



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111934** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)

**A01H 5/00**

**A01H 5/10** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

**A01P 7/04** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2012 08558</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>16.12.2010</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>11.07.2016</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>61/284,290, 61/284,252, 61/284,281, 61/284,278</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.12.2009, 16.12.2009, 16.12.2009, 16.12.2009</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>US, US, US, US</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/US2010/060810, 16.12.2010</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Мід Томас (US), Нарва Кеннет (US), Сторер Ніколас П. (US), Шитс Джоел Дж. (US), Вуслі Аарон Т. (US), Бертон Стефані Л. (US)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ДАУ АГРОСАЙЄНСІЗ ЕЛЕЛСІ, 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268, United States of America (US)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: <b>WO 2009132850 A1, 05.11.2009</b></p>
--	--

**(54) ТРАНСГЕННА РОСЛИНА, ЩО МІСТИТЬ ДНК, ЯКА КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Vip3Ab, І ДНК, ЯКА КОДУЄ ІНСЕКТИЦИДНИЙ БІЛОК Cry1Fa, СТІЙКА ДО ЛУСКОКРИЛИХ ШКІДНИКІВ**

### (57) Реферат:

Даний винахід включає способи боротьби з лускокрилими шкідниками і рослини, стійкі до цих шкідників, де вказані рослини містять інсектицидний білок Vip3Ab у комбінації з інсектицидним білком Cry1Fa, і де вказані способи дозволяють сповільнювати або попереджати вироблення резистентності у совки трав'яної *Spodoptera frugiperda* до цих білків.

UA 111934 C2



Попередній рівень техніки

Людина вирощує кукурудзу для вживання в їжу і для енергетичних цілей. Людина також вирощує безліч інших культур, включаючи сою і бавовну. Комахи поїдають і пошкоджують рослини, і тим самим наносять збиток діяльності людини. Для боротьби з комахами-шкідниками щорічно витрачаються мільярди доларів, і ще мільярди йдуть на відшкодування збитку, що наноситься цими шкідниками. Інсектициди, синтезовані методами органічної хімії, є головним інструментом, що використовується для боротьби з комахами-шкідниками, але в деяких регіонах, у боротьбі з комахами-шкідниками важливу роль відіграють біологічні інсектициди, такі як інсектицидні білки, що походять від *Bacillus thuringiensis* (Bt). Можливість культивувати резистентні до комах рослини за допомогою трансформації цих рослин генами інсектицидних білків Bt стала революцією в сучасному сільському господарстві і довела важливість і цінність інсектицидних білків та їхніх генів.

Деякі білки Bt були використані для створення резистентних до комах трансгенних рослин, які успішно пройшли випробування, і в цей час їх виготовляють у промисловому масштабі. Такими білками є Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F і Cry3Bb, що вводяться в кукурудзу, Cry1Ac і Cry2Ab, що вводяться в бавовну, і Cry3A, що вводиться в картоплю.

Комерційно доступні продукти, що експресують ці білки, експресують тільки один із цих білків, за винятком випадків, коли бажано одержати комбінований інсектицидний спектр із 2 білків (наприклад, у кукурудзі, Cry1Ab і Cry3Bb об'єднані для вироблення резистентності до лускокрилих шкідників і кореневих личинок, відповідно), або випадків, коли незалежна дія цих білків робить їх цінним інструментом для сповільнення розвитку резистентності до інсектицидів у сприйнятливих популяцій комах (наприклад, Cry1Ac і Cry2Ab в бавовнику об'єднують з метою вироблення у рослин резистентності до тютюнової листовійки). Див. також патент США 20090313717, який стосується білків Cry2 плюс Vip3Aa, Cry1F або Cry1A, що використовується для боротьби з *Helicoverpa zea* або *armigerain*. Заявка WO 2009132850 стосується Cry1F або Cry1A і Vip3Aa, що використовується для боротьби зі *Spodoptera frugiperda*. Патент США 2008 0311096 стосується частково білка Cry1Ab, що використовується для боротьби з Cry1F-резистентним ECB.

Тобто, деякі сорти резистентних до комах трансгенних рослин, які швидко і повсюдно пристосовуються до цієї технології, також мають той недолік, що популяції шкідників виробляють резистентність до інсектицидних білків, продукуваних цими рослинами. Було запропоновано декілька стратегій для збереження цінних ознак резистентності до Bt-комах, де вказані стратегії включають використання високих доз білків в комбінації зі збереженням площ "захистків" нетрансгенних рослин, і чергування або спільного використання різних токсинів (McGaughey et al. (1998), "Bt-Resistance Management" *Nature Biotechnol.* 16: 144-146).

Необхідно, щоб білки, відібрані для використання в IRM-кластерах, мали незалежну інсектицидну дію, при якій резистентність, що виробляється до одного білка, не розповсюджувалася на інший білок (тобто, не спостерігалася перехресна резистентність до білків). Так, наприклад, якщо популяція комах, вибраних на резистентність до "білка А", є сприйнятною до "білка В", то можна зробити висновок, що в цьому випадку перехресна резистентність відсутня, і комбінація "білок А і білок В" буде ефективною для сповільнення вироблення резистентності до одного білка А.

У разі відсутності популяції резистентних комах, оцінка може бути зроблена виходячи з інших характеристик, які, як передбачається, стосуються механізму дії і можливої перехресної резистентності. Було висловлене припущення, що застосування опосередкованого рецептором зв'язування при ідентифікації інсектицидних білків, очевидно, не буде призводити до вироблення перехресної резистентності. (van Mellaert et al. 1999). Ключовим прогностичним чинником відсутності перехресної резистентності, що з'являється при такому підході, є те, що інсектицидні білки не конкурують за зв'язування з рецепторами у сприйнятливих видів комах.

У випадку, коли два токсини Bt конкурують за зв'язування з одним і тим же рецептором, і якщо цей рецептор мутує у комах так, що один із токсинів більше не зв'язується з цим рецептором, а тому не має інсектицидної дії проти комах, то така комаха може набувати резистентність до другого токсину (який конкурентно зв'язується з тим же рецептором). Тобто, можна сказати, що така комаха буде мати перехресну резистентність до обох токсинів Bt. Однак якщо два токсини зв'язуються з двома різними рецепторами, то це означає, що така комаха не має одночасної резистентності до цих двох токсинів.

Cry1Fa може бути використаний для боротьби з лускокрилими шкідниками багатьох видів, включаючи європейського кукурудзяного трача (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) і совку трав'яну (FAW; *Spodoptera frugiperda*), і має активність проти бурякового трача (SCB; *Diatraea saccharalis*). Білок Cry1Fa, що продукується в рослинах кукурудзи, які містять TC1507,

відповідає за вироблення ознаки резистентності до комах, і цей білок застосовується у провідних галузях промисловості для боротьби з совкою трав'яною (FAW). Cry1Fa також використовується в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™.

5 Можливість провести дослідження на зв'язування з рецептором (конкурентне або гомологічне) із використанням білка Cry1Fa має певні обмеження, оскільки при застосуванні більшості методів мічення білків для детектування в аналізах на зв'язування з рецептором відбувається інактивація інсектицидної активності білка Cry1Fa.

Додаткові токсини Cry перераховані на web-сайті офісу Комітету з номенклатури Bt (Crickmore et al; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\_Crickmore/Bt/). У цей час відомо приблизно 60 основних груп токсинів "Cry" (Cry1-Cry59), і крім того, існують інші токсини, такі як токсини Cyt і токсини VIP і т.ін. Багато токсинів з кожної пронумерованої групи мають підгрупи, позначені великими буквами, а підгрупи, позначені великими буквами, у свою чергу, поділяються на підгрупи (суб-підгрупи), позначені малими буквами (наприклад, Cry1 має підгрупу A-L, а Cry1A має підгрупу a-i).

15 Стислий опис суті винаходу

Даний винахід частково ґрунтується на несподіваному виявленні того факту, що популяція трав'яної совки (*Spodoptera frugiperda*; FAW), відібрана на резистентність до інсектицидної активності білка Cry1Fa, не є резистентною до інсектицидної активності білка Vip3Ab. Пара токсинів, що розглядається, не має перехресної резистентності щодо FAW.

20 Для фахівця у даній галузі очевидно, що перевага такого відкриття полягає в тому, що рослини, які експресують Vip3Ab і Cry1Fa або їхні інсектицидні частини, можуть бути використані для сповільнення або попередження розвитку резистентності до будь-якого з цих окремо взятих інсектицидних білків.

Даний винахід також підтверджується виявленням того факту, що Vip3Ab і Cry1Fa не конкурують один з одним за сайти зв'язування в кишечнику FAW.

25 Таким чином, даний винахід стосується, зокрема, застосування білка Vip3Ab у комбінації з білком Cry1Fa. Рослини (і площі, засіяні такими рослинами), які продукують Vip3Ab плюс Cry1Fa, входять до обсягу даного винаходу.

Даний винахід також стосується, зокрема, трикомпонентних кластерів або "пірамід" із трьох (або більше) токсинів, де токсини Vip3Ab і Cry1Fa являють собою базову пару. У деяких переважних варіантах піраміди, вибраний(і) токсин(и) не має(ють) перехресну резистентність стосовно FAW. Деякими переважними білками для цих трикомпонентних комбінацій піраміди є Cry1Fa плюс Vip3Ab плюс Cry1C плюс Cry1D, Cry1Be або Cry1E. Відповідно до даного винаходу, ці конкретні трикомпонентні кластери, як було несподівано виявлено авторами винаходу, переважно, не мають перехресну резистентність стосовно FAW. Це дозволяє знизити або взагалі уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур.

30 Що стосується Cry1Fa, який має активність проти FAW і європейського кукурудзяного трача (ECB), то виходячи з представлених тут даних, можна зробити висновок, що може бути також вибрана кластер-тетрада (із чотирьох компонентів) для використання чотирьох білків, де три з цих чотирьох білків не мають перехресну резистентність стосовно ECB, і три з цих чотирьох білків не мають перехресну резистентність стосовно FAW. Це може бути досягнуте з використанням Cry1Be (що має активність проти ECB і FAW) разом із розглядуваною парою білків плюс один додатковий білок, що має активність проти ECB. Такими кластерами-тетрадами згідно з винаходом є: Cry1F плюс Cry1Be плюс Vip3Ab (активний проти FAW) плюс Cry1Ab, Cry2A, Cry1I або DIG-3 (активний проти ECB).

45 Стислий опис графічного матеріалу

Фіг. 1. Гістограма інгібування росту (стовпці) і загибелі комах (♦) залежно від дози повнорозмірного Vip3Ab1, спрямованого проти *Spodoptera frugiperda* дикого типу (J.E. Smith), (FAW) і Cry1Fa-резистентної *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), (rFAW). Відсоток інгібування росту обчислювали шляхом порівняння середньої маси 8 личинок, оброблених тільки буфером, із масою личинок, оброблених токсином протягом 5 днів.

Фіг. 2. Флуоресцентна візуалізація <sup>125</sup>I-Cry1Fa, пов'язаного з BBMV від *S. frugiperda*, із подальшим розділенням за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ. Зразки брали в дублікаті. Концентрація <sup>125</sup>I-Cry1Fa становила 1 нМ. Контроль означає рівень зв'язування <sup>125</sup>I-Cry1Fa з BBMV за відсутності будь-якого ліганду, що конкурентно зв'язується. 1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування <sup>125</sup>I-Cry1Fa з BBMV у присутності 1000 нМ Cry1Fa, що не містить радіоактивної мітки, де вказаний рівень зв'язування вказує на повне витіснення радіоактивно міченого ліганду з білка BBMV. 1000 нМ Vip3Ab1 означає рівень зв'язування <sup>125</sup>I-Cry1Fa з BBMV в присутності 1000 нМ Vip3Ab1, що не містить радіоактивної мітки, де вказаний рівень зв'язування вказує на те, що цей білок не має здатності витіснити <sup>125</sup>I-Cry1Fa з BBMV *S.*

frugiperda навіть при концентрації, що у 1000 разів перевищує концентрацію радіоактивно міченого ліганду.

Фіг. 3. Флуоресцентна візуалізація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa, пов'язаного з BBMV S. frugiperda дикого типу (FAW) або Cry1Fa-резистентною S. frugiperda (rFAW), із подальшим розділенням за допомогою електрофорезу в ПААГ із ДСН. Зразки брали в дублікаті. Концентрація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa становила 2,5 нМ. FAW-0 означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV S. frugiperda дикого типу за відсутності якого-небудь ліганду, що конкурентно зв'язується. FAW-1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV S. frugiperda дикого типу в присутності 1000 нМ не міченого радіоактивної міткою Cry1Fa, де такий рівень зв'язування вказує на витіснення радіоактивно міченого ліганду з білка BBMV. rFAW-0 означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV Cry1Fa-резистентної S. frugiperda за відсутності будь-якого ліганду, що конкурентно зв'язується. Потрібно звернути увагу на відсутність зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV, що походять від резистентної FAW. rFAW-1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV у присутності 1000 нМ Vip3Ab1, що не містить радіоактивну мітку, де такий рівень зв'язування також вказує на нездатність  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa зв'язуватися з BBMV від Cry1Fa-резистентної S. frugiperda.

Детальний опис винаходу

Як повідомляється в даній заявці, токсин Vip3Ab, що продукується в трансгенній кукурудзі та в інших рослинах (наприклад, у бавовнику і сої), виявляє високу ефективність у боротьбі проти совки трав'яної (FAW; *Spodoptera frugiperda*), в якій виробляється резистентність до активності Cry1Fa. Таким чином, даний винахід частково ґрунтується на несподіваному виявленні того факту, що совка трав'яна, резистентна до дії Cry1Fa, є сприйнятливою (тобто, не має перехресної резистентності) до дії Vip3Ab. Відповідно до іншого варіанту, даний винахід також частково ґрунтується на несподіваному виявленні того факту, що токсин Vip3Ab є ефективним для захисту рослин (таких як рослини кукурудзи) від ураження Cry1Fa-резистентної совки трав'яної. Обговорення цього шкідника наводиться, наприклад, у публікації Tabashnik, PNAS (2008), vol. 105 no. 49, 19029-19030.

Даний винахід включає застосування токсину Vip3Ab для захисту кукурудзи та інших економічно цінних видів рослин від ураження шкідниками, і зниження врожайності, що викликається поїданням цих рослин совкою трав'яною або популяціями совки трав'яної, в яких виробляється резистентність до Cry1Fa.

Даний винахід також стосується IRM-кластера, що використовується для попередження або сповільнення розвитку резистентності совки трав'яної до Cry1Fa.

Даний винахід також стосується композицій, що використовуються для боротьби з лускокрилими шкідниками, у клітинах яких продукується білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Vip3Ab.

Даний винахід також стосується хазяїна, трансформованого так, щоб він продукував білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білок, що містить коровий токсин Vip3Ab, де вказаним хазяїном є клітина мікроорганізму або рослини. Розглядуваний(і) полінуклеотид(и) переважно присутній(і) у генетичній конструкції під контролем промотору (функціонально приєднаного до промотору або що містять цей промотор), що не є промотором *Bacillus thuringiensis*. Розглядувані полінуклеотиди можуть містити кодони, що звичайно зустрічаються в цій рослині і сприяють підвищенню рівня експресії в рослині.

Даний винахід також стосується способу боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає контактування вказаних шкідників або середовища їх проживання з ефективною кількістю композиції, яка містить білок, що включає коровий токсин Cry1Fa, а також білок, що включає коровий токсин Vip3Ab.

В одному зі своїх варіантів, даний винахід стосується рослини кукурудзи, що включає експресований у цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Vip3Ab, і експресований у цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, і насіння такої рослини.

В іншому своєму варіанті, даний винахід стосується рослини кукурудзи, де експресований у цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Vip3Ab, і експресований в цій рослині ген, який кодує білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, були введені у вказані рослини кукурудзи і в насіння таких рослин шляхом інтрогресії.

Як описано в прикладах, дослідження за конкурентним зв'язуванням, що проводяться з використанням радіоактивно міченого білка, який містить коровий токсин Vip3Ab, показали, що білок, що містить коровий токсин Cry1Fa, не конкурує за зв'язування в тканинах комахи FAW, із якими зв'язується Vip3Ab. Одержані результати також показали, що комбінації білків Cry1Fa і Vip3Ab являють собою ефективний засіб для зниження вироблення резистентності популяції

FAW до Cry1Fa (та аналогічним чином, вироблення резистентності до Vip3Ab), і отже, для підвищення рівня резистентності рослин кукурудзи, що експресують обидва білки, до цього шкідника. Таким чином, виходячи частково з описаних даних, можна зробити висновок, що спільне продукування (кластеризація) білків Vip3Ab і Cry1Fa може бути застосована з метою одержання IRM-кластера з високою дозою для боротьби з FAW. Що стосується Cry1Fa, що має активність проти FAW і європейського кукурудзяного трача (ECB), то пара токсинів, що розглядається, має неконкурентну дію проти FAW.

Для розширення спектра дії проти комах, до цієї пари можуть бути додані й інші білки. В іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування білків Cry1Fa і Vip3Ab у комбінації з іншим третім токсином/геном, і застосування такого трикомпонентного кластера для зниження розвитку резистентності у FAW до будь-кого з цих токсинів. Таким чином, в іншому своєму варіанті, даний винахід стосується застосування двох, трьох або більше білків у сільськогосподарських регіонах, в яких можуть розвиватися резистентні популяції FAW.

Відповідно до цього, даний винахід також стосується, зокрема, трикомпонентних кластерів або "пірамід" із трьох (або більше) токсинів, де вказані токсини Cry1Fa і Vip3Ab являють собою базову пару.

У деяких переважних варіантах піраміди, три вибраних білки не мають перехресну резистентність проти FAW. Деякі переважні комбінації пірамід "потрійної дії" являють собою Cry1Fa плюс Vip3Ab плюс будь-який з Cry1C або Cry1D. Див., заявку США реєстр. № 61/284281 (подану 16 грудня, 2009), в якій показано, що Cry1C є активним проти Cry1F-резистентної FAW, і заявку США реєстр. № 61/284252 (подану 16 грудня, 2009), в якій показано, що Cry1D є активним проти Cry1F-резистентної FAW. У цих двох заявках також показано, що Cry1C не конкурує з Cry1F за зв'язування з мембранними препаратами FAW, і що Cry1D не конкурує з Cry1F за зв'язування з мембранними препаратами FAW. У деяких варіантах винаходу, Cry1Be або Cry1E можуть бути об'єднані з Vip3A і Cry1F як третій білок проти FAW. Опис застосування Cry1Be разом з Cry1F можна знайти в заявці США реєстр. № 61/284290 (поданої 16 грудня, 2009). Опис застосування Cry1E разом з Cry1F можна знайти в заявці США реєстр. № 61/284278 (поданої 16 грудня, 2009). Відповідно до даного винаходу, ці конкретні трикомпонентні кластери білків, як було несподівано виявлено авторами винаходу, переважно не мають перехресну резистентність стосовно FAW. Це дозволяє знизити або взагалі уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур.

Виходячи з представлених тут даних, можна зробити висновок, що може бути також вибрана кластер-тетрада (із чотирьох компонентів) для використання чотирьох білків, де три з цих чотирьох білків не мають перехресної резистентності стосовно ECB, і три з цих чотирьох білків не мають перехресну резистентність стосовно FAW. Це може бути досягнуте з використанням Cry1Be (що має активність проти ECB і FAW) і Cry1Fa (що має активність проти ECB і FAW), разом із розглядуваним Vip3Ab (що має активність проти FAW) і з четвертим білком, токсичним стосовно ECB. (Див. заявку США реєстр. № 61/284290, подану 16 грудня, 2009 і що стосується комбінацій Cry1Fa і Cry1Be). Прикладами кластерів-тетрад згідно з винаходом є:

Cry1F плюс Cry1Be плюс Vip3Ab (активний проти FAW) плюс Cry1Ab, Cry2A, Cry1I або DIG-3 – всі вони активні проти ECB).

DIG-3 описаний у патенті США 2010 00269223.

Рослини (і площі, засіяні такими рослинами), які продукують будь-які з комбінацій білків, що розглядаються, входять до обсягу даного винаходу. Можуть бути також додані додаткові токсини/гени, і ці конкретні трикомпонентні кластери, що обговорюються вище, будуть, як було несподівано виявлено, переважно діяти проти FAW і/або ECB за декількома механізмами. Це дозволяє знизити або уникнути потреби в площах-"сховищах" нетрансгенних культур. Таким чином, у даному винаході розглядається посівна площа понад 10 акрів.

Для одержання послідовностей будь-яких описаних або згаданих тут генів і білків можна також звернутися в GENBANK. Див. нижче Додаток А.

У патенті США № 5188960 і в патенті США № 5827514 описані білки, які містять коровий токсин Cry1Fa, і які можуть бути використані для здійснення даного винаходу. У патенті США № 6218188 описані оптимізовані для рослини послідовності ДНК, що кодують білки, які містять коровий токсин Cry1Fa, і які можуть бути використані у даному винаході.

Cry1Fa також використовується в продуктах Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™. Ген vip3Ab може бути введений, наприклад, у продукт Cry1Fa, такий як Herculex®, SmartStax™ і WideStrike™. Відповідно до цього, застосування Vip3Ab дозволяє значно знизити тиск відбору на ці та інші промислові продукти. Таким чином, Vip3Ab може бути використаний у комбінації з 3 генів для кукурудзи та інших рослин (наприклад, бавовнику і сої).

Комбінації білків, описаних у даному винаході, можуть бути використані для боротьби з лускокрилими шкідниками. Дорослі лускокрилі, наприклад, метелики і молі, харчуються, головним чином, нектаром і відіграють значну роль у запиленні. Майже всі личинки лускокрилих, тобто, гусінь, поїдає рослини, і багато з них є небезпечними шкідниками. Гусінь живе на листі або поїдає внутрішню частину листя, або вона ушкоджує коріння або стебла рослини, що призводить до виснаження поживних речовин у рослини, і в більшості випадків, до руйнування основної фізичної структури рослини. Крім того, гусінь ушкоджує плоди, тканини і зерно, що зберігається, і борошно, внаслідок чого продукти або взагалі стають непридатними для продажу, або їх комерційна цінність значно знижується. Використовуваний тут термін "лускокрилі шкідники" також стосується різних стадій життєвого циклу шкідника, включаючи стадії розвитку личинок.

Деякі химерні токсини згідно з винаходом містять повнорозмірну частину N-кінцевого корового токсину Bt, і в певному положенні, розташованому за кінцем частини корового токсину, цей білок переходить у гетерологічну послідовність протоксину. N-кінцева, інсектицидно активна частина токсину Bt називається "коровим токсином". Перехід від корового сегмента токсину в гетерологічний сегмент протоксину може відбуватися приблизно в ділянці стику токсин/протоксин, або альтернативно, частина нативного протоксину (що тягнеться за межі корової частини токсину) може зберігатися, причому, перехід у гетерологічну частину протоксину може відбуватися нижче.

Прикладом може бути один химерний токсин згідно з винаходом, який являє собою повнорозмірну частину корового токсину Cry1Fa (приблизно перші 600 амінокислот) і гетерологічний протоксин (інший білок до C-кінця). В одному переважному варіанті винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab. У переважному варіанті винаходу, частина химерного токсину, що містить протоксин, походить від токсину білка Cry1Ab.

Для фахівців у даній галузі очевидно, що токсини Bt, навіть токсини, що належать до певного класу, такого як Cry1F, можуть до деякого ступеню варіюватися за своєю довжиною і точною локалізацією переходу від частини корового токсину в частину протоксину. Звичайно, токсин Cry1Fa має довжину приблизно від 1150 до 1200 амінокислот. Перехід від частини корового токсину в частину протоксину звичайно відбувається на ділянці між частинами, що складають приблизно від 50 % і приблизно до 60 % від всієї довжини токсину. Химерний токсин згідно з винаходом включає повнорозмірну область N-кінцевої частини корового токсину. Таким чином, химерний токсин містить принаймні приблизно 50 % повнорозмірного білка Cry1Fa токсину Bt. Цей білок має довжину, що звичайно складає принаймні приблизно 590 амінокислот. Що стосується частини протоксину, то повнорозмірна ділянка частини протоксину Cry1Ab тягнеться від кінця частини корового токсину до C-кінця молекули.

Гени і токсини. Гени і токсини, що використовуються у даному винаході, включають не тільки описані тут повнорозмірні послідовності, але також і фрагменти цих послідовностей, варіанти, мутанти і гібридні білки, які зберігають характерну пестицидну активність токсинів, конкретно описаних у даній заявці. Використовувані тут терміни "варіанти" або "модифікації" генів означають нуклеотидні послідовності, які кодують ті ж самі токсини або токсини, еквівалентні токсинам, що мають пестицидну активність. Використовуваний тут термін "еквівалентні токсини" означає токсини, що мають такий же або, по суті, таку ж біологічною активністю проти шкідників-мішеней, як і заявлені токсини.

Використовувані тут межі ідентичності становлять приблизно 95 % (Cry1F і Vip3Ab), 78 % (Cry1F і Vip3Ab) і 45 % (Cry1 і Vip3) відповідно до "змін номенклатури для пестицидних кристалічних білків *Bacillus thuringiensis*" ("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). Такі межі можуть бути також застосовані тільки для корових токсинів (наприклад, для Cry1Fa).

Для фахівців у даній галузі очевидно, що гени, що кодують активні токсини, можуть бути ідентифіковані та одержані декількома способами. Специфічні гени або частини генів, описані в даній заявці, можуть бути одержані з ізолятів, депонованих у депозитаріях культур. Ці гени або їхні частини або варіанти можуть бути також сконструйовані шляхом синтезу, наприклад, на синтезаторі генів. Варіанти генів можуть бути легко сконструйовані стандартними методами одержання точкових мутацій. Крім того, фрагменти цих генів можуть бути одержані з використанням комерційно доступних екзонуклеаз або ендонуклеаз відповідно до стандартних процедур. Так, наприклад, для систематичного відщеплення нуклеотидів від кінців цих генів можуть бути використані ферменти, такі як Bal31, або може бути застосований сайт-

спрямований мутагенез. Гени, що кодують активні фрагменти, можуть бути також одержані з використанням різних ферментів, що рестрикціюють. Для безпосереднього одержання активних фрагментів цих білків-токсинів можуть бути використані протеази.

Фрагменти та еквіваленти, які зберігають пестицидну активність описаних тут токсинів, входять до обсягу даного винаходу. Крім того, внаслідок надмірності генетичного коду, ряд різних послідовностей ДНК може кодувати описані тут амінокислотні послідовності. Фахівець у даній галузі може легко одержати такі альтернативні послідовності ДНК, що кодують ті ж самі або, по суті, ті ж самі токсини. Такі варіанти послідовностей ДНК входять до обсягу даного винаходу. Використовуваний тут термін послідовності "по суті, ті ж самі" означає послідовності, що мають амінокислотні заміни, делеції, додавання або інсерції, які фактично не надають впливу на пестицидну активність. У це визначення також входять фрагменти генів, що кодують білки, що зберігають пестицидну активність.

Іншим методом ідентифікації генів, що кодують токсини і частини генів, що використовуються у даному винаході, є застосування олігонуклеотидних зондів. Такими зондами є детектовані нуклеотидні послідовності. Ці послідовності можуть бути детектовані за допомогою відповідної мітки, або вони можуть бути спочатку зроблені флуоресцентними, як описано в Міжнародній заявці № WO93/16094. Фахівцям добре відомо, що якщо молекула-зонд і зразок нуклеїнової кислоти гібридизуються за допомогою утворення міцного зв'язку між двома молекулами, то розумно передбачити, що такий зонд і зразок будуть мати значну гомологію. Гібридизацію, переважно, проводять у жорстких умовах із застосуванням методів, добре відомих фахівцям, наприклад, описаних Keller, G. H., M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, New York, N.Y., pp. 169-170. Нижче наводяться деякі приклади комбінацій концентрацій солі і температур (в порядку зростання жорсткості): 2 × SSPE або SSC при кімнатній температурі; 1 × SSPE або SSC при 42 °C; 0,1 × SSPE або SSC при 42 °C; 0,1 × SSPE або SSC при 65 °C. Детектування зонда являє собою відомий метод, що застосовується для того, щоб визначити, відбувається гібридизація чи ні. Такий аналіз з використанням зонда являє собою швидкий метод ідентифікації токсин-кодуючих генів згідно з винаходом. Нуклеотидні сегменти, що використовуються як зонди згідно з винаходом, можуть бути синтезовані на синтезаторі ДНК відповідно до стандартних процедур. Ці нуклеотидні послідовності можуть бути також використані в якості ПЛР-праймерів для ампліфікації генів згідно з винаходом.

Варіанти токсинів. Деякі токсини згідно з винаходом конкретно описані в даній заявці. Оскільки ці токсини наводяться тут просто як приклади токсинів згідно з винаходом, то потрібно зазначити, що даний винахід включає варіанти токсинів або еквівалентні токсини (і нуклеотидні послідовності, що кодують еквівалентні токсини), які мають таку ж пестицидну активність, як і представлений тут токсин, або аналогічну активність. Еквівалентні токсини мають амінокислотну послідовність, гомологічну амінокислотній послідовності представленого тут токсину. Така гомологія амінокислотних послідовностей звичайно складає більш ніж 75 %, переважно, більш ніж 90 %, а найпереважніше, більше, ніж 95 %. Гомологія амінокислотних послідовностей є найвищою в критичних ділянках токсину, відповідальних за біологічну активність або що визначають тримірну конфігурацію, яка, зрештою, відповідальна за біологічну активність. Відповідно до цього, деякі амінокислотні заміни є допустимими і можуть бути присутніми в тих ділянках, які не відіграють важливої ролі в надаванні активності, або є консервативними амінокислотними замінами, які не впливають на тримірну конфігурацію молекули. Так, наприклад, амінокислоти можуть бути поділені на наступні класи: неполярні, незаряджені полярні, основні і кислотні. Таким чином, при консервативних замінах, амінокислоту одного класу замінюють іншою амінокислотою того ж типу, і така заміна входить до обсягу даного винаходу, за умови, що вона, фактично, не буде впливати на біологічну активність сполуки. Нижче наданий список прикладів амінокислот, що належать до кожного класу.

Таблиця 1

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

У деяких випадках можуть бути також зроблені неконсервативні заміни. Важливим чинником є те, що такі заміни не повинні значно знижувати біологічну активність токсину.



Рекомбінантні хазяїни. Гени, що кодують токсини згідно з винаходом, можуть бути введені мікробним або рослинним хазяїнам широкого ряду. Експресія гена токсину призводить, прямо або опосередковано, до продукування пестициду всередині клітин і до його збереження в цих клітинах. Для одержання штаму Bt, що експресує обидва токсини згідно з винаходом, може бути застосований кон'югативне і рекомбінантне перенесення. Інші організми-хазяїни можуть бути також трансформовані одним або обома генами токсинів, що використовуються для досягнення синергічного ефекту. Із використанням придатних мікробів-хазяїнів, наприклад, *Pseudomonas*, ці мікроби можуть бути внесені в місця проживання шкідників, де вони можуть розмножуватися і поїдати ці мікроби. Це буде призводити до знищення шкідників. Альтернативно, мікроб, що містить ген токсину, може бути оброблений в умовах, сприяючих пролонгуванню активності токсину і стабілізації клітини. Оброблена клітина, яка зберігає токсичну активність, може бути потім внесена в середовище проживання шкідників-мішеней.

Якщо ген токсину Bt вводять мікробу-хазяїну за допомогою придатного вектора, і якщо вказаний хазяїн вносять у середовище проживання в живому вигляді, то важливо, щоб були використані певні мікроби-хазяїни. При цьому, вибирають такі мікроорганізми-хазяїни, які, як відомо, займають певну "фітосферу" (філоплан, філосферу, ризосферу і/або ризоплан) одного або декількох культур, що становлять інтерес. Ці мікроорганізми вибирають так, щоб вони мали здатність успішно конкурувати в конкретних умовах (у культурі і в іншому середовищі проживання комах) із мікроорганізмами дикого типу, і забезпечували стабільне збереження та експресію генів, що кодують поліпептид-пестицид, а бажано, кращий захист пестициду від руйнування та інактивації в умовах навколишнього середовища.

Відомо, що велике число мікроорганізмів мешкає на філоплані (на поверхні листя рослин) і/або на ризосфері (у ґрунті, що оточує коріння рослин) цінних сільськогосподарських культур широкого ряду. Такими мікроорганізмами є бактерії, водорості і гриби. Особливий інтерес представляють такі мікроорганізми, як бактерії, наприклад, бактерії роду *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* і *Alcaligenes*; гриби, а зокрема, дріжджі, наприклад, дріжджі роду *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* і *Aureobasidium*. Особливий інтерес представляють такі види бактерій фітосфер, як *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* і *Azotobacter vinlandii*; і дріжджів-фітосфер, таких 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*, *Kluveromyces veronae* і *Aureobasidium pollulans*. Особливий інтерес представляють пігментовані мікроорганізми.

Для введення гена Bt, що кодує токсин, мікроорганізму-хазяїну в умовах, що забезпечують стабільне збереження гена і стабільну експресію гена, можуть бути застосовані методи широкого ряду. Такі методи добре відомі фахівцям у даній галузі та описані, наприклад, у патенті США No. 5135867, який вводиться в даний опис за допомогою посилання.

Обробка клітин *Bacillus thuringiensis* або рекомбінантні клітини, що експресують токсини Bt, можуть бути оброблені з метою пролонгування активності токсину і стабілізації клітин. Пестицидна мікрокапсула, що утворюється, містить токсин або токсини Bt у клітинній структурі, яка стабілізує і захищає токсин у випадку, коли цю мікрокапсулу вносять у середовище проживання шкідника-мішені. Придатними клітинами-хазяїнами можуть бути прокаріоти або еукаріоти, і такими клітинами звичайно є, але не обмежуються ними, клітини, які не продукують речовини, що є токсичними для вищих організмів, таких як ссавці. Однак можуть бути також використані мікроорганізми, які продукують речовини, токсичні для вищих організмів, але, при цьому, ці токсичні речовини є нестабільними, або рівень їх введення є досить низьким, що виключає можливість будь-якого токсичного впливу на ссавця-хазяїна. Як хазяїни, особливий інтерес становлять прокаріоти і нижчі еукаріоти, такі як гриби.

Оброблювані клітини звичайно є інтактними і, по суті, знаходяться в проліферативній формі, а не у формі спор, хоча, у деяких випадках можуть використовуватися і спори.

Обробка мікробних клітин, наприклад, мікробів, що містять ген або гени токсину Bt, може бути здійснена хімічними і/або фізичними методами, або комбінацією хімічних і фізичних методів, за умови, що такий метод не буде чинити негативний вплив на властивості токсину і не буде призводити до зниження здатності клітин захищати токсин. Прикладами хімічних реагентів є галогенуючі агенти, а зокрема, галогени з атомними номерами 17-80. Конкретніше, може бути використаний йод у м'яких реакційних умовах протягом певного періоду часу, достатнього для досягнення бажаних результатів. Іншими придатними методами є обробка альдегідами, такими

як глутаральдегід; протиінфекційними агентами, такими як хлорид зефірану і хлорид цетилпіридинію; спиртами, такими як ізопропіловий спирт і етанол; різними гістологічними фіксаторами, такими як йод Люголя, фіксатор Боуїна; різні кислоти і фіксатор Хеллі (див: Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W. H. Freeman and Company, 1967); або комбінацією фізичного методу (нагрівання) і хімічних агентів, які зберігають і пролонгують активність токсину, продукowanego в клітинах, введених у середовище проживання хазяїна. Прикладами фізичних методів є короткохвильове випромінювання, таке як гамма-випромінювання і рентгенівське випромінювання, заморожування, УФ-випромінювання, ліофілізація і т.ін. Методи обробки мікробних клітин описані в патентах США №№ 4695455 і 4695462, які вводяться в даний опис за допомогою посилання.

Ці клітини звичайно мають підвищену структурну стабільність, що призводить до збільшення резистентності до умов навколишнього середовища. Якщо пестицид присутній у формі попередника, то спосіб обробки клітин повинен бути вибраний так, щоб він не призводив до інгібування процесингу попередника з утворенням зрілої форми пестициду під дією патогену шкідника-мішені. Так, наприклад, формальдегід буде забезпечувати перехресне зшивання з білками, і тим самим інгібувати процесинг попередника поліпептидного пестициду. Спосіб обробки повинен зберігати принаймні значний ступінь біологічної доступності або біологічної активності токсину.

Властивостями, що становлять особливий інтерес для продукування при виборі клітини-хазяїна, є простота введення гена або генів Bt хазяїну, доступність експресійних систем, ефективність експресії, стабільність пестициду в хазяїні і наявність додаткових генетичних ознак. Технологічними властивостями, що становлять інтерес пестицидних мікрокапсул є їхня протективна здатність стосовно пестициду, наприклад, товщина клітинних стінок, пігментація і внутрішньоклітинна упаковка або здатність утворювати тільця включення; виживаність у водному середовищі; відсутність токсичності для ссавців; привабливість із точки зору поїдання шкідниками; простота утилізації; фіксація без пошкодження токсину і т.ін. Іншими розглядуваними властивостями є простота приготування препарату і його транспортування, матеріальні витрати, стабільність при збереженні і т.ін.

Культивування клітин. Клітини-хазяїни, що містять інсектицидний ген або гени Bt, можуть бути вирощені в будь-якому придатному поживному середовищі, в якому ДНК-конструкція буде забезпечувати селективну перевагу, тобто, забезпечувати селективне середовище, в якому всі або майже всі клітини будуть зберігати ген Bt. Потім ці клітини можуть бути зібрані звичайними способами. Альтернативно, ці клітини можуть бути оброблені до їхнього збору.

Клітини Bt, що продукують токсини згідно з винаходом, можуть бути культивовані з використанням стандартних середовищ і методом ферментації. Після завершення циклу ферментації, бактерії можуть бути зібрані спочатку шляхом відділення спор і кристалів Bt від бульйону, що збродив, стандартними методами. Виділені спори і кристали Bt можуть бути приготовані у вигляді змочуваного порошку; рідкого концентрату; гранул або інших препаратів, одержаних шляхом додавання поверхнево-активних речовин, диспергуючих речовин, інертних носіїв та інших компонентів, що полегшує транспортування та обробку ними конкретних шкідників-мішеней. Такі процедури приготування і застосування добре відомі фахівцям.

Препарати. Приготовані гранули-приманки, що містять аттрактант і спори, кристали і токсини ізолятів Bt, або рекомбінантні мікроби, що містять гени, одержані з описаних тут ізолятів Bt, можуть бути внесені в ґрунт. Приготований продукт може бути застосований у вигляді покриття, що наноситься на насіння, або препарату для обробки коріння або всієї рослини на останніх стадіях циклу вирощування сільськогосподарської культури. Для обробки рослин і ґрунту, клітини Bt можуть бути приготовані у вигляді змочуваних порошоків, гранул або дустів, шляхом змішування з різними інертними матеріалами, такими як неорганічні мінеральні речовини (філосилікати, карбонати, сульфати, фосфати і т.ін.) або рослинні матеріали (подрібнені в порошок качани кукурудзи, рисове лушпиння, шкаралупа волоського горіха і т.ін.). Такі препарати можуть включати ад'юванти типу "розпилювачів-зв'язуючих речовини", що стабілізують агенти, інші пестицидні добавки або поверхнево-активні речовини. Рідкі препарати можуть бути водними або безводними, і можуть бути використані у вигляді пін, гелів, суспензій, емульгованих концентратів або т.ін. Інгредієнтами можуть бути реологічні агенти, поверхнево-активні речовини, емульгатори, диспергуючі речовини або полімери.

Як відомо фахівцям у даній галузі, концентрація пестициду може значно варіюватися залежно від природи конкретного препарату, а зокрема, залежно від того, чи використовується він у вигляді концентрату або в чистому вигляді. Пестицид складає принаймні 1 % за масою, а може становити 100 % за масою. Сухі препарати можуть становити приблизно 1-95 % за масою пестициду, а рідкі препарати звичайно становлять приблизно 1-60 % за масою твердих речовин

у рідкій фазі. Ці препарати звичайно містять приблизно від 102 до 104 клітин/мг. Ці препарати можуть бути введені в кількості приблизно від 50 мг (у рідкому або в сухому вигляді) до 1 кг або більше на гектар.

5 Препарати можуть бути внесені в середовище проживання лускокрилих шкідників, наприклад, нанесені на листя або ґрунт шляхом розпилення, обпилювання, зрошування або т.ін.

Трансформація рослин. Переважними рекомбінантними хазяїнами, які можуть бути використані для продукування інсектицидних білків згідно з винаходом, є трансформовані рослини. Гени, що кодують описані тут білки токсинів Bt, можуть бути введені в рослинні клітини із застосуванням різних методів, добре відомих фахівцям. Так, наприклад, існує велике число клонуючих векторів, що містять систему реплікації в *Escherichia coli*, і маркер, що дозволяє провести відбір трансформованих клітин, і ці вектори можуть бути використані з метою одержання препарату для інсерції чужорідних генів у вищі рослини. Вектори містять, наприклад, *inter alia* pBR322, серії pUC, серії M13mp, pACYC184. Відповідно до цього, ДНК-фрагмент, що має послідовність, яка кодує білок токсину Bt, може бути вбудована у вектор у придатний рестрикційний сайт. Отриману плазмиду використовують для трансформації *E. coli*. Клітини *E. coli* культивують у придатному поживному середовищі, а потім збирають і піддають лізису. Потім цю плазмиду виділяють. Методами аналізу звичайно є аналіз послідовності, рестрикційний аналіз, електрофорез та інші методи, що застосовуються в біохімії і молекулярній біології. Після кожної маніпуляції використовується послідовність ДНК може бути розщеплена і приєднана до наступної послідовності ДНК. Кожна послідовність плазмиди може бути клонована в одній і тій же або в інших плазмідах. Залежно від методу вбудовування потрібних генів у рослину, можуть виявитися необхідними й інші послідовності ДНК. Так, наприклад, якщо плазмиду Tі або Rі використовують для трансформації клітин рослини, то принаймні праву межу, а в більшості випадків, праву і ліву межу T-ДНК-плазмиди Tі або Rі приєднують у ролі фланкуючої ділянки генів, що вбудовуються. Використання T-ДНК для трансформації клітин рослин було ретельно досліджене і детально описане в EP 120516, Lee and Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley et al., (1986), і An et al., (1985), і добре відомо фахівцям.

Після інтеграції вбудованої ДНК у геном рослини, така ДНК стає відносно стабільною. Трансформуючий вектор звичайно містить селективний маркер, що надає трансформованим клітинам рослини резистентність до біоциду або антибіотика, таких як біалафос, канаміцин, G418, блеоміцин або гігроміцин, *inter alia*. Із використанням окремо узятго маркера можна, відповідно, здійснювати добір трансформованих клітин, а не клітин, що не містять вбудовану ДНК.

Існує багато методів, що є придатними для вбудовування ДНК у клітини рослин-хазяїнів. Такими методами є трансформація молекулою T-ДНК із використанням *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* як трансформуючих агентів, зливання, інжекція, біобалістичні методи (бомбардування мікрочастинками) або електропорація, а також інші можливі методи. Якщо для трансформації використовуються агробактерії, то ДНК, що вбудовується, клонують у конкретні плазмиди, а саме, у проміжний вектор або у бінарний вектор. Проміжні вектори можуть бути інтегровані в плазмиду Tі або Rі за допомогою гомологічної рекомбінації з використанням послідовностей, гомологічних до послідовностей, що є присутніми у T-ДНК. Плазміда Tі чи Rі також містить ділянку *vir*, необхідну для переносу T-ДНК. Проміжні вектори не можуть самі реплікуватися в агробактеріях. Проміжний вектор може бути перенесений у *Agrobacterium tumefaciens* за допомогою хелперної плазмиди (кон'югування). Бінарні вектори можуть самі реплікуватися як у *E. coli*, так і в агробактеріях. Вони містять селективний маркерний ген і лінкер або полілінкер, що замикають праву і ліву межові ділянки T-ДНК. Вони можуть бути трансформовані безпосередньо в агробактерії (Holsters et al., ділянку *vir*. Ділянка *vir* необхідна для переносу T-ДНК у клітину рослини. Може також бути присутньою і додаткова T-ДНК. Трансформовану в такий спосіб бактерію використовують для трансформації клітин рослин. Рослинні експлантати можуть бути переважно культивовані з *Agrobacterium tumefaciens* або *Agrobacterium rhizogenes* для переносу ДНК у клітину рослини. Потім цілі рослини можуть бути вирощені з інфікованого рослинного матеріалу (наприклад, зі шматочків листя, сегментів стебел, коренів, а також протопластів або клітин, культивованих суспензійним методом) у придатному середовищі, що може містити антибіотики або біоциди для добору. Потім вирощені в такий спосіб рослини можуть бути протестовані на присутність вбудованої ДНК. У випадку інжекції і електропорації, будь-яких спеціальних вимог до одержання плазмід не пред'являється. При цьому, можуть бути використані стандартні плазмиди, такі як, наприклад, похідні pUC.

Трансформовані клітини розвиваються в рослині як звичайно. Вони можуть утворювати зародкові клітини і передавати трансформований(и) ознаку(и) потомству. Такі рослини можуть бути вирощені звичайним способом і схрещені з рослинами, що мають трансформовані наслідовані фактори або інші наслідовані фактори. Одержані гібридні рослини мають придатні фенотипічні властивості.

У переважному варіанті винаходу, рослини трансформують генами, у яких зустрічальність кодонів оптимізована для рослин. Див., наприклад, патент США № 5380831, що вводиться в даний опис за допомогою посилання. Хоча в даній заявці описані деякі зрізані токсини, однак, фахівцям із Bt добре відомо, що токсини, що належать до типу токсинів довжиною 130 кДа (повнорозмірні), мають N-кінцеву половину, що являє собою коровий токсин, і C-кінцеву половину, що являє собою протоксिनний "хвіст". Таким чином, відповідні "хвости" можуть бути використані разом з зрізаними/коровими токсинами відповідно до винаходу. Див., наприклад, патент США № 6218188 і патент США № 6673990. Крім того, методи створення синтетичних генів Bt для їхнього використання в рослинах відомі фахівцям (Stewart and Burgin, 2007). Одним з необхідних прикладів переважної трансформованої рослини є фертильна рослина кукурудзи, що містить експресований у рослині ген, кодуєчий білок Cry1Fa, а також другий експресований у рослині ген, кодуєчий білок Vip3Ab.

Перенос (або інтрогресія) Cry1Fa- і Vip3Ab-детермінованого(их) ознаки (ознак) в інбредні лінії кукурудзи може бути досягнуто шляхом рекурентного селективного схрещування, наприклад, зворотного схрещування. У цьому випадку, потрібну рекурентну рослину спочатку схрещують з інбредним донором (нерекурентною батьківською рослиною), що несе відповідний(и) ген(и), який надає(ють) Cry1F- і Vip3Ab-детерміновані ознаки. Потім потомство цього кроса піддають зворотному схрещуванню з рекурентною рослиною з наступним відбиранням одержаного потомства на потрібну(и) ознаку(и), перенесену(и) від нерекурентної батьківської рослини. Через три, переважно, чотири, а ще більш переважно, через п'ять або більш поколінь "бекросів" з рекурентною батьківською рослиною з відбиранням на потрібну(и) ознаку(и), потомство буде гетерозиготним за локусами, що контролює перенесену(и) ознаку(и), але вона буде аналогічна до рекурентної батьківської рослини за більшістю або майже за всіма іншими генами (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 вирощування культур, резистентних до комах (IRM). Наприклад, Roush і співробітниками були описані стратегії з використанням двох токсинів, також називані створенням "пірамід" або "кластерів" для вирощування трансгенних культур, що мають інсектицидні властивості. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353, 1777-1786).

На веб-сайті Агентства США із захисту навколишнього середовища (epa.gov/oprbppdl/biopesticides/pips/bt\_corn\_refuge\_2006.htm) опубліковані наступні вимоги із забезпечення площ-захистків із нетрансгенними культурами (тобто, не-Bt) культурами (земельної ділянки із сільськогосподарськими не-Bt-культурами/кукурудзою) для їхнього використання під трансгенні культури, продукуєчий один білок Bt, що має активність проти шкідників-мішеней.

"Конкретними структурними вимогами до продуктів з Bt-кукурудзи (Cry1Ab або Cry1F), захищеної від кукурудзяного трача, є:

Структурні площі-"сховища": 20 % площі-сховища під Bt-кукурудзу, не захищену від Лускокрилих у Кукурудзяному поясі;

50 % площі-сховища під Bt-бавовник, не захищений від Лускокрилих у Бавовняному поясі;

Блоки:

Внутрішні (тобто, у полях із Bt)

Зовнішні (тобто, окремі поля у межах ½ милі (за можливості ¼ милі) від Bt-поля для максимізації вільного схрещування)

Смужки регулярно оброблюваних сільськогосподарських земель:

Ці смужки повинні мати ширину принаймні в 4 ряди (переважно, 6 рядів) для зниження числа випадків міграції личинок".

Крім того, Національна асоціація виробників кукурудзи, на своєму веб-сайті (ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn) також опублікувала аналогічний посібник із вимог для площ-захистків. Так, наприклад:

"Вимоги до IRM у випадку кукурудзяного трача:

- Засівати принаймні 20 % акрів кукурудзою для збереження нетрансгенних гібридів

- У регіонах вирощування бавовнику, повинне залишатися 50 % площі-сховища

- Повинно бути засіяне 1/2 милі нетрансгенними гібридами

- Площі-захистки можуть бути засіяні смугами на Bt-поля; площі-захистки повинні бути засіяні у вигляді смуг, що повинні мати ширину принаймні в 4 ряди

- Площі-захистки можуть бути оброблені стандартними пестицидами тільки, якщо досягаються економічні пороги для комах-мішеней

5 - Розпилювальні інсектициди на основі Bt не можуть бути використані на площах-сховищах під кукурудзу

- Відповідний притулок повинен бути засіяний Bt-кукурудзою на кожній фермі".

10 Як зазначали Roush і співробітники (наприклад, на сторінках 1780 і 1784 у правому стовпчику), кластери або піраміди з двох різних білків, кожен з яких є ефективним проти шкідників-мішеней із мінімальною перехресною резистентністю або з відсутністю такої резистентності, можуть бути використані на більш дрібних "сховищах" нетрансгенних рослин. Roush висловив припущення, що для успішного використання кластерів, площа-сховище, розмір якого складає менше ніж 10 %, може бути оброблена культурою з резистентністю, порівнянню з резистентністю культур, оброблюваної приблизно на 50 % площі-сховища для одного (не-пірамідного) токсину. Що стосується доступних у даний час продуктів з кукурудзи, що містять

15 "пірамідні" Bt, то Агентство США із захисту навколишнього середовища вимагає, щоб значно менша (звичайно 5 %) площа структурного сховища була засіяна не-Bt кукурудзою, а не культурою з одним токсином (звичайно 20 %).

20 Існують різні шляхи забезпечення IRM-ефектів використання площ-захистків, включаючи різні геометричні схеми засівів на полях (як згадувалося вище) і суміші насіння в одному пакеті, що також обговорюється Roush і ін. (див. вище), і в патенті США № 6551962.

25 Вищевказані відсотки або аналогічні співвідношення площ-захистків можуть бути використані для розглянутих двокомпонентних або трикомпонентних кластерів або пірамід. Для трикомпонентних кластерів із трьома механізмами дії проти одного шкідника-мішені, сховища взагалі бути не повинно (або наприклад, площа-сховище повинна бути меншою 5 %). Це особливо справедливо для площ під комерційні культури, наприклад, понад 10 акрів.

Усі патенти, патентні заявки, попередні заявки і публікації або цитовані в них роботи у всій своїй повноті вводяться в даний опис за допомогою посилання в тому ступені, в якому вони відповідають детальному опису даної заявки.

30 Якщо це не вказано або не мається на увазі конкретно, то використовувані тут артикли "a", "an" і "the" означають "принаймні один".

Нижче наводяться приклади, що ілюструють способи практичного здійснення даного винаходу. Ці приклади не повинні розглядатися як обмеження обсягу винаходу. Усі відсотки дані за масою, а всі співвідношення сумішей розчинників дані за об'ємом, якщо це не обговорено особливо. Усі температури дані в градусах Цельсія.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Короткий опис прикладів

40 У наданих нижче прикладах показано, що Vip3Ab1 має активність проти личинок *Spodoptera frugiperda* (совки трав'яної) дикого типу і проти зібраного на полях штаму *Spodoptera frugiperda*, що був виявлений у Пуерто-Ріко, і який є резистентним до кристалічного токсину Cry1Fa *Bacillus thuringiensis*. Ці біологічні дані підтверджують, що Vip3Ab1 може бути використаний для запобігання розвитку резистентності комах до Cry1, оскільки комах, в яких розвивається резистентність до токсинів Cry1Fa, залишаються чутливими до токсичності Vip3Ab1.

45 Аналогічним чином, у *Spodoptera frugiperda*, <sup>125</sup>I-мічений Cry1Fa зв'язується з білками-рецепторами, і таке зв'язування може бути витиснуте з використанням нерадіоактивного Cry1Fa. Однак, у цих експериментах було показано, що Vip3Ab1 не може витіснити <sup>125</sup>I-Cry1Fa при зв'язуванні з його рецептором. Ці результати показали, що Vip3Ab1 має унікальний сайт зв'язування в порівнянні з Cry1Fa. Здатність Vip3Ab1 виробляти токсичність проти комах, що є резистентними до Cry1Fa, обумовлена його нездатністю взаємодіяти із сайтом, з яким зв'язуються ці токсини. Є й інші дані, що зазначають на те, що природа резистентності *Spodoptera frugiperda* до Cry1Fa обумовлена нездатністю Cry1Fa зв'язуватися з BBMV, виділеними з цієї комах. Біологічна активність Vip3Ab1 проти Cry1Fa-резистентних личинок *S. frugiperda*, що втрачає свою здатність зв'язуватися з Cry1Fa, також підтверджує відсутність взаємодії Vip3Ab1 із сайтом-мішенню, на відміну від Cry1Fa.

55 Приклад 2 - Очищення і процесинг білків Cry1Fa і Vip3Ab1 трипсином

60 Гени, що кодують протоксини Cry1Fa і Vip3Ab1, були експресовані в експресійних штаммах *Pseudomonas fluorescens*, а повнорозмірні білки були виділені у вигляді нерозчинних тілець включення. Промиті тілця включення солюбілізували шляхом перемішування при 37 °C у буфері, що містить 20 mM буфера CAPS, рН 11+10 mM DDT+0,1 % 2-меркаптоетанолу, протягом 2 годин. Розчин центрифугували при 27000 × g протягом 10 хвилин при 37 °C, і супернатант

обробляли 0,5 % (мас/об) ТСПК-оброблений трипсин (Sigma). Цей розчин інкубували при змішуванні протягом ще 1 години при кімнатній температурі, фільтрували, а потім завантажували на колонку Pharmacia Mono Q 1010, урівноважену 20 мм CAPS, рН 10,5. Після промивання завантаженої колонки 2 колонковими об'ємами буфера, зрізаний токсин елюювали 15 колонковими об'ємами лінійного градієнта 0–0,5 М NaCl у 20 мм CAPS при швидкості потоку 1,0 мл/хв. Очищені трипсином зрізані білки Cry елюювали приблизно при 0,2-0,3 М NaCl. Чистоту білків оцінювали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і візуалізували з використанням кумасі брильянтового блакитного. У деяких випадках, об'єднані фракції очищеного токсину концентрували і завантажували на стовпчик з Superose 6 (діаметром 1,6 см, довжиною 60 см), а потім очищали за допомогою ексклюзивної хроматографії. Фракції, що містять одиночний пік мономера з відповідною молекулярною масою, поєднували і концентрували, у результаті чого одержували більш ніж 95 % гомогенний препарат білка, що має молекулярну масу приблизно 60000 кДа.

Процесинг Vip3Ab1 досягався аналогічним чином, де як вихідний білок використовували очищений повнорозмірний білок масою 85 кДа (DIG-307), що постачається Monte Badger. Білок (12 мг) діалізували в 50 мм натрій-фосфатний буфер, рН 8,4, а потім обробляли шляхом додавання 1 мг твердого трипсину та інкубування протягом 1 години при кімнатній температурі. Розчин завантажували на аніонообмінну колонку MonoQ (діаметром 1 см, довжиною 10 см), і елюювали 7 колонковими об'ємами лінійного градієнта NaCl від 0 до 500 мМ у 20 мМ натрій-фосфатного буфера, рН 8,4. Моніторинг елювання білка здійснювали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ. Головна смуга процесованого білка мала молекулярну масу 65 кДа, як було визначено за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ із використанням стандартів молекулярної маси для порівняння.

#### Приклад 3 - Біоаналізи комах

Очищені білки тестували на інсектицидну активність у біоаналізах, проведених із використанням личинок *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), що тільки що вилупилися, яким давали штучний корм для комах. Cry1F-резистентних FAW збирали на полях кукурудзи *Herculex I* (Cry1Fa) у Пуерто-Ріко, і поміщали в інсектарій Dow AgroSciences Insectary для безупинного розмноження. Характеризація цього резистентного штаму FAW описана в Міжнародному звіті Шленца та ін. (Schlenz et al., 2008).

Біоаналізи комах проводили в 128-ямкових пластикових планшетах для біоаналізів комах (C-D International, Pitman, NJ). Кожна ямка містила 0,5 мл корму для лускокрилих багатьох видів (Southland Products, Lake Village, AR). 40 мкл-аліквоти очищеного білка Cry або Vip3Ab1, розведені до різних концентрацій у 10 мМ CAPS, рН 10,5, або контрольний розчин наносили піпеткою на поверхню в 1,5 см<sup>2</sup> кожної ямки з кормом (26,7 мкл/см<sup>2</sup>). Було протестовано 16 ямок на зразок. Негативний контроль являв собою буферний розчин, що не містить білка. Позитивний контроль включав препарати Cry1F. Оброблені ямки витримували у витяжній шафі доти, поки рідина на поверхні корму не випаровувалася або не абсорбувалася в цьому кормі.

Протягом декількох годин розмноження, окремі личинки збирали зволоженою щіткою з верблюжої вовни і поміщали на оброблений корм, одну личинку на ямку. Потім заражені ямки герметично закривали клейкими прозорими пластиковими пластинами, і оснащували отвором для газообміну (C-D International). Планшети для біоаналізу витримували в регульованих умовах навколишнього середовища [28 °C, відносна вологість (ВВ) приблизно 40 %, 16 год.:8 год. (день:ніч)]. Через 5 днів реєстрували загальне число комах, оброблених кожним зразком білка, число загинувших комах і масу комах, що вижили.

#### Приклад 4 - Йодування токсинів Cry1Fa

Повідомлялося, що Cry1F впливає на токсичність і зв'язувальну здатність цього білка, як показав тест, проведений із використанням личинок тютюнової листовійки і BBMV, виділених у цих комах (Luo et al., 1999; Sheets and Storer, 2001). Така інактивація, приблизно, обумовлена потребою в присутності не модифікованих тирозинових залишків поруч із сайтом зв'язування білка. При проведенні реакції йодування Cry1F методом із використанням йодовмісних сфер, білок повністю втрачає свою здатність специфічно зв'язуватися з BBMV, одержаними від *H. virescens*. При застосуванні нерадіоактивного Na для йодування Cry1F, проведеного методом з використанням йодовмісних сфер, було виявлено, що йодований Cry1F також втрачає свою інсектицидну активність проти *H. virescens*.

Більш ранні дослідження, проведені заявниками у своїй лабораторії, показали, що Cry1Fa може бути флуоресцентно позначений кон'югованими з малеїмідом реагентами для мічення, що специфічно алкілюють білки в положеннях цистеїнових залишків. Оскільки оброблений трипсином коровий токсин Cry1Fa містить один цистеїновий залишок у положенні 205, те мічення білка таким реагентом приводить до алкілювання білка в одному специфічному сайті.

Було визначено, що Cry1Fa може бути флуоресцентно позначений флуоресцеїн-5-малеїмідом, і що мічений білок зберігає свою інсектицидну активність. Виходячи зі збереження біологічної активності Cry1Fa, міченого флуоресцеїном у положенні цистеїну, авторами даного винаходу було встановлено, що може бути також проведене радіоактивне йодування флуоресцентної частини мітки методом, описаним Palmer et al. (Palmer et al., 1997), і приєднання цієї мітки до цистеїну Cry1Fa, де вказаний радіоактивно мічений Cry1Fa зберігає свою біологічну активність.

Флуоресцеїн-5-малеїмід розчиняли в 10 мМ (4,27 мг/мл) у ДМСО, а потім розводили в 1 мМ у PBS, як було визначено за його коефіцієнтом молярної екстинкції  $68000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . До 70 мкл розчину PBS, що включає дві йодовмісних сфери, додавали 0,5 мКи  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , а потім закривали свинцевим кожухом. Цей розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, а потім додавали 10 мкл 1 мМ флуоресцеїн-5-малеїмід. Реагенти залишали на 10 хвилин для проходження реакції, а потім видаляли з йодовмісних сфер. До розчину, що прореагував, додавали 2 мкг зрізаного та у високому ступені очищеного та обробленого трипсином корового токсину Cry1Fa у PBS. Білок інкубували з йодованим розчином флуоресцеїн-5-малеїмиду протягом 48 годин при 4 °C. Реакцію завершували додаванням 2-меркаптоетанолу до 14 мМ. Потім, реакційну суміш додавали в центрифужну колонку Zebra, урівноважену в 20 мМ CAPS, 150 мМ KCl, pH 9, і центрифугували при  $1500 \times g$  протягом 2 хвилин для відділення йодованого барвника, що не прореагував, від білка.  $^{125}\text{I}$ -мічений флуоресцеїн-Cry1Fa підраховували на гамма-лічильнику для визначення питомої активності цієї сполуки, приблизно, у розрахунку на то, що кількість цієї сполуки буде складати 80 % від кількості вихідного токсину. Білок також характеризували за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і візуалізували шляхом флуоресцентної візуалізації для того, щоб переконатися, що виміряна радіоактивність ковалентно зв'язана з білком Cry1Fa.

Приклад 5 - Одержання і фракціонування солюбілізованих BBMV

Стандартні методи кількісної оцінки білка та електрофорезу в поліакриламідному гелі з ДСН здійснювали, наприклад, як описано в керівництві Сембрука та ін. (Sambrook and Russell, 2001) і в більш пізніх виданнях. Личинки *S. frugiperda* в останній віковій стадії витримували в умовах голодування протягом ночі, а потім, після охолодження на льоді протягом 15 хвилин, розкривали. Тканину середньої частини кишечника видаляли з порожнини тіла, а задню частину кишечника залишали приєднаною до покривного шару. Середню частину кишечника поміщали в 9 об'ємів охолодженого льодом гомогенізуючого буфера (300 мМ маніт, 5 мМ EGTA, 17 мМ основи трис, pH 7,5), в який була додана суміш інгібіторів протеази (Sigma-Aldrich P-2714), розведена відповідно до рекомендації постачальників. Тканину гомогенізували 15 імпульсами, подаваними скляним гомогенізатором тканини. BBMV одержували методом  $\text{MgCl}_2$ -преципітації, описаним Вольферсбергером (Wolfersberger, 1993). Коротко, рівний об'єм 24 мМ розчину  $\text{MgCl}_2$  у 300 мМ маніту змішували з гомогенатом, виділеним із середньої частини кишки, перемішували протягом 5 хв і залишали на льоді на 15 хвилин. Розчин центрифугували при  $2500 \times g$  протягом 15 хвилин при 4 °C. Супернатант зберігали, і осад суспендували у вихідному об'ємі 0,5  $\times$  розведеного гомогенізуючого буфера, а потім знову центрифугували. Два супернатанти поєднували і центрифугували при  $27000 \times g$  протягом 30 хвилин при 4 °C з одержанням фракції BBMV. Осад суспендували в буфері для збереження BBMV (10 мМ HEPES, 130 мМ KCl, 10 % гліцерин, р 7,4) до одержання концентрації білка приблизно 3 мг/мл. Концентрацію білка визначали з використанням BSA як стандарт.

Перед заморожуванням зразків визначали L-лейцин-п-нітроанлід-амінопептидазну активність (ферменту-маркера для фракції BBMV). Коротенько, 50 мкл L-лейцин-п-нітроанліду (1 мг/мл у PBS) додавали в 940 мкл 50 мМ трис-HCl у стандартну кювету. Цю кювету поміщали в спектрофотометр Cary 50 Bio, установлений на нуль для зчитування оптичної густини на довжині хвилі 405 нм, і реакцію ініціювали додаванням 10 мкл або гомогенату середньої частини кишки комахи, або BBMV-препарату, одержаного від комахи. Потім проводили моніторинг збільшення оптичної густини на 405 нм протягом 5 хвилин при кімнатній температурі. Питому активність гомогенату і BBMV-препаратів визначали за кінетикою зростання оптичної густини протягом періоду часу, за який спостерігалось лінійне зростання оптичної густини, на одиницю загального білка, використовуюваного в аналізі, за наступним рівнянням:

$$\Delta\text{OD}/(\text{хв}\cdot\text{мг}) = \text{швидкість збільшення кількості амінопептидази } (\Delta\text{OD}/\text{мл}\cdot\text{хв}/[\text{білок}] \text{ (мг/мл)})$$

Питома активність цього ферменту звичайно в 7 разів вища, ніж активність, що спостерігається в початковій фракції гомогенату середньої кишки. BBMV розділяли на 250 мкл-аліквоти, швидко заморожували в рідкому  $\text{N}_2$  і зберігали при -80 °C.

Приклад 6 - Електрофорез

Аналіз білків за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ проводили в відновних умовах (тобто, в 5 %  $\beta$ -меркаптоетанолі, ВМЕ) і в денатуруючих умовах (тобто, при нагріванні протягом 5 хвилин, при 90 °C у присутності 4 % ДСН). Білки завантажували на ямку з 4-20 % трис-гліциновим поліакриламідним гелем (BioRad; Hercules, CA) і розділяли під напругою 200 вольт протягом 60 хвилин. Смуги білка детектували шляхом забарвлювання кумасі діамантовим блакитним R-250 (BioRad) протягом однієї години, і знебарвлювали розчином 5 % метанолу в 7 % оцтовій кислоті. Гелі візуалізували та аналізували на візуалізаторі BioRad Fluro-S Multi Imager™. Відносні молекулярні маси смуг білка визначала шляхом порівняння з рухливістю білків із відомою молекулярною масою, що спостерігаються в зразку ледера білка BenchMark™ (Invitrogen, Carlsbad, CA), завантаженого на одну ямку гелю.

#### Приклад 7 - Візуалізація

Радіоактивну чистоту йодованих білків Cry і радіоактивність Cry1Fa в аналізах на інгібування визначали за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ і візуалізації флуоресцентним методом. Коротко, ДСН-ПААГ-гелі візуалізували шляхом обгортання гелів у плівку Mylar (товщиною 12 мкм), а потім, після розділення і фіксації білка, гелі експонували під флуоресціюючим екраном з накопиченням Molecular Dynamics (35 см × 43 см) принаймні протягом ночі і до 4 днів. Планшети виявляли за допомогою флуоресцентного візуалізатора Molecular Dynamics Storm 820, і зображення аналізували за допомогою комп'ютерної програми ImageQuant™.

#### Приклад 8 - Стислий опис результатів

Результати із знищення комах, одержані в біоаналізах повнорозмірного білка Vip3Ab1, протестованого в різних дозах на його дію проти личинок *S. frugiperda* дикого типу і Cry1Fa-резистентних личинок *S. frugiperda*, представлені на фіг. 1. Загибель личинок *S. frugiperda* дикого типу становила 100 % при самій високій концентрації (9000 нг/см<sup>2</sup>), що тестується, а при більш низьких дозах, відсоток загибелі був нижчим. LC<sub>50</sub> оцінювали приблизно при 2000 нг/см<sup>2</sup>. Vip3Ab1 виявився у високому ступені ефективним відносно інгібування росту личинок *S. frugiperda*, при цьому більше, ніж 95 % інгібування росту спостерігалось при концентраціях 1000 нг/см<sup>2</sup> і вище. Високий рівень інгібування росту, що спостерігається для личинок *S. frugiperda* обох типів, дозволяє передбачити, що відсоток загибелі цих комах, ймовірно, буде зростати під дією цього білка протягом більш тривалого періоду часу.

Був також проведений біоаналіз для порівняння біологічної активності Vip3Ab1 проти *S. frugiperda* дикого типу і проти Cry1Fa-резистентної *S. frugiperda* (фіг. 1). Відсоток інгібування росту наданий вертикальними стовпцями, а відсоток загибелі комах наданий ромбами. Загибель комах, що вимірюється протягом 5 днів після впливу токсину, була нижче на 50 % для комах обох типів при всіх концентраціях, що тестуються. При цьому, спостерігалася явна залежність інгібування росту від дози. Vip3Ab1 давав >95 % інгібування росту Cry1Fa-чутливих і Cry1Fa-резистентних личинок *S. frugiperda* при концентрації вище за 1000 нг/см<sup>2</sup>, і приблизно 50 % інгібування росту личинок *S. frugiperda* дикого типу при концентрації приблизно 40 нг/см<sup>2</sup>. Vip3Ab1 давав більш, ніж 50 % інгібування росту Cry1Fa-резистентних личинок *S. frugiperda* при всіх концентраціях, що тестуються, де сама нижча концентрація становила 4,1 нг/см<sup>2</sup>. Таким чином, Vip3Ab1 має високу активність проти Cry1Fa-резистентних личинок *S. frugiperda*.

Були проведені повторні біоаналізи для одержання середніх летальних концентрацій (LC<sub>50</sub>), і середніх ріст-інгібіруючих концентрацій (GI<sub>50</sub>). У таблиці 2 вказані GI<sub>50</sub> і 95 % довірчі інтервали, одержані при впливі Vip3Ab1 на Cry1Fa-чутливі і Cry1Fa-резистентні личинки *Spodoptera frugiperda* в порівнянні з контролем.

Таблиця 2

Комаха	LC-50	95 % ДІ	GI <sub>50</sub>	95 % ДІ
FAW	3966,3	(2150,3-9406,6)	21,9	(18,5-25,6)
Cry1Fa (позитивний контроль) у порівнянні з FAW	57,3	(43,6-77,4)	<13	
rFAW	499,9	(338,9-748,6)	7,7	(5,5-10,7)
Cry1Fa (позитивний контроль) у порівнянні з rFAW	Загибель не спостерігалася при кожній дозі, що тестується		Інгібування росту не спостерігалось при кожній дозі, що тестується	
Буфер (FAW, rFAW)	Загибель не спостерігалася		Серед. маса на комаху	53,2 мг (FAW) 39,3 мг (rFAW)
Вода (FAW, rFAW)	Загибель не спостерігалася		Серед. маса на комаху	53,1 мг (FAW) 35,9 мг (rFAW)



Аналізи на конкурентне зв'язування радіоактивної мітки проводили для того, щоб визначити, чи взаємодіє Vip3Ab1 із тим же сайтом, з яким зв'язується Cry1Fa у FAW. Аналіз на конкурентне зв'язування проводили для вимірювання здатності Vip3Ab конкурувати за зв'язування з  $^{125}\text{I}$ -міченим Cry1Fa. На фігурі 2 проілюстрована флуоресцентна візуалізація радіоактивного Cry1Fa, фракціонованого шляхом проведення електрофорезу в ПААГ з ДСН після зв'язування з білками BBMV. За відсутності яких-небудь конкуруючих лігандів може бути детектований  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa, асоційований із білком BBMV. При інкубуванні в присутності 1000 нМ неміченого Cry1Fa (у концентрації, яка в 500 раз перевищує концентрацію міченого білка, що використовується в даному аналізі) спостерігалася дуже низька радіоактивність, що відповідає  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa. Таким чином, як і очікувалося, одержаний результат показав, що немічений Cry1Fa ефективно конкурує з радіоактивним Cry1Fa за зв'язування з білками-рецепторами, оскільки ці гомологічні білки зв'язуються з тим же самим сайтом. При проведенні того ж самого експерименту з використанням 1000 нМ неміченого білка Vip3Ab1 у ролі конкуруючого білка, авторами даного винаходу не було виявлено будь-яких змін рівня зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з білками BBMV від *S. frugiperda*, що вказує на те, що Vip3Ab1 не конкурує за зв'язування з  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa. Цей результат показав, що Vip3Ab1 не зв'язується з сайтом, з яким зв'язується Cry1Fa.

У комах може розвиватися резистентність до токсичності білків Cry за різними біохімічними механізмами, але більшість загальновідомих механізмів зумовлена зниженням здатності білка токсину Cry зв'язуватися з його специфічним рецептором у кишечнику комах (Heckel et al., 2007; Tabashnik et al., 2000; Xu et al., 2005). Це, очевидно, може бути викликане невеликими точковими мутаціями, великими делеціями генів або іншими генетичними або біохімічними механізмами. Для розуміння природи резистентності комах до Cry1Fa, авторами були проведені дослідження BBMV-білків, що походять від Cry1Fa-резистентних *S. frugiperda*, внаслідок чого було виявлено, що BBMV, одержані від Cry1Fa-резистентних комах, мали набагато меншою здатністю зв'язуватися з  $^{125}\text{I}$ -міченим Cry1Fa в порівнянні з BBMV, одержаними від комах дикого типу (фігура 3). Таким чином, механізм вироблення резистентності *S. frugiperda* до Cry1Fa зумовлений значним зниженням рівня зв'язування Cry1Fa з BBMV, що походить від резистентних комах. Оскільки на фіг. 2 показано, що Vip3Ab1 не конкурує за зв'язування з Cry1Fa, то це ще раз підтверджує, що Vip3Ab1 не повинен діяти за механізмом резистентності, за яким відбувається зв'язування Cry1Fa з його специфічним рецептором. Цей результат був підтверджений у біоаналізах. Таким чином, Vip3Ab1 доповнює активність Cry1Fa, у тому значенні, що він має біологічну активність проти тих же комах, але проте, він не зв'язується з тими ж сайтами рецепторів, з якими зв'язуються всі ці білки Cry, а тому він не діє за механізмом резистентності, який повинен призводити до зниження рівня зв'язування з токсином Cry. Виходячи з цих досліджень, авторами був зроблений висновок, що Vip3Ab1 являє собою чудовий токсин проти комах, який, при його об'єднанні з Cry1Fa, може бути використаний як засіб для запобігання виробленню резистентності у комах, де вказаний засіб буде мати біологічну активність проти комах, в яких може розвиватися резистентність до будь-якого одного їх цих білків, а також знищувати резистентних комах.

Бібліографія

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 cry1 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 Cry1F-resistant and Susceptible European Corn Borer and Fall Armyworm Colonies to Cry1A.105 and Cry12Ab2. DAI 0830, 2008. Indianapolis, Dow AgroSciences. Derbi Report.

Sheets, J. J. and Storer, N. P. Analysis of Cry1Ac Binding to Proteins in Brush Border Membrane Vesicles of Corn Earworm Larvae (*Heliothis zea*). Interactions with Cry1F Proteins and Its Implication for Resistance in the Field. DAI-0417, 1-26. 2001. Indianapolis, Dow AgroSciences.

Tabashnik,B.E., Liu,Y.B., Finson,N., Masson,L., and Heckel,D.G. (1997). One gene in diamondback moth confers resistance to four Bacillus thuringiensis toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1640-1644.

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 Cry1Ac {delta}-endotoxin of Bacillus thuringiensis in Helicoverpa armigera. *Appl Environ Microbiol* 71, 948-954.

Список дельта-ендотоксинів Crickmore et al. web-сайт (вказаний в заявці)

Реєстраційний номер для доступу в NCBI

Назва	Реєстр. №	Автори	Рік	Штам-джерело	Коментарі
<a href="#">CryIAa1</a>	AAA22353	Schnepf et al	1985	Bt kurstaki HD1	
<a href="#">CryIAa2</a>	AAA22552	Shibano et al	1985	Bt sotto	
<a href="#">CryIAa3</a>	BAA00257	Shimizu et al	1988	Bt aizawai IPL7	
<a href="#">CryIAa4</a>	CAA31886	Masson et al	1989	Bt entomocidus	
<a href="#">CryIAa5</a>	BAA04468	Udayasuriyan et al	1994	Bt Fu-2-7	
<a href="#">CryIAa6</a>	AAA86265	Masson et al	1994	Bt kurstaki NRD-12	
<a href="#">CryIAa7</a>	AAD46139	Osman et al	1999	Bt C12	
<a href="#">CryIAa8</a>	I26149	Liu	1996		тільки послідовність ДНК
<a href="#">CryIAa9</a>	BAA77213	Nagamatsu et al	1999	Bt dendrolimus T84A1	
<a href="#">CryIAa10</a>	AAD55382	Hou and Chen	1999	Bt kurstaki HD-1-02	
<a href="#">CryIAa11</a>	CAA70856	Tounsi et al	1999	Bt kurstaki	
<a href="#">CryIAa12</a>	AAP80146	Yao et al	2001	Bt Ly30	
<a href="#">CryIAa13</a>	AAM44305	Zhong et al	2002	Bt sotto	
<a href="#">CryIAa14</a>	AAP40639	Ren et al	2002	неопублікований	
<a href="#">CryIAa15</a>	AAY66993	Sauka et al	2005	Bt INTA Mol-12	
<a href="#">CryIAb1</a>	AAA22330	Wabiko et al	1986	Bt berliner 1715	
<a href="#">CryIAb2</a>	AAA22613	Thorne et al	1986	Bt kurstaki	
<a href="#">CryIAb3</a>	AAA22561	Geiser et al	1986	Bt kurstaki HD1	
<a href="#">CryIAb4</a>	BAA00071	Kondo et al	1987	Bt kurstaki HD1	
<a href="#">CryIAb5</a>	CAA28405	Hofte et al	1986	Bt berliner 1715	
<a href="#">CryIAb6</a>	AAA22420	Hefford et al	1987	Bt kurstaki NRD-12	
<a href="#">CryIAb7</a>	CAA31620	Haider & Ellar	1988	Bt aizawai IC1	
<a href="#">CryIAb8</a>	AAA22551	Oeda et al	1987	Bt aizawai IPL7	
<a href="#">CryIAb9</a>	CAA38701	Chak & Jen	1993	Bt aizawai HD133	
<a href="#">CryIAb10</a>	A29125	Fischhoff et al	1987	Bt kurstaki HD1	
<a href="#">CryIAb11</a>	I12419	Ely & Tippet	1995	Bt A20	тільки послідовність ДНК
<a href="#">CryIAb12</a>	AAC64003	Silva-Werneck et al	1998	Bt kurstaki S93	
<a href="#">CryIAb13</a>	AAN76494	Tan et al	2002	Bt c005	
<a href="#">CryIAb14</a>	AAG16877	Meza-Basso & Theoduloz	2000	Native Chilean Bt	
<a href="#">CryIAb15</a>	AAO13302	Li et al	2001	Bt B-Hm-16	
<a href="#">CryIAb16</a>	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>	AAY88347	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>	AAY66992	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>CryIAc24</u>	ABL01535	Arango et al	2008	Bt 146-158-01	
<u>CryIAc25</u>	FJ513324	Guan Peng et al	2008	Bt Tm37-6	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>CryIAc26</u>	FJ617446	Guan Peng et al	2009	Bt Tm41-4	№ NCBI, за реєстр. 9 липня

<u>CryIAc27</u>	FJ617447	Guan Peng et al	2009	Bt Tm44-1B	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>CryIAc28</u>	ACM90319	Li et al	2009	Bt Q-12	
<u>CryIAd1</u>	AAA22340	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>CryIAd2</u>	CAA01880	Anonymous	1995	Bt PS81RR1	
<u>CryIAe1</u>	AAA22410	Lee & Aronson	1991	Bt alesti	
<u>CryIAf1</u>	AAB82749	Kang et al	1997	Bt NT0423	
<u>CryIAg1</u>	AAD46137	Mustafa	1999		
<u>CryIAh1</u>	AAQ14326	Tan et al	2000		
<u>CryIAh2</u>	ABB76664	Qi et al	2005	Bt alesti	
<u>CryIAi1</u>	AAO39719	Wang et al	2002		
<u>CryIA-like</u>	AAK14339	Nagarathinam et al	2001	Bt kunthala nags3	невизначена послідовність
<u>CryIBa1</u>	CAA29898	Brizzard & Whiteley	1988	Bt thuringiensis HD2	
<u>CryIBa2</u>	CAA65003	Soetaert	1996	Bt entomocidus HD110	
<u>CryIBa3</u>	AAK63251	Zhang et al	2001		
<u>CryIBa4</u>	AAK51084	Nathan et al	2001	Bt entomocidus HD9	
<u>CryIBa5</u>	ABO20894	Song et al	2007	Bt sfw-12	
<u>CryIBa6</u>	ABL60921	Martins et al	2006	Bt S601	
<u>CryIBb1</u>	AAA22344	Donovan et al	1994	Bt EG5847	
<u>CryIBc1</u>	CAA86568	Bishop et al	1994	Bt morrisoni	
<u>CryIBd1</u>	AAD10292	Kuo et al	2000	Bt wuhanensis HD525	
<u>CryIBd2</u>	AAM93496	Isakova et al	2002	Bt 834	
<u>CryIBe1</u>	AAC32850	Payne et al	1998	Bt PS158C2	
<u>CryIBe2</u>	AAQ52387	Baum et al	2003		
<u>CryIBe3</u>	FJ716102	Xiaodong Sun et al	2009	Bt	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>CryIBf1</u>	CAC50778	Arnaut et al	2001		
<u>CryIBf2</u>	AAQ52380	Baum et al	2003		
<u>CryIBg1</u>	AAO39720	Wang et al	2002		
<u>CryICa1</u>	CAA30396	Honee et al	1988	Bt entomocidus 60.5	
<u>CryICa2</u>	CAA31951	Sanchis et al	1989	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa3</u>	AAA22343	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81I	
<u>CryICa4</u>	CAA01886	Van Mellaert et al	1990	Bt entomocidus HD110	
<u>CryICa5</u>	CAA65457	Strizhov	1996	Bt aizawai 7.29	
<u>CryICa6</u>	AAF37224	Yu et al	2000	Bt AF-2	
<u>CryICa7</u>	AAG50438	Aixing et al	2000	Bt J8	
<u>CryICa8</u>	AAM00264	Chen et al	2001	Bt c002	
<u>CryICa9</u>	AAL79362	Kao et al	2003	Bt G10-01A	
<u>CryICa10</u>	AAN16462	Lin et al	2003	Bt E05-20a	
<u>CryICa11</u>	AAX53094	Cai et al	2005	Bt C-33	

<u>Cry1Cb1</u>	M97880	Kalman et al	1993	Bt galleriae HD2	тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Cb2</u>	AAG35409	Song et al	2000	Bt c001	
<u>Cry1Cb3</u>	ACD50894	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Cb-like</u>	AAX63901	Thammasittirong et al	2005	Bt TA476-1	недостатня послідовність
<u>Cry1Da1</u>	CAA38099	Hofte et al	1990	Bt aizawai HD68	
<u>Cry1Da2</u>	I76415	Payne & Sick	1997		тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Db1</u>	CAA80234	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Db2</u>	AAK48937	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Dc1</u>	ABK35074	Lertwiriawong et al	2006	Bt JC291	
<u>Cry1Ea1</u>	CAA37933	Visser et al	1990	Bt kenyae 4F1	
<u>Cry1Ea2</u>	CAA39609	Bosse et al	1990	Bt kenyae	
<u>Cry1Ea3</u>	AAA22345	Feitelson	1991	Bt kenyae PS81F	
<u>Cry1Ea4</u>	AAD04732	Barboza-Corona et al	1998	Bt kenyae LBIT-147	
<u>Cry1Ea5</u>	A15535	Botterman et al	1994		тільки послідовність ДНК
<u>Cry1Ea6</u>	AAL50330	Sun et al	1999	Bt YBT-032	
<u>Cry1Ea7</u>	AAW72936	Huehne et al	2005	Bt JC190	
<u>Cry1Ea8</u>	ABX11258	Huang et al	2007	Bt HZM2	
<u>Cry1Eb1</u>	AAA22346	Feitelson	1993	Bt aizawai PS81A2	
<u>Cry1Fa1</u>	AAA22348	Chambers et al	1991	Bt aizawai EG6346	
<u>Cry1Fa2</u>	AAA22347	Feitelson	1993	Bt aizawai PS8 II	
<u>Cry1Fb1</u>	CAA80235	Lambert	1993	Bt BTS00349A	
<u>Cry1Fb2</u>	BAA25298	Masuda & Asano	1998	Bt morrisoni INA67	
<u>Cry1Fb3</u>	AAF21767	Song et al	1998	Bt morrisoni	
<u>Cry1Fb4</u>	AAC10641	Payne et al	1997		
<u>Cry1Fb5</u>	AAO13295	Li et al	2001	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Fb6</u>	ACD50892	Huang et al	2008	Bt 012	
<u>Cry1Fb7</u>	ACD50893	Huang et al	2008	Bt 087	
<u>Cry1Ga1</u>	CAA80233	Lambert	1993	Bt BTS0349A	
<u>Cry1Ga2</u>	CAA70506	Shevelev et al	1997	Bt wuhanensis	
<u>Cry1Gb1</u>	AAD10291	Kuo & Chak	1999	Bt wuhanensis HD525	
<u>Cry1Gb2</u>	AAO13756	Li et al	2000	Bt B-Pr-88	
<u>Cry1Gc</u>	AAQ52381	Baum et al	2003		
<u>Cry1Ha1</u>	CAA80236	Lambert	1993	Bt BTS02069AA	
<u>Cry1Hb1</u>	AAA79694	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>Cry1H-like</u>	AAF01213	Srifah et al	1999	Bt JC291	недостатня послідовність
<u>Cry1Ia1</u>	CAA44633	Taylor et al	1992	Bt kurstaki	
<u>Cry1Ia2</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	Selvapandiyam	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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>CryIIa16</u>	FJ617448	Guan Peng et al	2009	Bt E-1A	№ NCBI, за реєстр. 9 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>CryIIIf1</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>CryIIKa1</u>	AAB00376	Koo et al	1995	Bt morrisoni BF190	
<u>CryIILa1</u>	AAS60191	Je et al	2004	Bt kurstaki K1	
<u>CryII-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>Cry2Ac1</u>	AAQ52362	Baum et al	2003		
<u>Cry2Afl</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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry2Ah2</u>	ACL80665	Zhang et al	2009	Bt BRC-ZQL3	
<u>Cry2Ai</u>	FJ788388	Udayasuriyan et al	2009	Bt	№ NCBI, за реєстр. 9 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>	I15475	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>	AAY96321	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ba1</u>	CAA30312	Chungjatpornchai et al	1988	Bt israelensis 4Q2-72	
<u>Cry4Ba2</u>	CAA30114	Tungpradubkul et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba3</u>	AAA22337	Yamamoto et al	1988	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba4</u>	BAA00178	Sen et al	1988	Bt israelensis HD522	
<u>Cry4Ba5</u>	CAD30095	Berry et al	2002	Bt israelensis	
<u>Cry4Ba-like</u>	ABC47686	Mahalakshmi et al	2005	Bt LDC-9	недостатня послідовність
<u>Cry4Ca1</u>	EU646202	Shu et al	2008		№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry4Cb1</u>	FJ403208	Jun & Furong	2008	Bt HS18-1	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry4Cb2</u>	FJ597622	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry4Cc1</u>	FJ403207	Jun & Furong	2008	Bt MC28	№ NCBI, за реєстр. 9 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	№ NCBI, за реєстр. 9 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		№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry7Ab8</u>	GU145299	Feng Jing	2009		№ NCBI, за реєстр. 9 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	
<u>Cry8Ab1</u>	EU044830	Cheng et al	2007	Bt B-JJX	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry8Da1</u>	BAC07226	Asano et al	2002	Bt galleriae	
<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	№ NCBI, за реєстр. 9 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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry8Ha1</u>	EF465532	Fuping et al	2006	Bt 185	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry8Ia1</u>	EU381044	Yan et al	2008	Bt su4	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry8Ja1</u>	EU625348	Du et al	2008	Bt FPT-2	№ NCBI, за реєстр. 9 липня

<u>Cry8Ka1</u>	FJ422558	Quezado et al	2008		№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry8Ka2</u>	ACN87262	Noguera & Ibarra	2009	Bt kenya	
<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)	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9Aa4</u>	GQ249294	Su et al	2009	Bt T03C001	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9Aa like</u>	AAQ52376	Baum et al	2003		incomplete sequence
<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		неповна послідовність
<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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9Da4</u>	GQ249297	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, за реєстр. 9 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		№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9Ea8</u>	GQ249292	Su et al	2009	GQ249292	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9Eb1</u>	CAC50780	Arnaut et al	2001		
<u>Cry9Eb2</u>	GQ249298	Su et al	2009	Bt T03B001	№ NCBI, за реєстр. 9 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	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry9-like</u>	AAC63366	Wasano et al	1998	Bt galleriae	
<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	Ordutz 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	об'єднаний із 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	№ NCBI, за реєстр. 9 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	№ NCBI, за реєстр. 9 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	об'єднаний із Cry35Aa1
<u>Cry34Aa2</u>	AAK64560	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний із Cry35Aa2
<u>Cry34Aa3</u>	AAT29032	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний із Cry35Aa3
<u>Cry34Aa4</u>	AAT29030	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний із Cry35Aa4
<u>Cry34Ab1</u>	AAG41671	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	об'єднаний із Cry35Ab1
<u>Cry34Ac1</u>	AAG50118	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний із Cry35Ac1
<u>Cry34Ac2</u>	AAK64562	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний із Cry35Ab2
<u>Cry34Ac3</u>	AAT29029	Schnepf et al	2004	Bt KR1369	об'єднаний із Cry35Ab3
<u>Cry34Ba1</u>	AAK64565	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний із Cry35Ba1
<u>Cry34Ba2</u>	AAT29033	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний із Cry35Ba2
<u>Cry34Ba3</u>	AAT29031	Schnepf et al	2004	Bt PS201HH2	об'єднаний із Cry35Ba3
<u>Cry35Aa1</u>	AAG50342	Ellis et al	2001	Bt PS80JJ1	об'єднаний із Cry34Aa1
<u>Cry35Aa2</u>	AAK64561	Rupar et al	2001	Bt EG5899	об'єднаний із Cry34Aa2
<u>Cry35Aa3</u>	AAT29028	Schnepf et al	2004	Bt PS69Q	об'єднаний із Cry34Aa3
<u>Cry35Aa4</u>	AAT29025	Schnepf et al	2004	Bt PS185GG	об'єднаний із Cry34Aa4
<u>Cry35Ab1</u>	AAG41672	Moellenbeck et al	2001	Bt PS149B1	об'єднаний із Cry34Ab1
<u>Cry35Ab2</u>	AAK64563	Rupar et al	2001	Bt EG9444	об'єднаний із Cry34Ac2
<u>Cry35Ab3</u>	AY536891	AAT29024	2004	Bt KR1369	об'єднаний із Cry34Ab3
<u>Cry35Ac1</u>	AAG50117	Ellis et al	2001	Bt PS167H2	об'єднаний із Cry34Ac1
<u>Cry35Ba1</u>	AAK64566	Rupar et al	2001	Bt EG4851	об'єднаний із Cry34Ba1
<u>Cry35Ba2</u>	AAT29027	Schnepf et al	2004	Bt PS201L3	об'єднаний із Cry34Ba2

<u>Cry55Aa2</u>	AAE33526	Bradfish et al	2000	BT Y41	
<u>Cry56Aa1</u>	FJ597621	Jun & Furong	2008	Bt Ywc2-8	№ NCBI, за реєстр. 9 липня
<u>Cry56Aa2</u>	GQ483512	Guan Peng et al	2009	Bt G7-1	№ NCBI, за реєстр. 9 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	

<b>Vip3Aa1</b>	Vip3Aa	<u>AAC37036</u>	Estruch et al	1996	<u>PNAS 93, 5389-5394</u>	AB88	
Vip3Aa2	Vip3Ab	<u>AAC37037</u>	Estruch et al	1996	<u>PNAS 93, 5389-5394</u>	AB424	
Vip3Aa3	Vip3Ac		Estruch et al	2000	<u>US 6137033</u> Oct 2000		
Vip3Aa4	PS36A Sup	<u>AAR81079</u>	Feitelson et al	1998	<u>US 6656908</u> Dec 2003	Bt PS36A	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa5	PS81F Sup	<u>AAR81080</u>	Feitelson et al	1998	<u>US 6656908</u> Dec 2003	Bt PS81F	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa6	Jav90 Sup	<u>AAR81081</u>	Feitelson et al	1998	<u>US 6656908</u> Dec 2003	Bt	WO9818932(A 2,A3) 7 May 1998
Vip3Aa7	Vip83	<u>AAK95326</u>	Cai et al	2001	неопублікований	Bt YBT-833	
Vip3Aa8	Vip3A	<u>AAK97481</u>	Loguercio et al	2001	неопублікований	Bt HD125	
Vip3Aa9	VipS	<u>CAA76665</u>	Selvapandiyan et al	2001	неопублікований	Bt A13	
Vip3Aa10	Vip3V	<u>AAN60738</u>	Doss et al	2002	<u>Protein Expr. Purif. 26, 82-88</u>	Bt	
Vip3Aa11	Vip3A	<u>AAR36859</u>	Liu et al	2003	неопублікований	Bt C9	
Vip3Aa12	Vip3A-WB5	<u>AAM22456</u>	Wu and Guan	2003	неопублікований	Bt	
Vip3Aa13	Vip3A	<u>AAL69542</u>	Chen et al	2002	Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 18, 687-692	Bt S184	
Vip3Aa14	Vip	<u>AAQ12340</u>	Polumetla et al	2003	неопублікований	Bt tolworthi	
Vip3Aa15	Vip3A	<u>AAP51131</u>	Wu et al	2004	неопублікований	Bt WB50	
Vip3Aa16	Vip3LB	<u>AAW65132</u>	Mesrati et al	2005	FEMS Micro Lett 244, 353-358	Bt	
Vip3Aa17	Jav90		Feitelson et al	1999	<u>US 6603063</u> Aug 2003	Javelin 1990	WO9957282(A 2,A3) 11Nov 1999
Vip3Aa18		<u>AAX49395</u>	Cai and Xiao	2005	неопублікований	Bt 9816C	
Vip3Aa19	Vip3ALD	<u>DQ241674</u>	Liu et al	2006	неопублікований	Bt AL	
Vip3Aa19	Vip3A-l	<u>DQ539887</u>	Hart et al	2006	неопублікований		



Vip3Aa20	Vip3A-2	<u>DQ539888</u>	Hart et al	2006	неопублікований		
Vip3Aa21	Vip	<u>ABD84410</u>	Panbangred	2006	неопублікований	Bt aizawai	
Vip3Aa22	Vip3A-LS1	<u>AA41427</u>	Lu et al	2005	неопублікований	Bt LS1	
Vip3Aa23	Vip3A-LS8	<u>AA41428</u>	Lu et al	2005	неопублікований	Bt LS8	
Vip3Aa24		BI 880913	Song et al	2007	неопублікований	Bt WZ-7	
Vip3Aa25		EF608501	Hsieh et al	2007	неопублікований		
Vip3Aa26		EU294496	Shen and Guo	2007	неопублікований	Bt TF9	
Vip3Aa27		EU332167	Shen and Guo	2007	неопублікований	Bt 16	
Vip3Aa28		FJ494817	Xiumei Yu	2008	неопублікований	Bt JF23-8	
Vip3Aa29		FJ626674	Xieumei et al	2009	неопублікований	Bt JF21-1	
Vip3Aa30		FJ626675	Xieumei et al	2009	неопублікований	MD2-1	
Vip3Aa31		FJ626676	Xieumei et al	2009	неопублікований	JF21-1	
Vip3Aa32		FJ626677	Xieumei et al	2009	неопублікований	MD2-1	
<b>Vip3Ab1</b>	Vip3B	<u>AAR40284</u>	Feitelson et al	1999	US 6603063 Aug 2003	Bt KB59A4-6	WO9957282(A 2,A3) 11Nov 1999
Vip3Ab2	Vip3D	<u>AA488247</u>	Feng and Shen	2006	неопублікований	Bt	
<b>Vip3Ac1</b>	PS49C		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
<b>Vip3Ad1</b>	PS158C2		Narva et al		заявка на патент США 2004012871 6		
Vip3Ad2	ISP3B	<u>CAI43276</u>	Van Rie et al	2005	неопублікований	Bt	
<b>Vip3Ae1</b>	ISP3C	<u>CAI43277</u>	Van Rie et al	2005	неопублікований	Bt	
<b>Vip3Af1</b>	ISP3A	<u>CAI43275</u>	Van Rie et al	2005	неопублікований	Bt	
Vip3Af2	Vip3C	ADN08753	Syngenta		WO 03/075655		
<b>Vip3Ag1</b>	Vip3B	ADN08758	Syngenta		WO 02/078437		
Vip3Ag2		FJ556803	Audtho et al	2008	неопублікований	Bt	
<b>Vip3Ah1</b>	Vip3S	<u>DQ832323</u>	Li and Shen	2006	неопублікований	Bt	
<b>Vip3Ba1</b>		<u>AAV70653</u>	Rang et al	2004			
<b>Vip3Bb1</b>	Vip3Z	ADN08760	Syngenta		WO 03/075655		
Vip3Bb2		EF439819	Akhurst et al	2007			

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; Dow AGROSCIENCES LLC

<120> КОМБІНОВАНЕ ЗАСТОСУВАННЯ БІЛКІВ Vip3Ab I CRY1Fa  
ДЛЯ ВИРОБЛЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО КОМАХ

&lt;130&gt; DAS-P0177-US

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 605

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; CrylFa

&lt;400&gt; 1

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 788

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Vip3Ab1

<400> 2

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

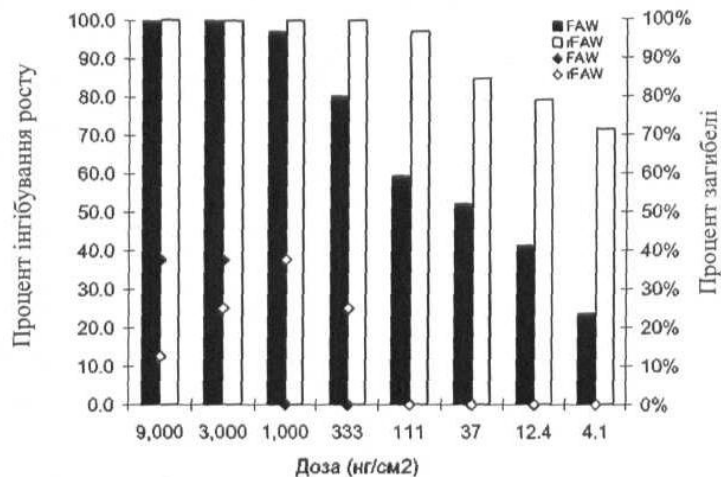
Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Ile Asn Gly Thr Lys Val Leu Tyr Val  
 565 570 575  
 His Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Val Gly Gly Lys Leu Lys Ser  
 580 585 590  
 Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Ile Val Lys Gly Lys Ala Ser Ile  
 595 600 605  
 Tyr Leu Lys Asp Lys Lys Asn Glu Asn Ser Ile Tyr Glu Glu 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

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Трансгенна рослина, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa, де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa є щонайменше на 95 % ідентичним SEQ ID NO:1, і вказаний інсектицидний білок Vip3Ab є щонайменше на 95 % ідентичним SEQ ID NO:2.
- 10 2. Насінина рослини за п. 1, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa.
3. Трансгенна рослина за п. 1, де ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa, введені у вказану рослину шляхом інтрогресії.
4. Насінина рослини за п. 3, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa.

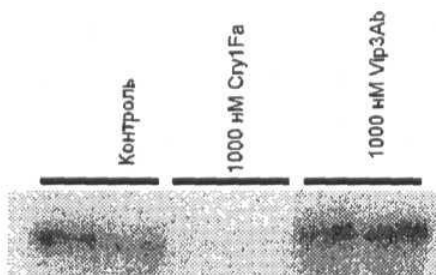
5. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища, і сукупність трансгенних рослин за п. 1, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 40 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
6. Сукупність рослин в полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 30 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
7. Сукупність рослин в полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
8. Сукупність рослин в полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 10 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
9. Сукупність рослин в полі за п. 5, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 5 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
10. Сукупність рослин в полі за п. 5, де вказані рослини-сховища знаходяться у вигляді блоків або смуг.
11. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння за п. 2, що містить ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa, де вказане насіння нетрансгенних рослин складає менше ніж 40 % від всього насіння у вказаній суміші.
12. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 30 % від всього насіння у вказаній суміші.
13. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 20 % від всього насіння у вказаній суміші.
14. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.
15. Суміш насіння за п. 11, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 5 % від всього насіння у вказаній суміші.
16. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної (FAW; *Spodoptera frugiperda*) резистентності до інсектицидного білка, що походить від *Bacillus thuringiensis*, де вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 5, що містять ДНК, яка кодує інсектицидний білок Vip3Ab, і ДНК, яка кодує інсектицидний білок Cry1Fa, і контактування вказаної комахі із вказаною сукупністю трансгенних рослин.
17. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина також включає ДНК, що кодує третій інсектицидний білок, де вказаний третій білок вибраний із групи, яка складається з Cry1C, Cry1D, Cry1Be і Cry1E.
18. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 17, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 20 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
19. Сукупність рослин в полі, яка містить не-Bt рослини-сховища і сукупність рослин за п. 17, де вказані рослини-сховища складають менше ніж 10 % всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
20. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної резистентності до інсектицидного білка, що походить від *Bacillus thuringiensis*, де вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 19 і контактування вказаної комахі з вказаною сукупністю трансгенних рослин.
21. Композиція для боротьби з лускокрилими шкідниками, що містить клітини, що експресують інсектицидно активну кількість білка, що містить коровий токсин Cry1Fa, і білка Vip3Ab.
22. Композиція за п. 21, що містить хазяїна, трансформованого так, щоб він експресував білок, який містить коровий токсин Cry1Fa, і білок Vip3Ab, де вказаним хазяїном є мікроорганізм або клітина рослини.
23. Спосіб боротьби з лускокрилими шкідниками, що включає обробку вказаних шкідників або середовища проживання цих шкідників інсектицидно активною кількістю композиції за п. 21.
24. Трансгенна рослина за п. 1, де вказана рослина також включає ДНК, що кодує третій інсектицидний білок, де вказаний третій білок вибраний із групи, яка складається з Cry1C, Cry1D і Cry1E.
25. Трансгенна рослина за п. 24, де вказана рослина продукує четвертий білок і п'ятий білок, вибрані з групи, яка складається з Cry2A, Cry1I, Cry1Ab і DIG-3.
26. Трансгенна рослина за п. 17, де вказана рослина продукує четвертий білок, вибраний із групи, яка складається з Cry2A, Cry1I, Cry1Ab і DIG-3.
27. Спосіб запобігання виробленню у комахі совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 26 і контактування вказаної комахі з вказаною сукупністю трансгенних рослин.

28. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і сукупність трансгенних рослин за п. 26, де вказані не-Bt рослини-сховища складають менше ніж 10 % у вказаній сукупності рослин.
29. Сукупність рослин за п. 28, де вказана сукупність рослин містить менше ніж приблизно 5 %  
5 рослин-сховищ.
30. Спосіб запобігання виробленню у комахи совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 28 або 29 і контактування вказаної комахи з вказаною сукупністю трансгенних рослин.
31. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння  
10 рослин за п. 26, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.
32. Сукупність рослин за будь-яким із пп. 5, 18 і 28, де вказані рослини займають площу, більшу ніж 10 акрів.
33. Рослина за будь-яким із пп. 1, 17, 24 і 26, де вказана рослина вибрана з групи, яка  
15 складається з кукурудзи, сої і бавовнику.
34. Рослина за будь-яким із пп. 1, 17, 24 і 26, де вказаною рослиною є рослина кукурудзи.
35. Трансгенна рослина за п. 26, де вказаним третім білком є білок Cry1Be.
36. Спосіб запобігання виробленню у комахи совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де  
20 вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 35 і контактування вказаної комахи з вказаною сукупністю трансгенних рослин.
37. Сукупність рослин в полі, що містить не-Bt рослини-сховища і множину рослин за п. 35, де вказані рослини-сховища складають менше ніж приблизно 10 % від всіх сільськогосподарських культур у вказаній сукупності рослин.
38. Сукупність рослин за п. 37, де вказана сукупність рослин містить менше ніж приблизно 5 %  
25 рослин-сховищ.
39. Спосіб запобігання виробленню у комахи совки трав'яної резистентності до токсину Cry, де вказаний спосіб включає посів насіння для одержання сукупності рослин за п. 37 або 38 і контактування вказаної комахи з вказаною сукупністю трансгенних рослин.
40. Суміш насіння, що містить насіння не-Bt рослин-сховищ і сукупність трансгенного насіння  
30 рослин за п. 35, де вказане насіння рослин-сховищ складає менше ніж 10 % від всього насіння у вказаній суміші.
41. Сукупність рослин за будь-яким із пп. 37 і 38, де вказані рослини займають площу, більшу ніж 10 акрів.
42. Рослина за будь-яким із пп. 1, 3, 17, 24, 25, 26 і 33, де вказана рослина вибрана з групи, яка  
35 складається з кукурудзи, сої і бавовнику.
43. Рослина за п. 42, де вказаною рослиною є рослина кукурудзи.
44. Клітина рослини за будь-яким із пп. 1, 3, 17, 24, 25, 26, 33 і 34, де вказана клітина рослини містить вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Cry1Fa, і вказану ДНК, що кодує вказаний інсектицидний білок Vip3Ab, і де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa принаймні на  
40 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:1, а вказаний інсектицидний білок Vip3Ab принаймні на 99 % ідентичний послідовності SEQ ID NO:2.
45. Рослина за будь-яким із пп. 1, 3, 17, 24, 25, 26, 33 і 34, де вказаний інсектицидний білок Cry1Fa містить SEQ ID NO:1, а вказаний інсектицидний білок Vip3Ab містить SEQ ID NO:2.



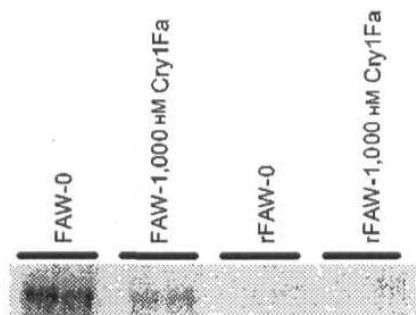
Гістограми інгібування росту (стовпці) і загибелі комах (D) залежно від дози повнорозмірного Vip3Ab1, спрямованого проти *Spodoptera frugiperda* дикого типу (J.E. Smith), (FAW) і Cry1 Fa-резистентної *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), (rFAW). Відсоток інгібування росту обчислювали шляхом порівняння середньої маси 8 личинок, оброблених тільки буфером, із масою личинок, оброблених токсином протягом 5 днів.

Фіг. 1



Флуоресцентна візуалізація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa, зв'язаного з BBMV від *S. frugiperda*, з подальшим розділенням за допомогою електрофорезу в ДСН-ПААГ. Зразки брали в дублікаті. Концентрація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa становила 1 нМ. Контроль означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV за відсутності будь-якого ліганду, що конкурентно зв'язується. 1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV у присутності 1000 нМ Cry1Fa, що не містить радіоактивної мітки, де зазначений рівень зв'язування вказує на повне витіснення радіоактивно міченого ліганду з білка BBMV. 1000 нМ Vip3Ab1 означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV у присутності 1000 нМ Vip3Ab1, що не містить радіоактивної мітки, де зазначений рівень зв'язування вказує на те, що цей білок не має здатність витіснити  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV *S. frugiperda* навіть при концентрації, в 1000 раз що перевищує концентрацію радіоактивно міченого ліганду

Фіг. 2



Флуоресцентна візуалізація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa, зв'язаного з BBMV *S. frugiperda* дикого типу (FAW) або Cry1 Fa-резистентною *S. frugiperda* (rFAW), з подальшим розділенням за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН. Зразки брали в дублікаті. Концентрація  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa становила 2,5 нМ. FAW-0 означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV *S. frugiperda* дикого типу за відсутності будь-якого ліганду, що конкурентно зв'язується. FAW-1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV *S. frugiperda* дикого типу в присутності 1000 нМ не міченого радіоактивної міткою Cry1Fa, де такий рівень зв'язування вказує на витіснення радіоактивно міченого ліганду з білка BBMV. rFAW-0 означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV Cry1 Fa-резистентною *S. frugiperda* за відсутності будь-якого ліганду, що конкурентно зв'язується. Потрібно звернути увагу на відсутність зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV, що походять від резистентної FAW. rFAW-1000 нМ Cry1Fa означає рівень зв'язування  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa з BBMV у присутності 1000 нМ Vip3Ab1, що не містить радіоактивну мітку, де такий рівень зв'язування також вказує на нездатність  $^{125}\text{I}$ -Cry1Fa зв'язуватися з BBMV від Cry1 Fa-резистентною *S. Frugiperda*.

Фіг. 3

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

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