим рецептором і, отже, більше не має інсектицидної дії відносно цієї комах, ця комаха може стати стійкою також і до другого токсину (який конкурентно зв'язується з тим же рецептором). При цьому комах розглядається як така, що має перехресну стійкість до обох Bt токсинів. Однак якщо два токсини зв'язуються з різними рецепторами, це може служити вказівкою на те, що комаха може не бути одночасно стійкою до цих двох токсинів.

Наприклад білок Cry1Fa застосовуємо для контролю багатьох лускокрилих комах-шкідників, включаючи метелика кукурудзяного (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) і кукурудзяну листову совку (FAW; *Spodoptera frugiperda*), і виявляє активність відносно вогнівки цукрової тростини (SCB; *Diatraea saccharalis*). Білок Cry1Fa, що виробляється в трансгенних рослинах кукурудзи, що

містять фактор TC1 507, є відповідальним за розвиток стійкості до домінуючих в даній галузі комах, тобто за контроль FAW. Cry1Fa також використовується в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

Додаткові Cry токсини перераховані на веб-сайті офіційного комітету по номенклатурі B.t. (Crickmore et al.; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\_Crickmore/Bt/). У цей час існує приблизно 60 основних груп "Cry" токсинів (Cry1-Cry59) з додатковими Cyt токсинами, VIP токсинами і т. п. Багато груп з числовими позначеннями мають підгрупи, позначені великими буквами, а позначені великими буквами підгрупи мають підгрупи, позначені маленькими буквами. (Наприклад, Cry1 має підгрупи A-L, а Cry1A має підгрупи a-i).

#### КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Таким чином, даний винахід частково стосується застосування білка Vip3Ab в комбінації з білком Cry1Ca. Рослини (і площа угідь, засіяних такими рослинами), які виробляють обидва ці білки, включені в об'єм даного винаходу.

Даний винахід частково стосується несподіваного відкриття того, що Vip3Ab і Cry1Ca не конкурують один з одним за ділянки зв'язування в мембранних препаратах, отриманих з клітин кишкового кукурудзяної листової совки (FAW; *Spodoptera frugiperda*).

Даний винахід також стосується пакетів або "пірамід" з трьох (або більше) токсинів, в яких Vip3Ab і Cry1Ca є основною парою. У деяких переважних варіантах здійснення пірамід комбінація вибраних токсинів забезпечує активність відносно FAW без розвитку перехресної стійкості. Деякі переважні комбінації-піраміди з "трьома місцями дії" включають основну пару білків, плюс Cry1Fa, Cry1Da, Cry1Be або Cry1E як третій білок, що впливає на FAW. Ці конкретні потрібні пакети, згідно з даним винаходом, несподівано забезпечують три місця дії у FAW. Це може сприяти пом'якшенню або усуненню вимоги до площ сховищ.

Відповідно до даного винаходу також можуть бути додані додаткові токсини/гени. Наприклад, якщо Cry1Fa або Cry1Be вводять в пакет разом з парою білків за винаходом (обидва білки Cry1Fa і Cry1Be виявляють активність як відносно FAW так і відносно метелика кукурудзяного (ECB)), додавання двох додаткових білків в цей потрібний пакет, в якому два додаткових білки націлені на ECB, забезпечить три місця дії у FAW і три місця дії у ECB. Ці два додані білки (четвертий і п'ятий білок) можуть бути вибрані з групи, що складається з Cry2A, Cry1I, DIG-3 і Cry1Ab, що дає в результаті пакет з п'яти білків, що мають по три місця дії у двох комах (ECB і FAW).

#### ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід частково стосується несподіваного відкриття, яке полягає в тому, що Vip3Ab і Cry1Ca не конкурують один з одним за ділянки зв'язування в мембранних препаратах, отриманих з клітин кишкового кукурудзяної листової совки (FAW; *Spodoptera frugiperda*). Таким чином, білок Vip3Ab може бути використаний в комбінації з білком Cry1Ca в трансгенній кукурудзі (і інших рослинах, наприклад, бавовні і сої) для сповільнення або запобігання розвитку у FAW стійкості до кожного з вказаних білків окремо. Пара білків, що розглядається, може бути ефективною при захисті рослин (таких рослин, як маїс і соя) від пошкоджень, що наносяться кукурудзяною листовою совкою, стійкою до Cry. Іншими словами, одна з галузей застосування даного винаходу стосується захисту кукурудзи і інших економічно важливих видів рослин від пошкоджень і втрати урожаю, викликаних популяціями кукурудзяної листової совки, у яких може розвинути стійкість до Vip3Ab або Cry1Ca.

У даному винаході, таким чином, розкривається пакет для керування стійкістю комахами (IRM), що містить Vip3Ab і Cry1Ca і призначений для запобігання або послаблення розвитку у FAW стійкості до кожного або обох цих білків.

Даний винахід забезпечує композиції для контролю лускокрилих комах-шкідників, що містять клітини, які продукують білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію.

Винахід також стосується хазяїна, трансформованого для продукування як білка Vip3Ab, що має інсектицидну дію, що так і білка Cry1Ca, що має інсектицидну дію, причому вказаний хазяїн являє собою мікроорганізм або клітину рослини. Полінуклеотид(и), що розглядається, переважно знаходиться в генетичній конструкції під керуванням промотору(ів), що не належить *Bacillus thuringiensis*. Полінуклеотиди, що розглядаються, можуть містити кодони, що використовуються для посиленої експресії в рослинах.

Додатково передбачається, що винахід забезпечує спосіб контролю лускокрилих комах-шкідників, що містить приведення в контакт вказаних комах-шкідників з ефективною кількістю композиції, яка містить білок Vip3Ab, що містить ядро токсину, і білок Cry1Ca, що містить ядро токсину.

Один з варіантів здійснення винаходу містить рослину маїсу, що містить експресований в

рослині ген, який кодує білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, і експресований в рослині ген, який кодує білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію.

Інший варіант здійснення винаходу містить рослину маїсу, в якій експресований в рослині ген, який кодує білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, і експресований в рослині ген, який кодує білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, були введені у вказану рослину маїсу шляхом інтрогресії.

Як описано в Прикладах, дослідження конкурентного зв'язування з рецептором з використанням міченого радіоактивним ізотопом білка Cry1Ca показали, що білок Cry1Ca не конкурує за зв'язування в тканинах FAW, в яких відбувається зв'язування Vip3Ab. Ці результати також вказують на те, що комбінація білків Vip3Ab і Cry1Ca може являти собою ефективний засіб для послаблення розвитку стійкості в популяціях FAW до кожного з цих білків. Таким чином, частково основуючись на даних, представлених в цьому документі, можна передбачити, що спільне продукування (пакетування) білків Cry1Ca і Vip3Ab може бути використане для отримання IRM пакету з високими дозами для FAW.

До цієї пари можуть бути додані інші білки. Наприклад, винахід, що розглядається, також частково стосується потрібних пакетів або "пірамід", що складаються з трьох (або більше) токсинів, де Vip3Ab і Cry1Ca є основною парою. У деяких переважних варіантах здійснення піраміди вибрані токсини мають три окремі місця дії у FAW. Деякі переважні комбінації для піраміди з "трьома місцями дії" включають основну пару білків, що розглядається, плюс Cry1Fa, Cry1Da, Cry1Be або Cry1E як третій білок для впливу на FAW. Під "окремими місцями дії" мається на увазі те, що кожний з даних білків не викликає розвитку перехресної стійкості з іншими білками. Ці конкретні потрібні пакети, згідно з даним винаходом, несподівано забезпечують три місця дії у FAW. Це може сприяти пом'якшенню або усуненню вимоги до площ сховищ.

Що стосується деяких приватних варіантів здійснення даного винаходу, автори показали, що популяція FAW, стійка до інсектицидної активності білка Cry1Fa, не є стійкою до інсектицидної активності білка Vip3Ab або інсектицидної активності білка Cry1Ca. Автори продемонстрували, що Cry1Ca не конкурує за ділянки зв'язування з Cry1Fa, і що Vip3Ab не конкурує за ділянки зв'язування з Cry1Fa в кишечнику FAW. ДИВ. US 61/284281 (подану 16 грудня 2009) відносно Cry1Fa і Cry1Ca, і паралельно подану заявку PCT озаглавлену "COMBINED USE OF Vip3Ab AND Cry1Fa FOR MANAGEMENT OF RESISTANT INSECTS".

Таким чином, пари токсинів Cry1Fa плюс Vip3Ab і Cry1Fa плюс Cry1Ca забезпечують активність відносно FAW без розвитку перехресної стійкості. Нездатність Vip3Ab1 конкурувати з Cry1Ca за зв'язування в кишечнику FAW демонструє, що ці три білки-токсини (Cry1Fa, Vip3Ab, Cry1Ca) представляють потрібний пакет - піраміду токсинів Cry, яка забезпечує три окремі цільові ділянки взаємодії в кишечнику FAW. Ці конкретні потрібні пакети, згідно з даним винаходом, несподівано забезпечують вплив на FAW без розвитку перехресної стійкості. Більше того, демонстрація того, що ці три білки не конкурують один з одним, дозволяє фахівцям в даній галузі техніки прийти до висновку, що це може сприяти пом'якшенню або усуненню вимоги до площ сховищ. Дане розкриття забезпечує перевагу, яка полягає в тому, що рослини, експресуючі комбінацію Cry1Fa, Vip3Ab і Cry1Ca будуть корисні для сповільнення або запобігання розвитку у FAW стійкості до кожного з цих білків і їх комбінації.

Відповідно до даного винаходу також можуть бути додані додаткові токсини/гени. Наприклад, якщо Cry1Fa або Cry1Be вводять в пакет разом з парою білків за винаходом (обидва білки Cry1Fa і Cry1Be виявляють активності як відносно FAW, так і відносно метелика кукурудзяного (ECB)), додавання двох додаткових білків в цей потрібний пакет, в якому два додаткові білки націлені на ECB, забезпечить три місця дії у FAW і три місця дії у ECB. Ці два додані білки (четвертий і п'ятий білок) можуть бути вибрані з групи, що складається з Cry2A, Cry1I, DIG-3 (див. заявку на патент США № 61/284278 (подана 16 грудня 2009) і US 2010 00269223) і Cry1Ab, що дає в результаті пакет з п'яти білків, що мають по три місця дії у двох комах (ECB і FAW).

Таким чином, одна з можливих схем обробки являє собою використання пари білків, що розглядається, в комбінації з третім токсином/геном і використання цього потрібного пакету для послаблення розвитку у FAW стійкості до кожного з цих токсинів. Відповідно, винахід, що розглядається, також стосується потрібних пакетів або "пірамід", що складаються з трьох (або більше) токсинів. У деяких переважних варіантах здійснення піраміди вибрані токсини мають три окремі місця дії відносно FAW.

Серед інших схем обробки за даним винаходом можуть бути використані два, три або більше білків з білків, що розглядаються в регіонах зростання кукурудзи, в яких FAW може формувати популяції з розвиненою стійкістю.

З урахуванням того, що Cry1Fa активний відносно FAW і ECB, Vip3Ab плюс Cry1Ca плюс Cry1Fa несподівано забезпечують, згідно з даним винаходом, три місця дії у FAW. Це може сприяти пом'якшенню або усуненню вимоги про площі сховищ.

Cry1Fa міститься в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™. Пара генів (Vip3Ab і Cry1Ca), що розглядається, може бути скомбінована, наприклад з продуктом, що містить Cry1Fa, таким як Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™. Відповідно, пара білків, що розглядається, може відігравати значну роль в зменшенні тиску відбирання на ці і інші білки. Пара білків, що розглядається, може бути використана в комбінаціях з трьох генів для кукурудзи і інших рослин (наприклад, бавовни і сої).

Як вже вказувалося вище, згідно з даним винаходом також можуть бути додані додаткові токсини/гени. Відносно використання Cry1E (для контролю FAW), див. заявку на патент США № 61/284278 (подана 16 грудня 2009).

Рослини (і площі угідь, засіяних такими рослинами), які виробляють будь-які з комбінацій білків, що розглядаються, включені в об'єм даного винаходу. Також можуть бути додані додаткові токсини/гени, однак вище конкретні пакети, що обговорюються, несподівано забезпечують множинну місць дії у FAW і ECB. Це може сприяти пом'якшенню або усуненню вимоги до площ сховищ. Отже, засіяним таким чином поле, площа якого перевищує десять акрів, входить в об'єм даного винаходу.

Для отримання послідовностей будь-яких генів і білків, розкритих або згаданих в цьому документі, також може бути використаний GENBANK. ДІВ. Додаток А нижче. Релевантні послідовності також доступні з патентів. Наприклад, патент США № 5188960 і патент США № 5827514 описують білки, що містять ядро токсину Cry1Fa, які є відповідними для здійснення даного винаходу. Патент США № 6218188 описує оптимізовані для рослин послідовності ДНК, що кодують білки, які містять ядро токсину Cry1Fa, які підходять для використання в даному винаході. У US 61/284275 (подана 16 грудня 2009) розкриті деякі укорочені білки Cry1Ca, які можуть бути використані відповідно до даного винаходу.

Комбінації білків, описаних в цьому документі, можуть бути використані для контролю лускокрилих комах-шкідників. Дорослі лускокрилі, наприклад, метелі і метелики, в основному харчуються квітковим нектаром і є важливими запилювачами. Практично всі личинки лускокрилих, тобто гусениці, харчуються рослинами, і багато які з них є важливими комахами-шкідниками. Гусениці поїдають внутрішню частину листя, коріння або стебло рослини, лишаючи рослину можливості отримувати поживні речовини і часто руйнуючи фізичну опорну структуру рослини. Крім цього, гусениці поїдають плоди, тканини і зерно і борошно, що зберігаються, надаючи цим продуктам нетоварного вигляду або серйозно знижуючи їх цінність. Як використовується в цьому документі, під лускокрилими комахами-шкідниками маються на увазі різні стадії життєвого циклу комах-шкідника, включаючи стадії личинки.

Деякі химерні токсини за даним винаходом містять повну N-кінцеву частину ядра токсину Bt і, в деякій точці від кінця частини, що містить ядро токсину, білок переходить в гетерологічну послідовність протоксину. N-кінцева частина токсину Bt, що має інсектицидну активність, називається "ядром" токсину. Перехід від сегмента ядра токсину до сегмента гетерологічного протоксину може знаходитися приблизно в місці з'єднання токсин/протоксин або, як альтернатива, може бути збережена частина природного протоксину (що простягається за межі частини ядра токсину) з переходом в гетерологічну частину, протоксин, розташовану далі.

Як приклад, один з химерних токсинів за даним винаходом являє собою частину, що стосується ядра токсину Cry1Ca (приблизно 600 амінокислот) і/або гетерологічний протоксин (інші амінокислоти до C-кінця). У одному з переважних варіантів здійснення, частина химерного токсину, що містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab. У переважному варіанті здійснення, частина химерного токсину, що містить протоксин, отримують з білка-токсину Cry1Ab.

Фахівець в даній галузі техніки визнає, що Bt токсини, навіть в рамках певного класу, такого як Cry1Ca, трохи розрізняються по довжині і точному положенню переходу від ядра токсину до частини, що стосується протоксину. Звичайно токсини Cry1Ca мають довжину від приблизно 1150 до приблизно 1200 амінокислот. Перехід від частини, що стосується ядра токсину, до частини, що стосується протоксину, звичайно знаходиться в межах від 50 % до 60 % повної довжини токсину. Химерний токсин винаходу, що розглядається, повністю включає вказану N-кінцеву частину ядра токсину. Таким чином, химерний токсин містить щонайменше 50 % повної довжини білка-токсину Cry1 Bt, що звичайно складає щонайменше 590 амінокислот. Що стосується частини, яка стосується протоксину, то повна довжина частини, яка стосується протоксину Cry1Ab, простягається від кінця частини, що стосується ядра токсину, до C-кінця молекули.

Гени і токсини. Гени і токсини, що використовуються за даним винаходом, включають не тільки розкриті послідовності повної довжини, але також фрагменти цих послідовностей, варіанти, мутанти і злиті білки, які зберігають характеристики пестицидної активності токсинів, приклади яких приведені в цьому документі. У цьому документі термін "варіанти" або "варіації"

5 генів стосується нуклеотидних послідовностей, які кодують одні і ті ж токсини або які кодують токсини-еквіваленти, що мають пестицидну активність. У цьому документі термін "токсини-еквіваленти" стосується токсинів, що мають таку ж або по суті таку ж біологічну активність відносно цільових комах-шкідників, що і заявлені токсини.

У цьому документі використовуються наступні обмежувальні ознаки: приблизно 95 % (для Vip3Ab і Cry1Ca), 78 % (для Vip3Ab і Cry1C) і 45 % (для Cry1) 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 обмеження застосовні тільки відносно ядра токсинів.

15 Для фахівця в даній галузі техніки очевидно, що гени, які кодують активні токсини, можуть бути ідентифіковані і отримані декількома способами. Конкретні гени або частини генів, проілюстровані в цьому документі, можуть бути отримані з ізолятів, депонованих в депозитарії культур. Ці гени або їх частини, або варіанти також можуть бути сконструйовані синтетично, наприклад, з використанням синтезатора генів. Варіації генів можуть бути легко сконструйовані

20 стандартними методами для здійснення точкових мутацій. Фрагменти цих генів також можуть бути отримані з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз згідно зі стандартними процедурами. Наприклад, для послідовного відщеплення нуклеотидів від кінців цих генів можуть бути використані такі ферменти, як Bal31, або сайт-направлений мутагенез. Гени, що кодують активні фрагменти, також можуть бути отримані з використанням різних рестрикційних ферментів. Для безпосереднього отримання активних фрагментів вказаних

25 білків-токсинів можуть бути використані протеази.

Фрагменти і еквіваленти, які зберігають пестицидну активність проілюстрованих токсинів, також знаходяться в межах об'єму даного винаходу. Внаслідок надлишковості генетичного коду амінокислотні послідовності, розкриті в цьому документі, можуть кодуватися множиною різних

30 ДНК-послідовностей. Фахівцеві в даній галузі техніки не складе труднощів створити такі альтернативні ДНК-послідовності, що кодують такі ж або по суті такі ж токсини. Такі варіанти ДНК-послідовностей знаходяться в межах об'єму даного винаходу. У цьому документі "по суті такі ж" послідовності означають послідовності, що мають заміни, делеції, додавання або вставки, які істотно не впливають на пестицидну активність. Це визначення також охоплює

35 фрагменти генів, що кодують білки, які зберігають пестицидну активність.

Ще один спосіб ідентифікації генів, що кодують токсини, і частин генів, придатних згідно з даним винаходом, полягає у використанні олігонуклеотидних зондів. Такі зонди являють собою детектовані нуклеотидні послідовності. Ці послідовності можуть бути детектованими внаслідок наявності відповідної мітки або можуть бути виконані з можливістю їх природної флуоресценції,

40 як описано в міжнародній заявці WO93/16094. Як відомо з рівня техніки, якщо зонд і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються, формуючи сильний зв'язок між двома вказаними молекулами, можна зробити досить обґрунтоване припущення, що зонд і зразок є по суті гомологічними. Переважно, гібридизацію проводять в жорстких умовах методом, добре відомим з рівня техніки, наприклад, описаним в Keller, G. FL, M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton

45 Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Деякі приклади комбінацій концентрації солі і температури є наступними (в порядку зростання 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 засіб для визначення відомим способом, чи сталася гібридизація. Такий зондовий аналіз забезпечує швидкий спосіб ідентифікації кодуючих токсин

50 генів за даним винаходом. Нуклеотидні сегменти, що використовуються як зонди, згідно з винаходом, можуть синтезуватися в ДНК-синтезаторі і за допомогою стандартних процедур. Дані нуклеотидні послідовності також можуть використовуватися як ПЦР-праймери для ампліфікації генів за винаходом.

Варіанти токсинів. У цьому документі, зокрема, приведені приклади деяких токсинів за винаходом. Оскільки ці токсини є усього лише прикладами токсинів за винаходом, очевидно, що даний винахід містить варіанти або еквівалентні токсини (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), що мають пестицидну активність, таку ж або аналогічну пестицидній активності токсину, приведеного як приклад. Еквівалентні токсини мають гомологію по амінокислотам з приведеним як приклад токсином. Така гомологія по амінокислотах звичайно

60 перевищує 75 %, переважно перевищує 90 %, і найбільш переважно перевищує 95 %. Гомологія

по амінокислотах є найбільшою в критичних областях, які відповідальні за біологічну активність або беруть участь у визначенні тривимірної конфігурації, яка, зрештою, і відповідає за біологічну активність. У цьому відношенні, певні амінокислотні заміни є прийнятними і допустимими, якщо ці заміни знаходяться в областях, які не є критичними для активності або являють собою консервативні амінокислотні заміни, які не впливають на тривимірну конфігурацію молекули. Наприклад, амінокислоти можуть бути віднесені до наступних класів: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислі. Консервативні заміни, в яких амінокислота одного класу замінюється амінокислотою з того ж класу, знаходяться в межах об'єму даного винаходу за умови, що заміна не змінює істотно біологічну активність сполуки. Нижче приводиться список прикладів амінокислот, що належать кожному класу.

Клас амінокислот	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 прикладах також можуть бути використані неконсервативні заміни. При цьому критичним фактором є те, що такі заміни не повинні істотно погіршувати біологічну активність токсину.

Рекомбінантні хазяїни. Гени, що кодують токсини за даним винаходом, можуть бути введені у множині різних мікроорганізмів-хазяїнів або рослин-хазяїнів. Експресія гена токсину приводить в результаті, прямо або опосередковано, до внутрішньоклітинного продукування і підтримування пестициду. Для створення штаму Bt, що експресує обидва токсини за винаходом, можуть бути використані кон'югаційне перенесення і рекомбінантне перенесення. Один або обидва гени токсинів можуть бути перенесені також в інші організми-хазяїни, які можуть потім використовуватися для отримання синергічного ефекту. При використанні прийнятних мікроорганізмів-хазяїнів, наприклад, *Pseudomonas*, такі мікроорганізми можна застосовувати в місцях знаходження комах-шкідника, де вони будуть розмножуватися і потрапити в кишечник комах, що приведе в результаті до контролю комах-шкідника. Як альтернатива, мікроорганізми, що містять ген токсину, можуть бути оброблені в умовах, що продовжують активність токсину і стабілізують клітину. Потім оброблені клітини, які зберігають токсичну активність, вносять в середовище проживання цільової комах-шкідника.

Якщо ген Bt токсину вводять за допомогою прийнятного вектора в мікроорганізм-хазяїн, а вказаний хазяїн потім вводять в середовище проживання в живому стані, то принциповим моментом є використання певних мікроорганізмів-хазяїнів. Вибираються такі мікроорганізми-хазяїни, відносно яких відомо, що вони проживають в "фітосфері" (філоплані, філосфері, ризосфері і/або ризоплані) однієї або більше представляючих інтерес зернових культур. Такі мікроорганізми вибирають таким чином, щоб вони мали здатність успішно конкурувати в конкретному середовищі проживання (зерновій культурі або інших місцях проживання комах) з дикими типами мікроорганізмів, забезпечували стабільну підтримку і експресію поліпептиду-пестициду і, бажано, забезпечували поліпшений захист пестициду від розкладання і інактивації під дією навколишнього середовища.

Відносно величезної кількості мікроорганізмів відомо, що вони проживають в філоплані (поверхні листя рослин) і/або в ризосфері (ґрунті, що оточує кореневу систему рослини) множини важливих зернових культур. Ці мікроорганізми включають бактерії, водорості і гриби. Особливий інтерес представляють такі мікроорганізми, як бактерії, наприклад, що належать до родів *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*; гриби, зокрема, дріжджі, наприклад, що належать до видів *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес представляють такі види бактерій, що проживають в фітосфері, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azotobacter vinlandii*, такі види проживаючих в фітосфері дріжджів, 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.

Існує широкий спектр способів введення Bt генів, що кодують токсин, в мікроорганізм-хазяїн



в умовах що забезпечують стабільну підтримку і експресію цього гена. Ці способи добре відомі фахівцям в даній галузі техніки і описані, наприклад, в патенті США № 5135867, який включений в цей документ у вигляді посилання.

Обробка клітин. Клітини *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, що експресують Bt токсини, можуть бути оброблені з метою продовження активності токсину і стабілізації клітини. Мікрокапсула, що формується з пестицидом містить Bt токсин або токсини всередині клітинної структури, яка була стабілізована і захищає токсин при внесенні мікрокапсули в середовище проживання цільової комахи-шкідника. Прийнятні клітини-хазяїни можуть включати або клітини прокариот, або еукаріот, і звичайно обмежені тільки тими клітинами, які не виробляють речовини, токсичні для вищих організмів, таких як ссавці. Проте, можуть бути використані організми, що виробляють речовини, токсичні для вищих організмів, якщо ці токсичні речовини є нестабільними, або кількість, що вноситься, є настільки низькою, що при цьому відсутня яка-небудь імовірність інтоксикації ссавця-хазяїна. Як хазяїни особливий інтерес представляють прокариоти і нижчі еукаріоти, такі як гриби.

При обробці клітини звичайно є інтактними і по суті знаходяться в проліферативній формі, а не в формі спор, хоча в деяких випадках можуть бути використані спори.

Обробка клітин мікроорганізмів, тобто клітин, що містять ген або гени Bt токсину, може виконуватися з використанням хімічних або фізичних засобів або з використанням комбінації хімічних і/або фізичних засобів за умови, що ці методи не впливають негативного чином на властивості токсину, а також не погіршують здатності клітини захищати токсин. Прикладами хімічних реагентів є галогенуючі агенти, зокрема, галогени з атомними номерами 17-80. Точніше, можна використовувати йод в м'яких умовах протягом часу, достатнього для досягнення бажаних результатів. Інші прийнятні методи включають обробку альдегідами, такими як глутаральдегід; протиінфекційними засобами, такими як зефіран хлорид і цетилпіридинхлорид; спиртами, такими як ізопропіловий спирт і етанол; різними гістологічними фіксаторами, такими як Люголь-йод, фіксатор Буена, різні кислоти і фіксатор Helly (див. Humason, Gretchen L., *Animal Tissue Techniques*, W. H. Freeman and Company, 1967); або комбінацією фізичних (тепло) і хімічних агентів, які захищають і сприяють пролонгуванню активності токсину, що продукується в клітині при введенні цієї клітини тварини-хазяїна. Прикладами фізичних засобів є короткохвильове випромінювання, таке як гамма-випромінювання і рентгенівське випромінювання, заморожування, УФ-опромінення, ліофілізація і інші. Способи обробки клітин мікроорганізмів описані в патентах США №№ 4695455 і 4695462, які включені в цей документ у вигляді посилання.

Клітини звичайно мають підвищену структурну стабільність, що збільшує їх стійкість до умов навколишнього середовища. Якщо пестицид знаходиться в проформі, спосіб обробки клітини потрібно вибирати таким чином, щоб патогеном цільової комахи-шкідника не пригнічувався процесинг від проформи до зрілої форми пестициду. Наприклад, формальдегід буде зшивати білки і може пригнічувати процесинг проформи поліпептиду-пестициду. Спосіб обробки клітини повинен сприяти збереженню щонайменше істотної частки біодоступності або біоактивності токсину.

Представляючий особливий інтерес характеристики при виборі клітини-хазяїна з метою продукування, включають легкість введення Bt гена або генів в клітину-хазяїна, доступність експресуючої системи, ефективність експресії, стабільність пестициду в клітині-хазяїні і наявність допоміжних генетичних можливостей. Представляючий особливий інтерес характеристики у випадку використання у вигляді пестицидної мікрокапсули включають захисні властивості відносно пестициду, такі як товсті клітинні стінки, пігментація і внутрішньоклітинна упаковка або формування включень; виживання у водному середовищі; відсутність токсичності для ссавця; привабливість для поглинання комахами-шкідниками; легкість в знищенні і фіксації без пошкодження токсину і тому подібне. Також може розглядатися легкість в створенні і звертанні, економічність, стабільність при зберіганні і тому подібне.

Вирощування клітин. Клітину-хазяїна, що містить інсектицидний Bt ген або гени можна вирощувати в будь-якому прийнятному поживному середовищі, в якому ДНК-конструкція забезпечує селективну перевагу, забезпечуючи таке селективне середовище, що всі або по суті всі клітини зберігають Bt генів. Потім ці клітини можуть бути зібрані відомими методами. З іншого боку, клітини можна обробляти до їх збирання.

Bt клітини, що продукують токсини за винаходом, можуть бути культивовані з використанням стандартних середовищ і методів ферментації, відомих в даній галузі техніки. Після завершення циклу ферментації бактерії можуть бути зібрані спочатку шляхом виділення спор і кристалів Bt з ферментаційного бульйону способами, добре відомими в даній галузі. Відновлені спори і кристали Bt можуть бути представлені в складах у вигляді змочуваного порошку, рідкого

концентрату, гранул або у вигляді інших складів з додаванням поверхнево-активних речовин, диспергуючих речовин, інертних наповнювачів і інших компонентів для полегшення поводження з ними і їх застосування відносно конкретних цільових комах-шкідників. Такі склади і процедури нанесення добре відомі в даній галузі.

Склади. Сформовані гранули-приманки, що містять аттрактант і спори, кристали і токсини Bt ізолятів, або рекомбінантні мікроби, що містять гени, отримані з Bt ізолятів, розкритих в цьому документі, можуть бути внесені в ґрунт. Сформований продукт також може бути нанесений у вигляді покриття на насіння або в процесі обробки коріння або обробки всієї рослини на пізніх стадіях циклу розвитку кукурудзи. Обробка рослин і ґрунту Bt клітинами може проводитися з використанням змочуваних порошків, гранул або пудри шляхом змішування з різними інертними матеріалами, такими як неорганічні мінерали (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати і т. п.) або рослинними матеріалами (подрібненою серцевиною кукурудзяного качана, рисовим лушпинням, горіховою шкаралупою і т. п.). Склади можуть включати адгезивні ад'юванти, стабілізуючі агенти, інші пестицидні добавки або поверхнево-активні речовини. Рідкі склади можуть бути водними або неводними і можуть застосовуватися у вигляді пін, гелів, суспензій, емульгованих концентратів і т. п. Інгредієнти можуть включати реологічні агенти, поверхнево-активні речовини, емульгатори або полімери.

Як добре відомо фахівцям в даній галузі, пестицидна концентрація може варіювати в широких межах залежно від природи конкретної композиції, зокрема, від того, чи буде вона являти собою концентрат або буде використовуватися безпосередньо. Пестицид може бути присутнім щонайменше в кількості 1 ваг. % і може становити 100 % ваги композиції. Сухі композиції можуть містити пестицид в кількості приблизно від 1 до 95 ваг. % в той час як рідкі склади як правило, можуть містити приблизно від 1 до 60 ваг. % твердої речовини в рідкій фазі. Композиції, як правило, можуть містити приблизно від  $10^2$  до  $10^4$  клітин/мг. Ці склади застосовуються в кількості від приблизно 50 мг (в рідкому або сухому вигляді) до 1 кг або більше на гектар.

Склади можуть наноситися на середовище проживання лускокрилої комах-шкідника, наприклад, на листя або на ґрунт, шляхом зрошування, запилення, оббризування і т. п.

Трансформація рослин. Переважним рекомбінантним хазяїном для продукування білків, що мають інсектицидну дію, за винаходом є трансформована рослина. Гени, що кодують білки Bt токсину, як це розкрито в цьому документі, можуть бути введені в клітини рослини множиною різних методів, які добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, для підготовки до введення чужорідних генів у вищі рослини доступна множина клонуючих векторів, що містять реплікаційну систему *Escherichia coli* і маркер, який забезпечує можливість відбирання трансформованих клітин. У число таких векторів входять, крім інших, pBR322, pUC серія, M13mp серія і pACYC184. Відповідно, фрагмент ДНК, що містить послідовність, що кодує білок Bt токсину, може бути вставлений у вектор у прийнятному сайті рестрикції. Отримана в результаті плазмідна використовується для трансформації в *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у прийнятному поживному середовищі, потім збирають і лізують. Плазмиди виділяють. Як способи аналізу звичайно використовують секвенування, рестрикційний аналіз, електрофорез і інші біохімічні і молекулярно-біологічні способи. Після кожної операції використана ДНК-послідовність може бути відщеплена і приєднана до наступної ДНК-послідовності. Кожна плазмідна послідовність може бути клонована в тих же або інших плазмідах. Залежно від способу введення в рослину бажаних генів також можуть бути необхідні інші ДНК-послідовності. Наприклад, якщо для трансформації клітини рослини використовуються плазмиди Ti або Ri, то щонайменше правий кінець, а часто як правий, так і лівий кінці Ti або Ri плазмідної Т-ДНК, повинні бути приєднані як фланкуючі області призначених для вставки генів. Використання Т-ДНК для трансформації клітин рослин детально досліджене і вичерпно розкрито в EP 120516, Lee and Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al, (1986) and An et al., (1985) і є добре відомим в даній галузі техніки.

Після того як введена ДНК інтегрується в геном рослини, вона стає відносно стабільною. Трансформаційний вектор звичайно містить забезпечуючий можливість відбирання маркер, який забезпечує стійкість трансформованої клітини рослини до біоциду або антибіотику, такого як, наприклад, Біалафос, Канаміцин, G418, Блеоміцин або Гігроміцин. Окремо використовуваний маркер повинен, відповідно, забезпечувати відбір трансформованих клітин, а не тих клітин, які не містять ДНК, що вводиться.

Існує множина способів введення ДНК у рослинну клітину-хазяїна. Ці способи включають трансформацію за допомогою Т-ДНК, використовуючи *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як трансформуючого агента, злиття, ін'єкцію, біоістику (бомбардування мікрочастинками) або електрпорацію, а також інші можливі способи. Якщо для трансформації використовуються *Agrobacteria*, призначена для введення ДНК повинна бути

клонувана в спеціальні плазмиди, а саме, або в проміжний вектор, або в бінарний вектор. Проміжні вектора можуть бути вбудовані в Ti або Ri плазмиду методом гомологічної рекомбінації завдяки послідовностям, що гомологічні послідовностям у T-ДНК. Ti або Ri плазмиди також стримають *vir*-область, необхідну для перенесення T-ДНК. Проміжні вектора не можуть самореплікуватися в *Agrobacteria*. Проміжний вектор може бути перенесений у *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою плазмиди-хелпера (кон'югація). Бінарні вектора можуть самореплікуватися як у *E. coli*, так і в *Agrobacteria*. Вони містять ген маркера селекції і лінкер або полілінкер, що обмежений областями правої і лівої меж T-ДНК. Вони можуть бути трансформовані безпосередньо в *Agrobacteria* (Holsters et al, 1978). *Agrobacteria*, використовувані як клітини-хазяї, повинні містити плазмиду, що несе *vir*-область. *Vir*-область необхідна для перенесення T-ДНК у клітину рослини. Також можуть міститися додаткові T-ДНК. Трансформовані в такий спосіб бактерії використовуються для трансформації клітин рослини. Для переносу ДНК у клітину рослини рослинні експлантанти можна переважно культивувати з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes*. Потім з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, частин листя, сегментів стебла, коренів, а також з протопластів або клітин, культивованих у суспензії) у придатному середовищі, що може містити антибіотики або біоциди для селекції, може бути регеновувана ціла рослина. Отримані в такий спосіб рослини потім можуть бути досліджені на наявність упродовженої ДНК. У випадку ін'єкції або електропорації до плазмід не пред'являється ніяких додаткових вимог. Можливе використання звичайних плазмід, таких як, наприклад, похідні від pUC.

Трансформовані клітини ростуть у рослинах звичайним чином. Вони можуть формувати зародкові клітини і передавати трансформовану ознаку(и) рослинам-нащадкам. Такі рослини можна вирощувати звичайним способом і схрещувати з рослинами, що мають такі ж трансформовані спадкоємні фактори або інші спадкоємні фактори. Отримані в результаті гібридні особи мають відповідні фенотипічні властивості.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу, рослини трансформують генами, у яких використання кодона оптимізовано для рослин. Див., наприклад, патент США № 5380831, включений у даний документ у вигляді посилання. Хоча в даному документі як приклади приведені укорочені токсини, в галузі використання Bt добре відомо, що 130 кДа (повнорозмірні) токсини мають N-кінцеву половину, що є ядром токсину, і C-кінцеву половину, що являє собою "хвіст" протоксину. Таким чином, з укороченими/ядерними токсинами за даним винаходом можна використовувати придатні "хвости". Див., наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Крім цього, способи створення синтетичних Bt генів для використання в рослинах відомі в даній галузі техніки (Stewart and Burgin, 2007). Одним з необмежуваних прикладів трансформованої рослини є плодоносна рослина маїсу, що містить експресований рослиною ген, що кодує білок Vip3Ab, і що додатково містить експресований рослиною ген, що кодує білок Cry1Ca.

Перенесення (або інтрогресія) ознаки(ознак) обумовленої Vip3Ab і Cry1Ca в інбредні лінії маїсу може досягатися шляхом виведення рослин на основі рекурентного відбору, наприклад, шляхом зворотного схрещування. У цьому випадку, бажаний рекурентний батько спочатку схрещується з донорною інбредною особою (нерекурентним батьком), що несе придатний ген(и) для ознак, обумовлених Vip3Ab і Cry1C. Потім потомство від цього зворотного схрещування спаровують з рекурентним батьком з наступним відбором отриманого потомства по бажаній ознаці(ах), що повинна бути перенесена від нерекурентного батька. Після трьох, переважно, чотирьох, більш переважно, п'яти або більше поколінь отриманих методом зворотного схрещування з рекурентним батьком у результаті відбору по бажаній ознаці(ах), потомство стає гетерозиготним по локусі, що контролює переносиму ознаку(и), але залишається подібним до рекурентного батька по більшості або майже по всіх інших генах (див., 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 стійкістю комах (IRM). Наприклад, Roush et al. описує стратегії з двома токсинами, що також називається створенням "пірамід" або "пакетів", для керування трансгенними рослинами, що мають інсектицидні властивості. (*The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777-1786).

На іншому веб-сайті Агентство США по захисту навколишнього середовища ([epa.gov/oprbpddl/biopesticides/pips/bt\\_corn\\_refuge\\_2006.htm](http://epa.gov/oprbpddl/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm)) опублікувало наступні вимоги для забезпечення нетрансгенних (тобто що не містить Bt генів) сховищ (розділ зернові культури/кукурудза, що не містить Bt генів) для використання з трансгенними зерновими культурами, продукує одним Bt білок, активний стосовно цільових комах-шкідників. "Конкретні структуровані вимоги до кукурудзи, захищеної від кукурудзяного метелика білками Bt

(Cry1Ab або Cry1F) є наступними:

Структуровані сховища:

20 % сховища з кукурудзи, що не має Bt захисту від лускокрилих в областях, де кукурудза є основною культурою;

5 50 % сховища з рослин, що не мають Bt захисту від лускокрилих, в областях, де бавовна є основною культурою;

Блоки:

Внутрішні (тобто усередині Bt поля).

10 Зовнішні (тобто окремі поля в межах 1/2 милі (1/4 милі, якщо можливо) від Bt поля для забезпечення максимального обсягу випадкового спарювання).

Розташовані на полі смуги

Смуги повинні мати щонайменше 4 ряди в ширину (переважно 6 рядів) для зменшення ефекту переміщення личинок".

15 Крім цього, Національна Асоціація Виробників Кукурудзи на своєму веб-сайті ([ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn](http://ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn))

також представила схожі рекомендації відносно вимог на сховища. Наприклад:

"Вимоги відносно IRM для метелика кукурудзяного:

- засівати щонайменше 20 % від площі посіву кукурудзи під гібриди-сховища.

20 - У регіонах, що вирощують бавовну, сховища повинні складати 50 %.

- Посіви необхідно висаджувати в межах 1/2 милі від гібридів-сховищ.

- Сховища можна засівати у вигляді смуг усередині Bt поля; смуги-сховища повинні складати щонайменше 4 ряди в ширину.

- Сховища можуть оброблятися звичайними пестицидами тільки у випадку досягнення економічного порога, що досягається для цільової комахи.

25 - Основані на Bt розпилювані інсектициди не можна використовувати відносно кукурудзи-сховища.

- Придатні сховища необхідно висаджувати на кожній фермі з Bt кукурудзою".

Як зазначено в Roush et al. (наприклад, на стор. 1780 і 1784, права колонка), створення пакетів або пірамід із двох різних білків, кожний з яких є активним відносно цільової комахи-шкідника, і з малою або без перехресної стійкості може забезпечувати можливість використання менших сховищ. Roush указує, що для успішно розробленого пакета розмір сховища менший ніж 10 % може забезпечити ефект по керуванню стійкістю, порівняний з 50 % притулком для одиночного (на організованого у вигляді піраміди) ознаки. Для доступних у даний час Bt продуктів кукурудзи Агентство Захисту Навколишнього Середовища США вимагає істотно меншого обсягу (звичайно 5 %) висаджених структурованих сховищ кукурудзи, що не містить Bt гени, ніж у випадку продуктів з єдиною ознакою (звичайно 20 %).

Існують різні способи забезпечення IRM ефектів сховищ, включаючи різні геометричні патерни саджань на полях (як уже згадувалося вище) і змішування насіння перед висіванням як обговорювалося в Roush et al. (см. вище) і в патенті США № 6551962.

40 Приведені вище процентні співвідношення або близькі до них співвідношення сховищ можуть використовуватися для розглянутих подвійних і потрійних пакетів або пірамід. Для потрійних пакетів і трьома місцями дії на одну цільову комаху-шкідника цільовим значенням є нульова площа сховища (або сховище із площею, наприклад, менше 5 %). Це особливо вірно для комерційних посівних площ, наприклад, більших ніж 10 акрів.

45 Усі патенти, заявки на патент, попередні заявки і публікації, на які приведені посилання або які цитуються в даному документі, включені у вигляді посилання у всій своїй повноті в тій частині, у якій вони не суперечать зведенням, у явному вигляді приводиться в даному описі.

За винятком випадків, коли це спеціально обговорено або впливає з контексту, граматичні форми однини варто розуміти як означаючи "щонайменше один".

50 Нижче приведені приклади, що ілюструють способи здійснення винаходу.

Ці приклади не слід розглядати як обмежуючі. Усі процентні співвідношення зазначені по масі, а співвідношення в розчинах зазначені по об'єму. Усі температури зазначені в градусах Цельсія.

#### ПРИКЛАДИ

55 Приклад 1 - Одержання й обробка трипсином білків Vip3Ab і Cry1Ca

Гени, що кодуєть протоксини Cry1Ca і Vip3Ab1 експресували в експресуючих штаммах *Pseudomonas fluorescens*, і білки повної довжини виділяли у вигляді нерозчинних внутрішньоклітинних тілець. Промиті внутрішньоклітинні тільца солюбілізували перемішуванням при 37 °C у буфері, що містить 20 mM CAPS буфера, pH 11, доповненому 10 mM DDT і, 0,1 % 2-меркаптоетанолом, протягом 2 годин. Розчин центрифугували при 27000x g протягом 10 хвилин

при 37 °C, супернатант обробляли 0,5 % (ваг./об.) ТСПК-оброблений трипсин (Sigma). Цей розчин інкубували при одночасному перемішуванні протягом 1 години при кімнатній температурі, фільтрували, потім завантажували в колонку Pharmacia Mono Q 1010, урівноважену 20 мм CAPS, рН 10,5. Після промивання зарядженого колонки буфером у кількості 2-х об'ємів колонки укорочений токсин елюювали, використовуючи лінійний градієнт 0-0,5 М NaCl у 20 мм CAPS у кількості 15-ти об'ємів колонки зі швидкістю потоку 1,0 мл/хв. Очищені Cru білки, укорочені трипсином, елюювали, використовуючи приблизно 0,2-0,3 М NaCl. Чистоту білків оцінювали ДСН-ПААГ електрофорезом і візуалізували за допомогою барвника Кумасі діамантового синього. У деяких випадках об'єднані фракції очищеного токсину концентрували і завантажували в колонку із Сефарозою 6 (діаметром 1,6 см, довжиною 60 см) і очищали гел'єхроматографією. Фракції, які містять один пік, що відповідає молекулярній вазі мономера, об'єднували і концентрували, одержуючи препарат, гомологічний більше ніж на 95 % білку з молекулярною вагою приблизно 60000 кДа.

Обробку Vir3Ab1 проводили аналогічним чином, узявши як вихідний білок очищений 85 кДа білок повної довжини (DIG-307). Білок (12 мг) діалізували в 50 мм натрій фосфатного буфера, рН 8,4, потім обробляли шляхом додавання 1 мг твердого трипсину і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Розчин завантажували в Моно аніонно-обмінний стовпчик (діаметром 1 см, довжиною 10 см) і елюювали, використовуючи лінійний градієнт 0-500 мМ NaCl у 20 мМ натрій фосфатному буфері, рН 8,4, у кількості, що дорівнює 7-ми об'ємам колонки. Елювання білка контролювали ДСН-ПААГ електрофорезом. Основна оброблена смуга мала молекулярну вагу 65 кДа, визначену методом ДСН-ПААГ електрофорезу з використанням для порівняння стандартів молекулярної ваги.

#### Приклад 2 - Йодування Cru1Ca білка ядра токсину

Попередня робота показала, що Cru1Ca важко піддається введенню радіоактивної мітки з використанням традиційних способів, хоча в деяких особливих випадках він може бути оснащений радіоактивною міткою і добре працювати в аналізі зв'язування з рецептором. Для введення радіоактивної мітки в Cru1Ca було вирішено використовувати метод з використанням <sup>125</sup>I-міченого флуоресцеїн-5-малеїміду, що успішно працював при міченні Cru1Fa (Prov. 69919). Йодування флуоресцеїн-5-малеїміду і наступна кон'югація цього радіоактивно міченої хімічної речовини з Cru1Ca забезпечили цистеїн-специфічне мічення білка. Така процедура введення радіоактивної мітки є високо специфічною стосовно призначеного для мічення залишкам. Сегмент Cru1Ca ядра токсину (залишки 29-619) містить два амінокислотні цистеїнові залишки в положеннях 210 і 438. Palmer et al. (1997) показав, що фенільне кільце флуоресцеїн-5-малеїміду може бути йодоване за допомогою радіоактивного йоду. Потім йодований флуоресцеїн-5-малеїмід може реагувати з білками, що містять сульфгідрильні групи (що забезпечується, наприклад, вільними цистеїновими залишками), шляхом алкілювання вільних цистеїнів у білку, і в такий спосіб утворити радіоактивно мічений білок. Укорочене трипсином ядро токсину Cru1Ca містить два цистеїнові залишки й у такий спосіб забезпечує субстрат для алкілювання і введення радіоактивної мітки в цих двох (специфічних) ділянках білка.

Флуоресцеїн-5-малеїмід (F5-M) розчиняли в 10 мМ ДМСО (диметилсульфоксид), потім розводили до концентрації 1 мМ забуференим фосфатом розсолу (PBS; 20 мМ фосфат натрію, 0,15 М NaCl, рН 7,5), що визначали за коефіцієнтом молярної екстинкції F 5-M (68000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>). До 100 мкл розчину PBS, що містить дві гранули Pierce для йодування (Thermo Fisher Scientific), додавали 1,0 мКи Na<sup>125</sup>I за свинцевим екраном. Реакцію між компонентами проводили протягом 5 хвилин при кімнатній температурі, потім у цей розчин додавали 10 мкл 1 мМ розчину F 5-M. Після проведення реакції йодування протягом 10 хв видаляли розчин за допомогою піпетки, і до розчину додавали 2 мкг укороченого трипсином Cru1Ca білка ядра токсину високої чистоти в PBS. Білок інкубували при 4 °C з розчином йодованого F 5-M протягом 48 годин, потім реакцію зупиняли додаванням β-меркаптоетанолу до одержання кінцевої концентрації, що дорівнює 14 мМ. Реакційну суміш вводили в центрифугальну колонку Zeba™ (Invitrogen), урівноважену 20 мМ CAPS, 150 мМ KCl, рН 9, і центрифугували при 1500x g протягом 2 хв для відділення йодованого барвника, що не прореагував, від білка. <sup>125</sup>I-мічений флуоресцеїн-Cru1Ca білок ядра токсину вимірювали на гамма-лічильнику для визначення питомої радіоактивності, виходячи з припущення, що було витягнуто 80 % отриманого білка токсину.

Питома активність радіоактивно міченого Cru1Ca білка ядра токсину склала приблизно 6,8 мКи/мкг білка. Радіоактивно мічений білок також аналізували ДСН-ПААГ електрофорезом і візуалізували методом одержання зображення з використанням люмінесцентної сполуки для підтвердження того, що виміряна радіоактивність є ковалентно зв'язаною з Cru1Ca білком ядра токсину. Пофарбовані Кумаси ДСН-ПААГ гелі SDS-PAGE візуалізували шляхом обгортання їх плівкою Mylar™ (товщиною 12 мкм) і експонування під люмінесцентним екраном Molecular

Dynamics (Sunnyvale, CA) (35 см × 43 см) із тривалим післясвітінням протягом 1 години. Пластини виявляли в люмінесцентному пристрої візуалізації Molecular Dynamics Storm 820, і зображення аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageQuant™. Невелика радіоактивність була зареєстрована в області гелю, розташованій набагато нижче смуги Cry1Ca білка ядра токсину (тобто, фрагментів, що були по розмірі менше Cry1Ca білка ядра токсину на приблизно 10 кДа і більше). Ці радіоактивні речовини, певно, являли собою невеликі пептиди, можливо, асоційовані з укороченим Cry1Ca білком унаслідок впливу трипсину, використаного для розщеплення білка до його ядерної структури.

Приклад 3 - Порівняльний аналіз зв'язування BBMV, виділеного з *S. frugiperda*, з білками ядра токсину Cry1Ca і Vip3Ab

Аналіз конкурентного гомологічного і гетерологічного зв'язування виконували, використовуючи 150 мкг/мл BBMV білка і 2 нМ <sup>125</sup>I-міченого Cry1Ca білка ядра токсину. Концентрації гомологічного конкурентного неміченого Cry1Ca білка ядра токсину, доданого до реакційної суміші, складали 0,1, 1, 10, 100 і 1000 нМ. Гетерологічний укорочений трипсином Vip3Ab білок досліджували при концентраціях 10 і 1000 нМ, і білки додавали одночасно з радіоактивним Cry1Ca білком ядра токсину для гарантії наявності щирої конкуренції за зв'язування. Інкубацію проводили протягом 1 години при 28 °C, і <sup>125</sup>I-мічений Cry1Ca білок ядра токсину, незв'язаний з BBMV (тобто, не зв'язаного з рецепторним білком комах), відокремлювали від зв'язаного білка центрифугуванням суміші BBMV при 16000x g протягом 8 хв і відділенням супернатанту від отриманого осаду. Осад промивали три рази охолодженим льодом буфером для зв'язування (PBS; 11,9 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4 плюс 0,1 % бичачий сироватковий альбумін; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) для повного видалення будь-якого незв'язаного <sup>125</sup>I-міченого Cry1Ca. Дно центрифугальної пробірки з осадом, що знаходиться в ньому, відрізали і поміщали в 13×100 мм скляну культуральну пробірку, і за допомогою гамма-лічильників підраховували події протягом 10 хвилин для одержання кількості зв'язаної радіоактивності, що міститься в осадовій фракції. Кількість радіоактивності у фракції зв'язаного білка є показником кількості білка Cry, зв'язаного з рецептором комах (загальне зв'язування). Неспецифічне зв'язування було представлено кількістю подій, отриманою в осаді в присутності 1000 нМ неміченого Cry1Ca білка ядра токсину. Кількість міченого Cry1Ca, специфічно зв'язаного з BBMV (специфічне зв'язування), одержували вирахуванням величини неспецифічного зв'язування з величини загального зв'язування. Вважалось, що сто відсотків загального зв'язування являє собою величину зв'язування при відсутності будь-якого конкурентного Cry1Ca білка ядра токсину. Дані виражені у відсотках специфічного зв'язування <sup>125</sup>I Cry1Ca залежно від концентрації конкуруючого неміченого ліганду.

Приклад 4 - Короткий огляд результатів

Результати (Фіг. 1) демонструють, що гомологічний немічений Cry1Ca білок ефективно замінює радіоактивно мічений Cry1Ca білок ядра токсину при специфічному зв'язуванні з BBMV білком, причому це заміщення залежить від дози. Vip3Ab не замінює зв'язаний <sup>125</sup>I-мічений Cry1Ca білок ядра токсину з рецепторного білка(ів) при обох показаних концентраціях (10 або 1000 нМ). Найвища досліджена концентрація Vip3Ab (1000 нМ) в 500 разів перевищує концентрацію радіоактивно міченого Cry1Ca, використаного в аналізі, демонструючи, що Vip3Ab не конкурує ефективно з радіоактивно міченим Cry1Ca за зв'язування з BBMV *S. frugiperda*.

Фіг. 1 являє собою криву доза-відповідь для заміщення <sup>125</sup>I-міченого флуоресцеїн-5-малеїмід укороченого трипсином Cry1Ca в BBMV, виділеному з личинки *S. frugiperda* (FAW). Ця фігура показує, що немічений Cry1Ca (●) здатний замінювати мічений Cry1Ca залежно від дози в діапазоні від 0,1 до 1000 нМ. На графіку показана процентна частка специфічно зв'язаного міченого Cry1Ca (загальне зв'язування мінус неспецифічне зв'язування) залежно від концентрації доданих лігандів без радіоактивної мітки. Показана нездатність Vip3Ab1 (▲) без радіоактивної мітки замінити специфічно зв'язаний радіоактивно мічений Cry1Ca в концентраціях 10 і 1000 нМ.

## Джерела інформації:

- 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.
- 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)
- 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 CryIF-resistant and Susceptible European Corn Borer and Fall Armyworm Colonies to CryIA.105 and Cry12Ab2. DAI 0830, 2008. Indianapolis, Dow AgroSciences. Derbi Report.
- Sheets, J. J. and Storer, N. P. Analysis of CryIAc Binding to Proteins in Brush Border Membrane Vesicles of Corn Earworm Larvae (*Heliothis zea*). Interactions with CryIF 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.
- 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.
- 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 a cadherin gene associated with resistance to CryIAc {delta}-endotoxin of Bacillus thuringiensis in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol* 71, 948-954.

## Додаток 1

Список ендотоксинів - від Crickmore et al., вебсайт (вказаний в заявці)

Інвентарний номер для запису в NCBI

Назва	Інв. номер	Автор	Рік	Штам-джерело	Коментарі
<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 послідовність ДНК
<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>	AAY66993	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	Тільки послідовність ДНК
<u>CryIAb12</u>	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
<u>CryIAb13</u>	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
<u>CryIAb14</u>	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	



<u>CryIAb15</u>	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<u>CryIAb16</u>	AAK55546	Yu et al	2002	Bt AC-11	
<u>CryIAb17</u>	AAT46415	Huang et al	2004	Bt WB9	
<u>CryIAb18</u>	AAQ88259	Stobdan et al	2004	Bt	
<u>CryIAb19</u>	AAW31761	Zhong et al	2005	Bt X-2	
<u>CryIAb20</u>	ABB72460	Liu et al	2006	BtC008	
<u>CryIAb21</u>	ABS18384	Swiecicka et al	2007	Bt IS5056	
<u>CryIAb22</u>	ABW87320	Wu and Feng	2008	BtS2491Ab	
<u>CryIAb-like</u>	AAK14336	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX24	Невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	AAK14337	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX28	Невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	AAK14338	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala RX27	Невизначена послідовність
<u>CryIAb-like</u>	ABG88858	Lin et al	2006	Bt ly4a3	Недостатня послідовність
<u>CryIAc1</u>	AAA22331	Adang et al	1985	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc2</u>	AAA22338	Von Tersch et al	1991	Bt kenya	
<u>CryIAc3</u>	CAA38098	Dardenne et al	1990	Bt BTS89A	
<u>CryIAc4</u>	AAA73077	Feitelson	1991	Bt kurstaki PS85A1	
<u>CryIAc5</u>	AAA22339	Feitelson	1992	Bt kurstaki PS81GG	
<u>CryIAc6</u>	AAA86266	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<u>CryIAc7</u>	AAB46989	Herrera et al	1994	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc8</u>	AAC44841	Omolo et al	1997	Bt kurstaki HD73	
<u>CryIAc9</u>	AAB49768	Gleave et al	1992	Bt DSIR732	
<u>CryIAc10</u>	CAA05505	Sun	1997	Bt kurstaki YBT-1520	
<u>CryIAc11</u>	CAA10270	Makhdoom & Riazuddin	1998		
<u>CryIAc12</u>	II2418	Ely & Tippet	1995	Bt A20	Тільки послідовність ДНК
<u>CryIAc13</u>	AAD38701	Qiao et al	1999	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIAc14</u>	AAQ06607	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>CryIAc15</u>	AAN07788	Tzeng et al	2001	Bt from Taiwan	
<u>CryIAc16</u>	AAU87037	Zhao et al	2005	Bt H3	
<u>CryIAc17</u>	AAX18704	Hire et al	2005	Bt kenya HD549	
<u>CryIAc18</u>	AAV88347	Kaur & Allam	2005	Bt SK-729	
<u>CryIAc19</u>	ABD37053	Gao et al	2005	Bt C-33	
<u>CryIAc20</u>	ABB89046	Tan et al	2005		
<u>CryIAc21</u>	AAV66992	Sauka et al	2005	INTA Mol-12	
<u>CryIAc22</u>	ABZ01836	Zhang & Fang	2008	Bt W015-1	
<u>CryIAc23</u>	CAQ30431	Kashyap et al	2008	Bt	

<u>Cry1Ac24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry1Ac25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	
<u>Cry1Ac26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry1Ac27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry1Ac28</u>	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
<u>Cry1Ad1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II	
<u>Cry1Ad2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
<u>Cry1Ae1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
<u>Cry1Af1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
<u>Cry1Ag1</u>	AAD46137	Mustafa	1999		
<u>Cry1Ah1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000		
<u>Cry1Ah2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
<u>Cry1Ai1</u>	AAO39719	Wang et al	2002		
<u>Cry1A-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	Невизначена послідовність
<u>Cry1Ba1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
<u>Cry1Ba2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
<u>Cry1Ba3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001		
<u>Cry1Ba4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
<u>Cry1Ba5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
<u>Cry1Ba6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
<u>Cry1Bb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
<u>Cry1Bc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
<u>Cry1Bd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
<u>Cry1Bd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
<u>Cry1Be1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
<u>Cry1Be2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003		
<u>Cry1Be3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry1Bf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001		
<u>Cry1Bf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003		
<u>Cry1Bg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002		
<u>Cry1Ca1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
<u>Cry1Ca2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
<u>Cry1Ca3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8II	
<u>Cry1Ca4</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	Тільки послідовність
<u>CryICb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD29	ДНК
<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		Тільки послідовність ДНК
<u>CryIDb1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<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 послідовність ДНК
<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 PS81I	
<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>CryIIa1</u>	CAA44633	Tailor et al	1992	Bt kurstaki	
<u>CryIIa2</u>	AAA22354	Gleave et al	1993	Bt kurstaki	
<u>CryIIa3</u>	AAC36999	Shin et al	1995	Bt kurstaki HD1	
<u>CryIIa4</u>	AAB00958	Kostichka et al	1996	Bt AB88	
<u>CryIIa5</u>	CAA70124	Selvapandiyan	1996	Bt 61	
<u>CryIIa6</u>	AAC26910	Zhong et al	1998	Bt kurstaki S101	
<u>CryIIa7</u>	AAM73516	Porcar et al	2000	Bt	
<u>CryIIa8</u>	AAK66742	Song et al	2001		
<u>CryIIa9</u>	AAQ08616	Yao et al	2002	Bt Ly30	
<u>CryIIa10</u>	AAP86782	Espindola et al	2003	Bt thuringiensis	
<u>CryIIa11</u>	CAC85964	Tounsi et al	2003	Bt kurstaki BNS3	
<u>CryIIa12</u>	AAV53390	Grossi de Sa et al	2005	Bt	
<u>CryIIa13</u>	ABF83202	Martins et al	2006	Bt	
<u>CryIIa14</u>	ACG63871	Liu & Guo	2008	Bt11	
<u>CryIIa15</u>	FJ617445	Guan Peng et al	2009	Bt E-1B	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>CryIIa16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>CryIIb1</u>	AAA82114	Shin et al	1995	Bt entomocidus BP465	
<u>CryIIb2</u>	ABW88019	Guan et al	2007	Bt PP61	
<u>CryIIb3</u>	ACD75515	Liu & Guo	2008	Bt GS8	
<u>CryIIc1</u>	AAC62933	Osman et al	1998	Bt C18	
<u>CryIIc2</u>	AAE71691	Osman et al	2001		
<u>CryIId1</u>	AAD44366	Choi	2000		
<u>CryIIe1</u>	AAG43526	Song et al	2000	Bt BTC007	
<u>CryIIfl</u>	AAQ52382	Baum et al	2003		
<u>CryII-like</u>	AAC31094	Payne et al	1998		Недостатня послідовність
<u>CryII-like</u>	ABG88859	Lin & Fang	2006	Bt ly4a3	Недостатня послідовність
<u>CryIIJa1</u>	AAA22341	Donovan	1994	Bt EG5847	
<u>CryIIJb1</u>	AAA98959	Von Tersch & Gonzalez	1994	Bt EG5092	
<u>CryIIJc1</u>	AAC31092	Payne et al	1998		
<u>CryIIJc2</u>	AAQ52372	Baum et al	2003		
<u>CryIIJd1</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 послідовність ДНК
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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 PGSI208	
<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 послідовність ДНК
<u>Cry3Ca1</u>	CAA42469	Lambert et al	1992	Bt kurstaki BtI109P	
<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	Tungradubkul 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		відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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 послідовність ДНК
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry7Ab5</u>	ABX79555	Aguirre-Arzola et al	2008	Bt monterrey GM-33	
<u>Cry7Ab6</u>	ACI44005	Deng et al	2008	Bt HQ122	
<u>Cry7Ab7</u>	FJ940776	Wang et al	2009		відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry7Ab8</u>	GU145299	Feng Jing	2009		відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	Тільки послідовність ДНК
<u>Cry8Da2</u>	BD133574	Asano et al	2002	Bt	Тільки послідовність ДНК
<u>Cry8Da3</u>	BD133575	Asano et al	2002	Bt	Тільки послідовність ДНК
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Fa1</u>	AAT48690	Shu et al	2004	Bt 185	Також <u>AAW81032</u>
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008		відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenyaе	
<u>Cry8-like</u>	FJ770571	Noguera & Ibarra	2009	Bt canadensis	Тільки послідовність ДНК
<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)	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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		відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001		
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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 послідовність ДНК
<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	Orduz 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 послідовність ДНК
<u>Cry21Aa1</u>	I32932	Payne et al	1996		Тільки послідовність ДНК
<u>Cry21Aa2</u>	I66477	Feitelson	1997		Тільки послідовність ДНК
<u>Cry21Ba1</u>	BAC06484	Sato & Asano	2002	Bt roskildiensis	
<u>Cry22Aa1</u>	I34547	Payne et al	1997		Тільки послідовність ДНК
<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	бінарна 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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	бінарна з Cry35Aa1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарна з Cry35Aa2
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарна з Cry35Aa3
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарна з Cry35Aa4
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарна з Cry35Ab1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарна з Cry35Ac1
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарна з Cry35Ab2
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	бінарна з Cry35Ab3
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарна з Cry35Ba1
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарна з

<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	Cry35Ba2 бінарна з Cry35Ba3
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	бінарна з Cry34Aa1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	бінарна з Cry34Aa2
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	бінарна з Cry34Aa3
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	бінарна з Cry34Aa4
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	бінарна з Cry34Ab1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	бінарна з Cry34Ac2
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	бінарна з Cry34Ab3
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	бінарна з Cry34Ac1
<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	бінарна з Cry34Ba1
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	бінарна з Cry34Ba2
<u>Cry35Ba3</u>	AAT29026	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	бінарна з Cry34Ba3
<u>Cry36Aa1</u>	AAK64558	Rupar et al	2001	Bt	бінарна з Cry23Aa
<u>Cry37Aa1</u>	AAF76376	Donovan et al	2000	Bt	
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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>	AAAY24695	Kongsuwan et al	2005	Bt CAA890	
<u>Cry48Aa</u>	CAJ18351	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарна з 49Aa
<u>Cry48Aa2</u>	CAJ86545	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарна з 49Aa2
<u>Cry48Aa3</u>	CAJ86546	Jones and Berry	2006	Bs NHA15b	бінарна з 49Aa3
<u>Cry48Ab</u>	CAJ86548	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарна з 49Ab1
<u>Cry48Ab2</u>	CAJ86549	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарна з 49Aa4
<u>Cry49Aa</u>	CAH56541	Jones and Berry	2005	Bs IAB59	бінарна з 48Aa
<u>Cry49Aa2</u>	CAJ86541	Jones and Berry	2006	Bs 47-6B	бінарна з 48Aa2
<u>Cry49Aa3</u>	CAJ86543	Jones and Berry	2006	BsNHA15b	бінарна з 48Aa3
<u>Cry49Aa4</u>	CAJ86544	Jones and Berry	2006	Bs 2173	бінарна з 48Ab2
<u>Cry49Ab1</u>	CAJ86542	Jones and Berry	2006	Bs LP1G	бінарна з 48Ab1
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry52Ba1</u>	FJ361760	Jun et al	2008	Bt BM59-2	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry53Aa1</u>	EF633476	Song et al	2007	Bt Y41	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry53Ab1</u>	FJ361759	Jun et al	2008	Bt MC28	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<u>Cry56Aa2</u>	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	відсутнє NCBI посилання, 09 липня
<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> Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	<a href="#">AAR81079</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Dec 2003	Bt PS36A	WO9818 932(A2, A3) 7 May 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	<a href="#">AAR81080</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Dec 2003	Bt PS81F	WO9818 932(A2, A3) 7 May 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	<a href="#">AAR81081</a>	Feitelson et al	1998	<a href="#">US 6656908</a> Dec 2003	Bt	WO9818 932(A2, A3) 7 May 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>	Selvapandiyar 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	<a href="#">US 6603063</a> Aug 2003	Javelin 1990	WO9957 282(A2, A3) 11Nov 1999
Vip3Aa18		<a href="#">AAX49395</a>	Cai and Xiao	2005	Не опубліковано	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	<a href="#">DQ241674</a>	Liu et al	2006	Не опубліковано	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-1	<a href="#">DQ539887</a>	Hart et al	2006	Не опубліковано		
Vip3Aa20	Vip3A-2	<a href="#">DQ539888</a>	Hart et al	2006	Не опубліковано		

Vip3Aa21	Vip	<u>ABD84410</u>	Panbangred	2006	Не опубліковано	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	<u>AA41427</u>	Lu et al	2005	Не опубліковано	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	<u>AA41428</u>	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	Xieumei 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	
Vip3Ab1	Vip3B	<u>AAR40284</u>	Feitelson et al	1999	US <u>6603063</u> Aug 2003	Bt KB59A4-6	WO9957 282(A2, A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	<u>AA488247</u>	Feng and Shen	2006	Не опубліковано	Bt	
Vip3Ac1	PS49C		Narva et al		заявка на патент США № 2004012871		
Vip3Ad1	PS158C2		Narva et al		заявка на патент США № 2004012871		
Vip3Ad2	ISP3B	<u>CAI43276</u>	Van Rie et al	2005	Не опубліковано	Bt	
Vip3Ae1	ISP3C	<u>CAI43277</u>	Van Rie et al	2005	Не опубліковано	Bt	
Vip3Af1	ISP3A	<u>CAI43275</u>	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	<u>DQ832323</u>	Li and Shen	2006	Не опубліковано	Bt	
Vip3Ba1		<u>AAV70653</u>	Rang et al	2004	Не опубліковано		
Vip3Bb1	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ДАУ АГРОСАЙЕНСИЗ ЕлЕлС1

<120> ЗАСТОСУВАННЯ Vip3Ab В СПОЛУЧЕННІ З Cry1Ca ДЛЯ КЕРУВАННЯ СТІЙКИМИ КОМАХАМИ

<130> DAS-P0162-US-07

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 788

<212> ПРТ

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Vip3Ab1

<400> 1

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

Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys  
20 25 30

Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr  
35 40 45

Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly  
50 55 60

Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly  
65 70 75 80

Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu  
85 90 95

Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn  
100 105 110

Thr Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp  
115 120 125

Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Val Glu Tyr Leu Ser  
130 135 140

Lys Gln Leu Lys Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Val Asn  
145 150 155 160

Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg



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

420	425	430
Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val	Thr Ala Asn Ser Tyr Asp Ser Ser Thr	
435	440	445
Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu		
450	455	460
Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asn Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly		
465	470	475 480
Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln		
485	490	495
Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu		
500	505	510
Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu		
515	520	525
Ile Val Pro Pro Ile Ser Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn		
530	535	540
Leu Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Ile Ala Asn Asn Lys Asn Ala		
545	550	555 560
Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Ile Asn Gly Thr Lys Val Leu Tyr Val		
565	570	575
His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Val Gly Gly Lys Leu Lys Ser		
580	585	590
Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Ile Val Lys Gly Lys Ala Ser Ile		
595	600	605
Tyr Leu Lys Asp Lys Lys Asn Glu Asn Ser Ile Tyr Glu Glu Ile Asn		
610	615	620
Asn Asp Leu Glu Gly Phe Gln Thr Val Thr Lys Arg Phe Ile Thr Gly		
625	630	635 640
Thr Asp Ser Ser Gly Ile His Leu Ile Phe Thr Ser Gln Asn Gly Glu		
645	650	655
Gly Ala Phe Gly Gly Asn Phe Ile Ile Ser Glu Ile Arg Thr Ser Glu		
660	665	670
Glu Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Met Ser Asp Ala Trp Val Gly Ser		

675 680 685

Gln Gly Thr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Leu Thr Ile Asn Ser Asn Val  
690 695 700

Asn Gly Thr Phe Arg Gln Asn Leu Pro Leu Glu Ser Tyr Ser Thr Tyr  
705 710 715 720

Ser Met Asn Phe Thr Val Asn Gly Phe Gly Lys Val Thr Val Arg Asn  
725 730 735

Ser Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Ser Tyr Pro Gln Leu Ser Pro Lys  
740 745 750

Asp Ile Ser Glu Lys Phe Thr Thr Ala Ala Asn Asn Thr Gly Leu Tyr  
755 760 765

Val Glu Leu Ser Arg Ser Thr Ser Gly Gly Ala Ile Asn Phe Arg Asp  
770 775 780

Phe Ser Ile Lys  
785

<210> 2  
<211> 619  
<212> ПРТ  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> CrylCa

<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 Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly  
20 25 30

Asn Ser Ser Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser  
35 40 45

Asn Phe Val Pro Gly Gly Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val  
50 55 60

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

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

Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu  
100 105 110

Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Lys Asn Pro Ala Thr Arg Thr  
115 120 125

Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Asp  
130 135 140

Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro Leu Leu Ser Val  
145 150 155 160

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

Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn Glu Asn  
180 185 190

Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys Ala  
195 200 205

Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln  
210 215 220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val  
225 230 235 240

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

Ile Gln Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu  
260 265 270

Ile Asn Phe Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe  
275 280 285

Asn Val Met Glu Asn Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile  
290 295 300

Leu Asn Asn Leu Thr Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn  
305 310 315 320

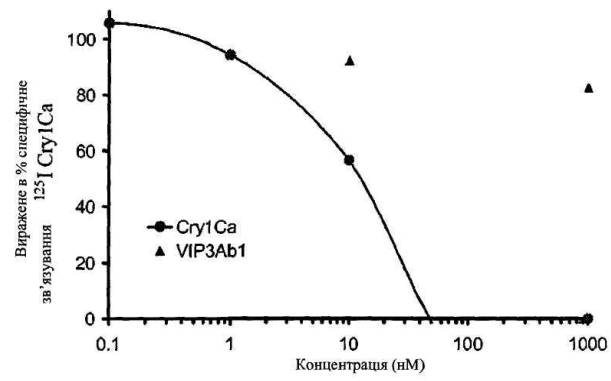
Phe Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly  
325 330 335

Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro  
340 345 350

Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro  
 355 360 365  
 Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu  
 370 375 380  
 Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr Pro Thr Asn Ser Phe Thr  
 385 390 395 400  
 Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr Glu Leu Pro Pro Glu  
 405 410 415  
 Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His Arg Leu Cys His  
 420 425 430  
 Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr Thr Gly Val  
 435 440 445  
 Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr Ile Asp  
 450 455 460  
 Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val Trp  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile  
 485 490 495  
 Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile  
 500 505 510  
 Asn Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser  
 515 520 525  
 Ser Arg Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly  
 530 535 540  
 Val Gly Gly Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu  
 545 550 555 560  
 Ile Gly Glu Asn Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser  
 565 570 575  
 Asn Pro Phe Ser Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu  
 580 585 590  
 Gln Pro Leu Phe Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile  
 595 600 605  
 Asp Lys Ile Glu Ile Ile Leu Ala Asp Ala Thr  
 610 615

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Трансгенна рослина, яка містить ДНК, що кодує білок Vip3Ab, який має інсектицидну дію, і
- 5 ДНК, що кодує білок Cry1Ca, який має інсектицидну дію.
2. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина додатково містить ДНК, що кодує третій білок, який має інсектицидну дію, при цьому вказаний третій білок вибирають з групи, що складається з Cry1Fa, Cry1Da, Cry1Be і Cry1E.
3. Трансгенна рослина за п. 2, де вказаний третій білок вибирають з групи, що складається з
- 10 Cry1Fa і Cry1Be, при цьому рослина додатково містить ДНК, що кодує четвертий і п'ятий білки, які мають інсектицидну дію, вибрані з групи, що складається з Cry2A, Cry1I, DIG-3 і Cry1Ab.
4. Трансгенне насіння рослини за будь-яким з пп. 1-3, де вказане насіння містить ДНК, яка кодує білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і ДНК, яка кодує білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію.
- 15 5. Множина рослин на полі, що містить рослини-сховища, які не містять гени Bt, і множину трансгенних рослин за будь-яким з пп. 1-3, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 40 % всіх зернових рослин в указаній множині рослин.
6. Множина рослин на полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 30 % всіх зернових рослин в указаній множині рослин.
- 20 7. Множина рослин на полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % всіх зернових рослин в указаній множині рослин.
8. Множина рослин на полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 10 % всіх зернових рослин в указаній множині рослин.
9. Множина рослин на полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 5 % всіх
- 25 зернових рослин в указаній множині рослин.
10. Множина рослин на полі за п. 5, де вказані рослини-сховища розташовані блоками або смугами.
11. Суміш насіння, що містить насіння-сховища рослин-сховищ, у яких відсутній ген Bt, і множину трансгенного насіння за п. 4, що містить ДНК, яка кодує білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і ДНК, яка кодує білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, де вказане насіння-сховище складає менше ніж 40 % від всього насіння в суміші.
- 30 12. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше ніж 30 % від всього насіння в суміші.
13. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховища складає менше ніж 20 % від всього
- 35 насіння в суміші.
14. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше ніж 10 % від всього насіння в суміші.
15. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння-сховище складає менше ніж 5 % від всього насіння в суміші.
- 40 16. Спосіб керованого розвитку стійкості до білка Cry у комах, який включає садження насіння для створення множини рослин за п. 5, і приведення вказаної комахи в контакт із вказаною множиною рослин.
17. Множина рослин за будь-яким з пп. 5-10, де вказані рослини займають більше 10 акрів.
18. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1-3, де вказану рослину вибирають з групи, яка
- 45 складається з кукурудзи, сої і бавовни.
19. Трансгенна рослина за п. 18, де вказана рослина являє собою рослину маїсу.
20. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина додатково містить ДНК, що кодує білок Cry1Fa, який має інсектицидну дію.
21. Клітина рослини від трансгенної рослини за будь-яким з пп. 1-3, де вказана клітина рослини
- 50 містить вказану ДНК, що кодує вказаний білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і вказану ДНК, що кодує вказаний білок Cry1Ca, який має інсектицидну дію, причому вказаний білок Vip3Ab, який має інсектицидну дію, є щонайменше на 99 % ідентичним послідовності SEQ ID NO:1, а вказаний білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, є щонайменше на 99 % ідентичним послідовності SEQ ID NO:2.
22. Трансгенна рослина за будь-яким з пп. 1-3, де вказаний білок Vip3Ab, що має інсектицидну дію, містить SEQ ID NO:1, а вказаний білок Cry1Ca, що має інсектицидну дію, містить SEQ ID
- 55 NO:2.
23. Спосіб контролювання кукурудзяної листової совки за допомогою приведення в контакт вказаної комахи з білком Vip3Ab, що має інсектицидну дію, і білком Cry1Ca, що має
- 60 інсектицидну дію.



Фіг. 1

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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

---

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