(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0024942**
(51)[7] **C12N 15/82**; A01N 63/00; C07K 14/325 (13) **B**

(21) 1-2012-03859 (22) 05/07/2011
(86) PCT/US2011/042932 05/07/2011 (87) WO2012/006271 12/01/2012
(30) 61/362,109 07/07/2010 US
(45) 25/08/2020 389 (43) 25/04/2013 301A
(73) SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (US)
3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, North Carolina 27709 (US)
(72) GRASER, Gerson (DE); BOUDREAU, Eric (CA).
(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT LOÀI GÂY HẠI LÀ CÔN TRÙNG CÁNH CỨNG

(57) Sáng chế đề cập đến các chế phẩm được cải thiện và các phương pháp kiểm soát các loài gây hại là côn trùng cánh cứng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến các tổ hợp mới của các protein diệt côn trùng có độc tính được cải thiện đối với các loài gây hại là côn trùng cánh cứng như sâu hại rễ ngô. Hơn nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp diệt hoặc kiểm soát các loài gây hại là côn trùng cánh cứng sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập nói chung đến việc kiểm soát các loài gây hại gây thiệt hại cho các cây trồng bởi các hoạt động ăn uống của chúng, và cụ thể hơn là đến việc kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng bằng chế phẩm bao gồm các mức hiệp đồng của độc tố protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và độc tố protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy. Sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm và các phương pháp sử dụng các chế phẩm có chứa các độc tố protein như vậy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các côn trùng cánh cứng được coi là một trong số các loài gây hại quan trọng nhất đối với cây trồng. Ví dụ, loài sâu hại rễ ngô là các loài gây hại ngô mạnh nhất gây tổn thất ước tính trên 1 tỷ đô la hàng năm. Các loài gây hại là sâu hại rễ ngô quan trọng bao gồm *Diabrotica virgifera virgifera*, sâu hại rễ ngô miền Tây; *D. longicornis barberi*, sâu hại rễ ngô miền Bắc, *D. undecimpunctata howardi*, sâu hại rễ ngô miền Nam, và *D. virgifera zeae*, sâu hại rễ ngô Mexico. Bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado (CPB; *Leptinotarsa decemlineata*), là một ví dụ khác về côn trùng cánh cứng là loài gây hại nguy hiểm của khoai tây, cà chua và cà tím trên khắp thế giới.

Các loài gây hại là côn trùng cánh cứng chủ yếu được kiểm soát bởi các sử dụng mạnh các thuốc hóa học diệt loài gây hại, hoạt động thông qua sự kìm hãm phát triển của côn trùng, sự ngăn ngừa việc ăn hoặc sự sinh sản của côn trùng, hoặc làm côn trùng chết. Vì vậy, sự kiểm soát côn trùng tốt có thể đạt được, nhưng các hóa chất này đôi khi cũng gây ảnh hưởng đến các côn trùng có ích khác. Một vấn đề khác do sử dụng rộng rãi các thuốc diệt hóa học là sự xuất hiện các chủng côn trùng kháng thuốc.

Việc này đã được giảm một phần bởi các thực hành quản lý tính kháng thuốc khác nhau, nhưng ngày càng có nhiều nhu cầu về các tác nhân kiểm soát loài gây hại khác.

Các protein Cry của *Bacillus thuringiensis* (Bt) (còn được gọi là các nội độc tố δ) là các protein tạo thành chất nền dạng tinh thể ở *Bacillus* được biết là có hoạt tính diệt côn trùng khi được ăn bởi các côn trùng nhất định. Trên 180 protein Cry loài chuẩn trong 58 họ đã được xác định và đặt tên. Các protein Cry khác nhau đã được phân loại dựa vào phổ hoạt tính và tính tương đồng trình tự của chúng. Trước năm 1990, các lớp chính được xác định bởi phổ hoạt tính của chúng (Hofte and Whitely, 1989, Microbiol. Rev. 53:242-255), nhưng gần đây hơn hệ danh pháp mới được phát triển phân loại có hệ thống các protein Cry dựa vào tính tương đồng trình tự axit amin thay vì các tính đặc hiệu đích côn trùng (Crickmore *và các cộng sự*, 1998, Microbiol. Molec. Biol. Rev. 62:807-813).

Các gen mã hóa đối với các protein Cry đã được phân lập và sự biểu hiện của chúng trong các cây trồng đã được thể hiện để đề xuất một công cụ khác để kiểm soát các loài gây hại là côn trùng quan trọng về kinh tế. Các cây chuyển gen biểu hiện các protein Cry như vậy đã được thương mại hóa, cho phép các nông dân giảm hoặc tăng sử dụng các tác nhân kiểm soát côn trùng hóa học. Các protein Cry có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng hữu dụng trong các cây chuyển gen bao gồm, ví dụ, Cry3A, Cry3B và phức Cry34/Cry35. Các ví dụ về các protein Cry có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy đã được biểu hiện trong các cây chuyển gen bao gồm, ví dụ, Cry1A (ví dụ Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac), Cry1B, Cry1F và Cry2, và tương tự.

Một họ khác của các protein diệt côn trùng được tạo bởi loài *Bacillus* trong giai đoạn phát triển sinh dưỡng (các protein diệt côn trùng sinh dưỡng (Vip)) cũng đã được xác định. Các sáng chế Mỹ số 5,877,012, 6,107,279, và 6,137,033 mô tả một lớp các protein diệt côn trùng mới được gọi là Vip3. Các bộc lộ khác, bao gồm WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546, và WO 99/57282, cũng đã xác định các thể tương đồng của lớp protein Vip3. Các trình tự mã hóa Vip3 ghi mã khoảng protein 88kDa có hoạt tính diệt côn trùng đối với một phổ rộng các loài gây hại cánh vảy, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở sâu cắn rễ đen (BCW, *Agrotis ipsilon*), sâu cắn gié mùa thu (FAW, *Spodoptera frugiperda*), sâu đục chồi thuốc lá (TBW, *Heliothis virescens*), sâu đục thân mía (SCB, *Diatraea saccharalis*), sâu đục thân ngô nhỏ (LCB, *Elasmopalpus lignosellus*), và sâu xanh ngô (CEW, *Helicoverpa zea*), và khi được biểu hiện trong

các cây chuyển gen, ví dụ ngô (*Zea mays*), tạo sự bảo vệ cho cây khỏi bị thiệt hại do việc ăn của côn trùng.

Hiện đang cần đến các chế phẩm và các phương pháp sử dụng các chế phẩm có hoạt tính diệt côn trùng như vậy, ví dụ, để sử dụng bảo vệ mùa màng hoặc kiểm soát bệnh do côn trùng gây ra. Các chế phẩm mới cần khắc phục vấn đề tính kháng thuốc đối với các thuốc diệt côn trùng đang có hoặc để phòng ngừa sự phát triển tính kháng thuốc đối với các phương pháp về cây chuyển gen đang có. Lý tưởng là, các chế phẩm như vậy có độc tính cao và hữu hiệu khi được ăn bằng đường miệng bởi loài gây hại đích. Vì vậy, sáng chế bất kỳ đề xuất các chế phẩm trong đó một tính chất bất kỳ trong số các tính chất này được nâng cao có thể là một bước tiến trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng được cải thiện bao gồm việc đưa vào địa điểm mà ở đó côn trùng cánh cứng có thể ăn một lượng có tác dụng hiệp đồng của ít nhất một độc tố có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một độc tố có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy, trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng là protein Cry3A cải biến và trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy là protein Cry1Ab.

Mô tả chi tiết sáng chế

Để cho rõ ràng, một số thuật ngữ dùng trong bản mô tả này được định nghĩa và biểu thị như sau:

"Hoạt tính" nghĩa là các độc tố protein và các tổ hợp của các độc tố như vậy hoạt động như các chất kiểm soát côn trùng tác dụng bằng đường miệng, có hiệu quả gây độc, hoặc có khả năng phá hủy hoặc ngăn cản việc ăn của côn trùng, có thể có hoặc có thể không làm chết côn trùng. Khi chế phẩm theo sáng chế được sử dụng cho côn trùng, kết quả thông thường là sự chết của côn trùng, hoặc côn trùng không ăn được nguồn làm chế phẩm sẵn có đối với côn trùng. Chế phẩm như vậy có thể là cây chuyển gen biểu hiện các tổ hợp độc tố theo sáng chế. Một ví dụ là cây ngô chuyển gen biểu hiện protein Cry3A cải biến và protein Cry1Ab, tạo hoạt tính hiệp đồng ngăn cản việc ăn của sâu hại rễ ngô trên cây ngô chuyển gen.

"Kiểm soát" hoặc "việc kiểm soát" côn trùng nghĩa là, thông qua hiệu quả gây độc, ức chế khả năng các loài gây hại là côn trùng sống sót, phát triển, ăn, và/hoặc sinh sản, hoặc hạn chế thiệt hại hoặc tổn thất do côn trùng ở cây trồng. "Kiểm soát" côn trùng có thể có nghĩa là hoặc có thể không có nghĩa là diệt côn trùng, mặc dù tốt hơn nếu có nghĩa là diệt côn trùng.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "ngô" nghĩa là *Zea mays* hoặc cây ngô và bao gồm tất cả các giống cây có thể được lai với ngô, bao gồm loài cây ngô dại.

"Sử dụng" hoặc "việc sử dụng" chế phẩm hoặc độc tố nghĩa là chế phẩm hoặc độc tố tiếp xúc với côn trùng, dẫn đến hiệu quả gây độc và kiểm soát côn trùng. Chế phẩm hoặc độc tố có thể được sử dụng theo nhiều cách đã được công nhận, ví dụ, qua đường miệng bởi sự ăn của côn trùng qua sự biểu hiện cây chuyển gen, chế phẩm dạng bào chế chứa protein, chế phẩm phun chứa protein, chất nền mồi, hoặc hệ thống sử dụng độc tố khác được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này.

"Lượng kiểm soát côn trùng hữu hiệu" nghĩa là nồng độ độc tố hoặc các độc tố, thông qua hiệu quả gây độc, ức chế khả năng các côn trùng sống sót, phát triển, ăn, và/hoặc sinh sản, hoặc hạn chế thiệt hại hoặc tổn thất do côn trùng ở cây trồng. "Lượng kiểm soát côn trùng hữu hiệu" có thể có nghĩa là hoặc có thể không có nghĩa là diệt côn trùng, mặc dù tốt hơn nếu có nghĩa là diệt côn trùng.

"Casset biểu hiện" như được sử dụng ở đây nghĩa là trình tự axit nucleic có khả năng nhắm đến sự biểu hiện của một trình tự axit nucleic cụ thể trong tế bào chủ thích hợp, bao gồm promotơ được nối hoạt động với trình tự axit nucleic nghiên cứu được nối hoạt động với các tín hiệu kết thúc. Thông thường nó cũng bao gồm các trình tự cần cho sự dịch mã đúng trình tự axit nucleic. Casset biểu hiện bao gồm trình tự axit nucleic nghiên cứu có thể là thể khảm, nghĩa là ít nhất một thành phần trong số các thành phần của nó là không cùng nguồn với ít nhất một thành phần trong số các thành phần khác của nó. Casset biểu hiện cũng có thể là đoạn vốn có nhưng đã thu được ở dạng tái tổ hợp hữu dụng cho sự biểu hiện không cùng nguồn. Tuy nhiên, thông thường casset biểu hiện không cùng nguồn với vật chủ, nghĩa là, trình tự axit nucleic cụ thể của casset biểu hiện vốn không có trong tế bào chủ và phải được đưa vào trong tế bào chủ hoặc tổ tiên của tế bào chủ bởi bộ phận biến nạp. Sự biểu hiện của trình tự axit nucleic trong casset biểu hiện có thể nằm dưới sự điều khiển của promotơ cơ định

hoặc promotơ cảm ứng khơi mào sự phiên mã chỉ khi tế bào chủ được tiếp xúc một số chất kích thích bên ngoài cụ thể. Trong trường hợp của sinh vật đa bào, như cây, promotơ cũng có thể là đặc hiệu đối với mô, hoặc cơ quan, hoặc một giai đoạn phát triển cụ thể.

"Bộ phận MIR604" hoặc "MIR604" nghĩa là bộ phận của ngô chuyển gen, được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 7,361,813 đã đưa vào trong bộ gen của nó gen chuyển *cry*3A055, được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 7,230,167, và gen chuyển *pmi*, được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 5,767,378. Vì vậy, MIR604 bao gồm gen chuyển thứ nhất ghi mã protein diệt côn trùng Cry3A055 (Cry3A cải biến hoặc mCry3A), hữu dụng trong kiểm soát các loài gây hại là côn trùng sâu hại rễ ngô (*Diabrotica spp.*), và gen chuyển thứ hai ghi mã enzym phosphomanoza isomeraza (PMI), hữu dụng làm gen đánh dấu chọn lọc, cho phép cây ngô sử dụng manoza làm nguồn cacbon.

"Bộ phận MIR162" hoặc "MIR162" nghĩa là bộ phận của ngô chuyển gen được bộc lộ trong công bố quốc tế số WO 07/142840 đã đưa vào trong bộ gen của nó gen chuyển *vip3Aa20* và gen chuyển *pmi*. Vì vậy, MIR162 bao gồm gen chuyển thứ nhất ghi mã protein diệt côn trùng Vip3Aa20, hữu dụng trong kiểm soát các loài gây hại là côn trùng cánh cứng, và gen chuyển thứ hai ghi mã enzym phosphomanoza isomeraza (PMI), hữu dụng làm gen đánh dấu chọn lọc, cho phép cây ngô sử dụng manoza làm nguồn cacbon.

"Bộ phận Bt11" hoặc "Bt11" nghĩa là bộ phận của ngô chuyển gen được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,114,608 đã đưa vào trong bộ gen của nó gen chuyển *cry1Ab* và gen chuyển *pat*. Vì vậy, Bt11 bao gồm gen chuyển thứ nhất ghi mã protein diệt côn trùng Cry1Ab, hữu dụng trong kiểm soát các loài gây hại là côn trùng cánh vảy, và gen chuyển thứ hai ghi mã enzym PAT, hữu dụng làm gen đánh dấu chọn lọc, tạo sự dung nạp thuốc diệt cỏ đối với cây ngô.

"Gen" là vùng xác định được định vị trong bộ gen và, bên cạnh trình tự axit nucleic mã hóa nêu trên, bao gồm các trình tự axit nucleic điều chỉnh sơ cấp khác gây ra sự điều khiển biểu hiện, nghĩa là sự phiên mã và sự dịch mã, của phần mã hóa. Gen cũng có thể bao gồm các chuỗi không dịch mã 5' và 3' và các chuỗi kết thúc khác. Các thành phần khác có thể có là, ví dụ, các intron.

"Gen nghiên cứu" là gen bất kỳ, khi được truyền vào cây, tạo cho cây tính trạng cần thiết như tính kháng thuốc kháng sinh, tính kháng virut, tính kháng côn trùng, tính kháng bệnh, hoặc tính kháng đối với các loài gây hại khác, dung nạp thuốc diệt cỏ, giá trị dinh dưỡng được cải thiện, tính năng được cải thiện về chế biến công nghiệp hoặc khả năng sinh sản luân phiên khác. "Gen nghiên cứu" cũng có thể là gen được truyền vào các cây để tạo ra các enzym hoặc các chất chuyển hóa có giá trị thương mại trong cây.

Khi được sử dụng ở đây, thuật ngữ "người trồng" nghĩa là người hoặc thực thể tham gia hoạt động nông nghiệp, nuôi trồng các sinh vật sống, như cây trồng, làm thực phẩm hoặc các nguyên liệu thô.

Trình tự axit nucleic "dị chủng" là trình tự axit nucleic không gắn tự nhiên với tế bào chủ mà nó được đưa vào trong đó, bao gồm các bản sao nhiều lần tồn tại phi tự nhiên của trình tự axit nucleic tồn tại tự nhiên.

Trình tự axit nucleic "tương đồng" là trình tự axit nucleic liên kết tự nhiên với tế bào chủ mà nó được đưa vào trong đó.

"Diệt côn trùng" được định nghĩa là hoạt tính độc sinh học có khả năng kiểm soát các côn trùng, tốt hơn là bởi việc diệt chúng.

Phân tử axit nucleic "phân lập" hoặc protein phân lập là phân tử axit nucleic hoặc protein, bằng nhân tạo, tồn tại tách khỏi môi trường tự nhiên của nó và vì vậy không là sản phẩm tự nhiên. Phân tử axit nucleic hoặc protein phân lập có thể tồn tại dưới dạng tinh khiết hoặc có thể tồn tại trong môi trường phi tự nhiên như, ví dụ, tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, protein Cry tự nhiên trong *Bacillus thuringiensis* không được phân lập, nhưng cùng một protein Cry trong cây chuyển gen được phân lập.

"Cry3A cải biến (mCry3A) " nghĩa là gen hoặc protein được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 7,030,295, công bố ngày 18 tháng 4 năm 2006, được đưa ra ở đây để tham khảo, sử dụng trong việc kiểm soát các loài gây hại là côn trùng sâu hại rễ ngô (*Diabrotica spp.*).

"Phân tử axit nucleic" hoặc "trình tự axit nucleic" là đoạn thẳng của ADN hoặc ARN sợi đơn hoặc đôi có thể được phân lập từ nguồn bất kỳ. Trong phạm vi của sáng chế, phân tử axit nucleic hoặc trình tự axit nucleic tốt hơn là đoạn ADN.

"Cây" là cây bất kỳ ở giai đoạn phát triển bất kỳ, cụ thể là cây có hạt.

"Tế bào thực vật" là đơn vị cấu trúc và sinh lý học của cây, bao gồm thể nguyên sinh và thành tế bào. Tế bào thực vật có thể ở dạng tế bào phân lập đơn hoặc tế bào nuôi, hoặc một phần của đơn vị tổ chức cao hơn như, ví dụ, mô thực vật, bộ phận cây, hoặc toàn bộ cây.

"Giống nuôi cấy tế bào thực vật" nghĩa là giống nuôi cấy các đơn vị thực vật như, ví dụ, thể nguyên sinh, tế bào trong nuôi cấy tế bào, tế bào trong mô thực vật, phấn, ống phấn, noãn, túi phôi, hợp tử và hạt phấn ở các giai đoạn phát triển khác nhau.

"Nguyên liệu thực vật" được dùng để chỉ lá, thân, rễ, hoa hoặc các bộ phận của hoa, quả, phấn hoa, tế bào trứng, hợp tử, hạt, mảnh cắt, giống nuôi cấy tế bào hoặc mô, hoặc phần hoặc sản phẩm bất kỳ khác của cây.

"Bộ phận cây" là phần cấu trúc và phân hóa tách biệt và nhìn thấy của cây như rễ, thân, lá, nụ hoa, hoặc phôi.

"Mô thực vật" được sử dụng ở đây nghĩa là nhóm các tế bào thực vật được tổ chức thành đơn vị cấu trúc và đơn vị chức năng. Mô bất kỳ của cây *in planta* hoặc trong giống nuôi cấy được bao gồm. Thuật ngữ này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, toàn bộ cây, các bộ phận cây, hạt cây, giống nuôi cấy mô và các nhóm bất kỳ của các tế bào thực vật được tổ chức thành các đơn vị cấu trúc và/hoặc đơn vị chức năng. Sự sử dụng thuật ngữ này cùng với, hoặc không cùng với, loại mô thực vật cụ thể nêu trên hoặc mặt khác được bao gồm bởi định nghĩa này không có ý định loại trừ loại mô thực vật bất kỳ khác.

"Biến nạp" là quá trình đưa axit nucleic không cùng nguồn vào trong tế bào hoặc sinh vật chủ. Cụ thể, "biến nạp" nghĩa là sự hợp nhất ổn định của phân tử ADN vào trong hệ gen của sinh vật nghiên cứu.

"Biến nạp / chuyển gen / tái tổ hợp" dùng để chỉ sinh vật chủ như vi khuẩn hoặc cây mà phân tử axit nucleic không cùng nguồn đã được đưa vào trong đó. Phân tử axit nucleic có thể được hợp nhất ổn định vào trong hệ gen của vật chủ hoặc phân tử axit nucleic cũng có thể là phân tử ngoài nhiễm sắc thể. Phân tử ngoài nhiễm sắc thể như vậy có thể tự sao chép. Tế bào, mô, hoặc cây biến nạp được hiểu bao gồm không chỉ

sản phẩm cuối của quá trình biến nạp, mà còn thế hệ con chuyển gen của chúng. Vật chủ "không biến nạp", "không chuyển gen", hoặc "không tái tổ hợp" dùng để chỉ sinh vật kiểu dại, ví dụ, vi khuẩn hoặc cây, không chứa phân tử axit nucleic không cùng nguồn.

Lớp protein "Vip3" bao gồm, ví dụ, Vip3Aa, Vip3Ab, Vip3Ac, Vip3Ad, Vip3Ae, VipAf, Vip3Ag, Vip3Ba, và Vip3Bb và các thể tương đồng của chúng. "Thể tương đồng" nghĩa là protein hoặc polypeptit được chỉ dẫn có quan hệ xác định đối với các thành phần khác của lớp protein Vip3. "Vip3Aa20" (số truy cập ngân hàng gen DQ539888) là thể tương đồng Vip3 duy nhất đối với bộ phận MIR162. Nó được tạo bởi các đột biến ngẫu nhiên được đưa vào trong gen *vip3Aa19* ngô được tối ưu hóa (số truy cập ngân hàng gen DQ539887) trong quá trình biến nạp ở cây.

Hệ danh pháp được sử dụng ở đây đối với các bazơ của ADN và các axit amin là như được thiết lập trong 37 C.F.R. § 1.822.

Sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát hiệp đồng loài gây hại là côn trùng cánh cứng bao gồm việc sử dụng vào vị trí mà ở đó côn trùng cánh cứng có thể ăn chế phẩm hiệp đồng hữu hiệu bao gồm ít nhất một độc tố có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một độc tố có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy. Đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này là nếu hai protein không liên hệ không độc riêng rẽ, chúng sẽ không độc khi được tổ hợp. Cũng biết là việc tổ hợp protein không có hoạt tính kháng loài gây hại đích với protein hoạt động kháng loài gây hại đích đó, protein không hoạt động sẽ không làm tăng hoạt tính của protein vốn đã hoạt động.

Theo sáng chế, hiện nay đã bất ngờ nhận thấy là sự sử dụng tổ hợp của ít nhất một độc tố protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một độc tố protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy chứng minh tác dụng hiệp đồng đáng kể (nghĩa là sự kiểm soát côn trùng cánh cứng thu được tốt hơn nhiều so với sự kiểm soát có thể được dự báo từ sự kiểm soát côn trùng cánh cứng của độc tố có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng được sử dụng một mình). Tác dụng hiệp đồng này cho phép mức độ hữu dụng về thương mại của sự kiểm soát côn trùng cánh cứng và giúp giảm sự phát triển tính kháng thuốc của côn trùng đối với độc tố đơn.

Theo một phương án, sáng chế bao gồm phương pháp kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho loài gây hại là côn

trùng cánh cứng hoặc môi trường của nó chế phẩm bao gồm ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy, trong đó chế phẩm này kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng đến mức độ cao hơn có thể trông đợi do chỉ một protein có hoạt tính đối với loài gây hại là côn trùng cánh cứng bất kỳ được bao gồm đơn lẻ trong đó, trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng là protein Cry3A cải biến và trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy là protein Cry1Ab.

Các ví dụ về protein Cry1Ab có các số truy cập ngân hàng gen sau: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071) , Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) và Cry1Ab26 (HQ847729). Theo phương án khác nữa, protein Cry1Ab là protein được bao gồm trong bộ phận Bt11 và được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,114,608.

Theo khía cạnh khác nữa của phương án này, loài gây hại là côn trùng cánh cứng là bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado hoặc sâu hại rễ ngô. Trong phương án khác, sâu hại rễ ngô là sâu hại rễ ngô miền Tây, sâu hại rễ ngô miền Bắc, sâu hại rễ ngô miền Nam hoặc sâu hại rễ ngô Mexico.

Theo phương án khác của phương pháp được bao gồm, chế phẩm là cây chuyển gen biểu hiện protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy. Theo một khía cạnh, cây chuyển gen được chọn từ nhóm bao gồm đậu tương, bông, cải dầu, cải dầu mùa hè, các loại rau, hướng dương, thuốc lá, cà chua, mía, lúa, lúa mỳ, ngô, lúa mạch đen, lúa mạch, cỏ búi và cỏ trồng. Theo khía cạnh khác, cây chuyển gen là cây ngô chuyển gen. Theo khía cạnh khác nữa, cây ngô chuyển gen là chồng nhân giống bao gồm các đột biến ngô chuyển gen MIR604 và Bt11. Theo khía cạnh khác, cây ngô chuyển gen là chồng nhân giống bao gồm các đột biến ngô chuyển gen MIR604, Bt11 và MIR162.

Theo phương án khác, sáng chế bao gồm phương pháp kiểm soát loài gây hại là sâu hại rễ ngô, phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho loài gây hại là sâu hại rễ ngô hoặc môi trường của nó chế phẩm bao gồm protein Cry3A cải biến (mCry3A) và protein Cry1Ab, trong đó chế phẩm này kiểm soát loài gây hại là sâu hại rễ ngô đến mức độ cao hơn có thể trông đợi từ một mình protein mCry3A.

Theo phương án khác, chế phẩm là cây ngô chuyển gen. Theo phương án khác nữa, cây ngô chuyển gen bao gồm bộ phận MIR604 và bộ phận Bt11.

Cũng được bộc lộ là chế phẩm kiểm soát côn trùng cánh cứng bao gồm ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy, trong đó chế phẩm này kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng đến mức độ cao hơn có thể trông đợi từ riêng protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng bất kỳ được chứa trong đó một mình.

Protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng là Cry3A cải biến và protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy là Cry1Ab. Các ví dụ về protein Cry1Ab có các số truy cập ngân hàng gen sau: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071) , Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) và Cry1Ab26 (HQ847729). Theo phương án khác, protein Cry1Ab là protein được bao gồm trong bộ phận Bt11 và được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,114,608.

Theo khía cạnh khác nữa, loài gây hại là côn trùng cánh cứng là bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado hoặc sâu hại rễ ngô. Theo khía cạnh khác, sâu hại rễ ngô là sâu hại rễ ngô miền Tây, sâu hại rễ ngô miền Bắc, sâu hại rễ ngô miền Nam hoặc sâu hại rễ ngô Mexico.

Theo một khía cạnh, chế phẩm là cây chuyển gen biểu hiện protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy. Theo

một khía cạnh, cây chuyển gen được chọn từ nhóm bao gồm đậu tương, bông, cải dầu, cải dầu mùa hè, các loại rau, hướng dương, thuốc lá, cà chua, mía, lúa, lúa mỳ, ngô, yến mạch đen, lúa mạch , cỏ búi và cỏ trồng. Theo khía cạnh khác, cây chuyển gen là cây ngô chuyển gen. Theo khía cạnh khác, cây ngô chuyển gen là chồng nhân giống bao gồm các đột biến ngô chuyển gen MIR604 và Bt11. Theo khía cạnh khác, cây ngô chuyển gen là chồng nhân giống bao gồm các đột biến ngô chuyển gen MIR604, Bt11 và MIR162.

Cũng được bộc lộ là phương pháp cung cấp cho người trồng các phương tiện kiểm soát quần thể loài gây hại là côn trùng cánh cứng bao gồm việc cung cấp hoặc bán cho người trồng hạt chuyển gen bao gồm axit nucleic ghi mã ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy, trong đó các cây chuyển gen phát triển từ hạt nêu trên kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng đến mức độ cao hơn có thể trông đợi từ riêng protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng bất kỳ được bao gồm trong đó một mình.

Protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng là Cry3A cải biến và protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy là Cry1Ab. Các ví dụ về protein Cry1Ab có các số truy cập ngân hàng gen sau: Cry1Ab1 (AAA22330), Cry1Ab2 (AAA22613), Cry1Ab3 (AAA22561), Cry1Ab4 (BAA00071), Cry1Ab5 (CAA28405), Cry1Ab6 (AAA22420), Cry1Ab7 (CAA31620), Cry1Ab8 (AAA22551), Cry1Ab9 (CAA38701), Cry1Ab10 (A29125), Cry1Ab11 (I12419), Cry1Ab12 (AAC64003), Cry1Ab13 (AAN76494), Cry1Ab14 (AAG16877), Cry1Ab15 (AAO13302), Cry1Ab16 (AAK55546), Cry1Ab17 (AAT46415), Cry1Ab18 (AAQ88259), Cry1Ab19 (AAW31761), Cry1Ab20 (ABB72460), Cry1Ab21 (ABS18384), Cry1Ab22 (ABW87320), Cry1Ab23 (HQ439777), Cry1Ab24 (HQ439778), Cry1Ab25 (HQ685122) và Cry1Ab26 (HQ847729). Theo khía cạnh khác nữa, protein Cry1Ab là protein được bao gồm trong bộ phận Bt11 và được bộc lộ trong sáng chế Mỹ số 6,114,608.

Theo khía cạnh khác nữa, loài gây hại là côn trùng cánh cứng là bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado hoặc sâu hại rễ ngô. Theo một khía cạnh, sâu hại rễ ngô là sâu hại rễ ngô miền Tây, sâu hại rễ ngô miền Bắc, sâu hại rễ ngô miền Nam hoặc sâu hại rễ ngô Mexico.

Theo một khía cạnh, hạt cây và cây chuyển gen được chọn từ nhóm bao gồm đậu tương, bông, cải dầu, cải dầu mùa hè, các loại rau, hướng dương, thuốc lá, cà chua, mía, lúa, lúa mỳ, ngô, yến mạch đen, lúa mạch , cỏ búi và cỏ trồng. Theo phương án khác, hạt cây và cây chuyển gen là hạt và cây ngô chuyển gen.

Sự đồng biểu hiện của ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy trong cùng một cây chuyển gen có thể đạt được bởi việc thực hiện kỹ thuật di truyền cây để chứa và biểu hiện tất cả các gen cần thiết trong cái gọi là chồng phân tử. Theo cách khác, cây, bố mẹ 1, có thể được thực hiện kỹ thuật di truyền để biểu hiện các gen nhất định ghi mã các protein diệt côn trùng theo sáng chế. Cây thứ hai, bố mẹ 2, có thể được thực hiện kỹ thuật di truyền để biểu hiện các gen nhất định khác ghi mã các protein diệt côn trùng theo sáng chế. Nhờ việc lai bố mẹ 1 và bố mẹ 2, các cây con thu được biểu hiện tất cả các gen được đưa vào trong các bố mẹ 1 và 2, được ký hiệu ở đây là "chồng nhân giống". Chồng nhân giống như vậy tạo chế phẩm theo sáng chế có thể đạt được bằng việc lai cây ngô bao gồm bộ phận MIR604 với cây ngô bao gồm bộ phận Bt11. Vì vậy, thế hệ con của chồng nhân giống bao gồm protein mCry3A và protein Cry1Ab được bộc lộ ở đây để đề xuất sự kiểm soát hiệp đồng các loài gây hại là côn trùng cánh cứng.

Các chế phẩm, ví dụ, hạt cây chuyển gen, cũng có thể được xử lý bằng lớp bao hạt diệt côn trùng như được mô tả trong các sáng chế Mỹ số 5,849,320 và 5,876,739. Trong trường hợp cả hai lớp bao hạt diệt côn trùng và hạt chuyển gen theo sáng chế hoạt động kháng cùng một côn trùng đích, tổ hợp này hữu dụng (i) trong phương pháp nâng cao tiếp hoạt tính của chế phẩm hiệp đồng kháng côn trùng đích và (ii) trong phương pháp ngăn ngừa sự phát triển tính kháng thuốc đối với chế phẩm bằng cách đề xuất một cơ chế hoạt động khác kháng côn trùng đích. Vì vậy, sáng chế bộc lộ phương pháp nâng cao hoạt tính kháng hoặc ngăn ngừa phát triển tính kháng thuốc trong côn trùng đích, ví dụ sâu hại rễ ngô, bao gồm việc sử dụng lớp bao hạt diệt côn trùng đối với hạt chuyển gen. Các xử lý hóa học như vậy có thể bao gồm các thuốc diệt côn trùng, các thuốc trừ nấm hoặc thuốc trừ giun tròn. Các ví dụ về các thuốc diệt côn trùng như vậy bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dinotefuran, như thiametoxam, imiđacloprit, axetamiprit, nitenpyram, niđinotefuran, clofenapyr, tebufenpyrat, tebufenozit, metoxyfenozit, halofenozit, triazamat, avermectin, spinosat, fiprinol,

axephat, fenamiphot, diazinon, clorpyrifot, clorpyrifon-metyl, malathion, cacbaryl, alđicarb, cacbofuran, thiođicarb, và oxamyl. Thậm chí trong trường hợp lớp bao hạt diệt côn trùng hoạt động kháng côn trùng khác, lớp bao hạt diệt côn trùng hữu dụng để mở rộng phạm vi kiểm soát côn trùng, ví dụ bằng cách bổ sung lớp bao hạt diệt côn trùng có hoạt tính kháng các côn trùng cánh vảy vào hạt chuyển gen, có hoạt tính kháng các côn trùng cánh cứng, hạt chuyển gen đã bao thu được kiểm soát cả hai loài gây hại là côn trùng cánh vảy và cánh cứng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả tiếp bởi sự tham khảo các ví dụ chi tiết sau. Các ví dụ này được cung cấp chỉ cho mục đích minh họa, và không có ý định giới hạn trừ phi được định rõ khác. ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn và các kỹ thuật tách dòng phân tử được sử dụng ở đây đã được biết rõ trong lĩnh vực này và được mô tả bởi J. Sambrook, *và cộng sự.*, Molecular Cloning: *A Laboratory Manual, 3d Ed.,* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); bởi T.J. Silhavy, M.L. Berman, và L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) và bởi Ausubel, F.M. *và cộng sự , Current Protocols in Molecular Biology*, New York, John Wiley and Sons Inc., (1988), Reiter, *và cộng sự*, *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Press (1992), và Schultz *và cộng sự*, *Plant Molecular Biology Manual*, Kluwer Academic Publishers (1998).

Ví dụ 1. Sự tương tác giữa các độc tố kháng bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado

Trong ví dụ này các tác dụng của mCry3A lên độc tính của Cry1Ab, và các tác dụng của Cry1Ab lên độc tính của mCry3A, được đo bằng các xét nghiệm sinh học thử các protein diệt côn trùng một mình hoặc phối hợp. Ngô bộ phận Bt11 và ngô bộ phận MIR604 lần lượt biểu hiện các protein diệt côn trùng Cry1Ab và Cry3A cải biến (mCry3A). Cry1Ab hoạt động kháng bộ cánh vảy nhất định, trong khi mCry3A hoạt động kháng một số loài cánh cứng. Ở Mỹ (US), sử dụng chủ yếu ngô Bt11 để kiểm soát sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostrinia nubilalis;* ECB), và các đích quan trọng của ngô MIR604 là sâu hại rễ ngô miền Tây (*Diabrotica virgifera virgifera;* WCR) và sâu hại rễ ngô miền Bắc (*Diabrotica longicornis barberi;* NCR). Thông qua các chồng nhân giống thông thường của các cây Bt11 và MIR604, các giống ngô lai chồng Bt11

x MIR604 tạo ra cả hai Cry1Ab và mCry3A được tạo. Các giống lai ngô này cung cấp kiểm soát ECB cũng như WCR và NCR.

Các sinh vật chỉ thị được sử dụng là ECB tuổi thứ nhất, nó rất nhạy cảm với Cry1Ab, và bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado tuổi thứ nhất (*Leptinotarsa decemlineata;* CPB), nó rất nhạy cảm với mCry3A. ECB không nhạy cảm với mCry3A, và CPB nhạy cảm với Cry1Ab. Mặc dù CPB không phải là loài gây hại đích của MIR604 hoặc ngô Bt11 x MIR604, nó có thể kiểm nghiệm được nhiều hơn bằng việc thử trong phòng thí nghiệm so với các loài sâu hại rễ được coi là đích của mCry3A. Cả hai ấu trùng ECB và CPB đã được xét nghiệm sinh học dễ dàng sử dụng các khẩu phần nhân tạo tiêu chuẩn trong cùng điều kiện phòng thí nghiệm. Vì các tuổi thứ nhất của các loài này rất mẫn cảm với Cry1Ab hoặc mCry3A, khả năng phát hiện nhiều thay đổi đáng kể về độc tính của một trong hai protein được tối đa hóa. Trong mỗi xét nghiệm sinh học phối hợp, mỗi loài nhạy cảm lần lượt được tiếp xúc với nồng độ độc tố cao và thấp, được thể hiện bởi LC70 và LC30, phối hợp với nồng độ cao của phi độc tố, được thể hiện bởi LC90 đối với loài nhạy cảm tương ứng.

Các dạng thí nghiệm khác nhau là sẵn có để thử các tương tác giữa các độc tố. Dạng này phụ thuộc vào mô hình được sử dụng để dự báo các tác dụng của các hỗn hợp các độc tố, mà không cần tương tác, từ các tác dụng của các hợp chất đơn lẻ; sự tương tác được phát hiện khi các tác dụng được quan sát của hỗn hợp khác với các dự báo của mô hình. Khi các độc tố có các tác dụng tương tự, sao cho một hợp chất có thể được thay thế là tỷ lệ không đổi của hợp chất kia, mô hình số không được gọi là tác động liên kết tương tự. Khi mô hình này áp dụng, phép thử tương tác xác định liều phản ứng đối với tỷ lệ cố định của các hợp chất (ví dụ, Tabashnik, 1992). Khi các độc tố có tác động độc lập (các cách tác động khác nhau), mô hình tốt nhất là sự tác động liên kết độc lập, và phép thử tương tác khảo sát các tác dụng của các tỷ lệ khác nhau của các hợp chất trong dạng lũy thừa (ví dụ, Tajima *và các cộng sự*, 2002). Các bộ số liệu tổng hợp cho Cry1Ab và mCry3A cho thấy các sinh vật nhạy cảm với một protein sẽ không nhạy cảm với protein kia; nói cách khác, chỉ có một hợp chất là độc đối với sinh vật cụ thể và giả thuyết số không là hỗn hợp không có tác dụng bổ sung. Đối với các trạng thái này, sự tương tác được thể hiện bởi sự khác nhau giữa độc tính của protein A một mình và độc tính của nó khi có protein B. Đối với sinh vật nhạy cảm với protein A, không có tác dụng liều - phản ứng đối với protein B, và vì vậy không có lý

do trông đợi nồng độ protein B ảnh hưởng đến độc tính của protein A. Vì vậy, việc thử tác dụng của protein B ở nồng độ cố định là phương pháp đơn giản và hữu hiệu để thử tương tác bất kỳ. Phương pháp này tương đồng gần nhất "sự tiếp cận kinh nghiệm đơn giản" được mô tả bởi Tabashnik (1992).

Tương tác giữa hai protein diệt côn trùng được phát hiện khi sự khác nhau đáng kể theo thống kê giữa tỷ lệ chết được quan sát với protein độc đơn lẻ và tỷ lệ chết được quan sát khi protein thứ hai được bổ sung phối hợp với protein độc. ECB tuổi thứ nhất được tiếp xúc với Cry1Ab ở LC30 và LC70, một mình và phối hợp với nồng độ cao của mCry3A, tương ứng với LC90 đối với CPB tuổi thứ nhất. Cũng do vậy, CPB tuổi thứ nhất được tiếp xúc với mCry3A ở LC30 và LC70 một mình và phối hợp với nồng độ cao của Cry1Ab, tương ứng với LC90 đối với ECB tuổi thứ nhất.

Việc tiếp xúc các loài nhạy cảm ở cả hai LC30 và LC70 của chúng cho phép đánh giá sự tương tác tiềm ẩn với protein thứ hai ở hai điểm khác biệt trên đường cong liều - phản ứng. Sự tiếp xúc với protein thứ hai ở nồng độ độc cao (LC90) đối với các loài nhạy cảm cung cấp sự tiếp xúc cao hữu hiệu để phát hiện độc tính thích đáng sinh học bất kỳ nếu có sự tương tác giữa hai protein.

Các nguồn Cry1Ab và mCry3A được sử dụng trong các xét nghiệm sinh học là các chất thử được tạo bởi việc biểu hiện quá mức mỗi protein trong *E. coli* tái tổ hợp tiếp theo bởi sự làm sạch. Cry1Ab và mCry3A như được chứa trong các chất thử này về căn bản tương đương với các protein diệt côn trùng như được biểu hiện lần lượt trong các cây ngô chuyển gen Bt11 và MIR604. Sự sử dụng các protein tinh khiết được tạo trong các vi khuẩn tốt hơn là sử dụng các chế phẩm dẫn xuất thực vật của Cry1Ab và mCry3A. Độ tinh khiết cao hơn tương đối của các chất thử dẫn xuất vi khuẩn cho phép các xác định độc tính chính xác hơn, mà không có sự can thiệp từ các chất thực vật. Các chất thực vật này không thể có trong các lượng bằng nhau trong cả hai nguyên liệu dẫn xuất Bt11 và MIR604, và cả trong các nguyên liệu kiểm soát, và có thể khó giải thích các kết quả xét nghiệm sinh học.

Sản xuất chất thử Cry1Ab: chất thử Cry1Ab được xác định chứa khoảng 127µg chất thử Cry1Ab/ml (0,0127% kl/tt - khối lượng/thể tích). Sau khi điều chế, chất thử được bảo quản ở khoảng 4°C. Cry1Ab bị cắt trypsin trong chất thử gần tương ứng với Cry1Ab bị cắt được ghi mã trong ngô Bt11. Protein Cry1Ab bị cắt được ghi mã trong

ngô Bt11 là các axit amin đuôi 615 N thứ nhất của protein Cry1Ab tự nhiên dài đủ từ *B. thuringiensis* loài *kurstaki*. Bằng cách so sánh, dạng trội của Cry1Ab bị cắt trypsin trong chất thử là protein axit amin 587, thể hiện cùng một protein Cry1Ab bị cắt có trong ngô Bt11, trừ đi các axit amin đuôi 28 N thứ nhất (Kramer, 2006). Sự trypsin hóa Cry1Ab trong ngô Bt11 khử đi các axit amin đuôi 28 N này (chúng không cần cho hoạt tính diệt côn trùng), và còn chứng minh tính tương đương thực chất của Cry1Ab bị cắt trypsin được tạo bởi *E. coli* và Cry1Ab bị cắt được tạo trong Bt11, khi được đo bằng SDSPAGE, sự phân tích thấm tách miền Tây, việc lập trình tự đuôi N, việc lập bản đồ peptit, hoạt tính sinh học kháng ấu trùng ECB sơ sinh, và không có sự glycozyl hóa phát hiện được. Vì vậy, protein Cry1Ab bị cắt có trong chất thử có thể được coi về thực chất tương đương với protein Cry1Ab bị cắt được ghi mã trong ngô Bt11.

Sản xuất chất thử mCry3A: Chất thử mCry3A được xác định chứa khoảng 90% khối lượng protein mCry3A, có hoạt tính sinh học kháng loài cánh cứng nhạy cảm và được thể hiện về thực chất tương đương với mCry3A khi được tạo trong ngô MIR604 đột biến, khi được đánh giá bởi các thông số sinh hóa và chức năng khác nhau. Sau khi điều chế, chất thử mCry3A được bảo quản ở khoảng -20°C.

Đánh giá LC30, LC70 và LC90 đối với liều - phản ứng của ECB đối với Cry1Ab: Hoạt tính sinh học của Cry1Ab được đánh giá trong các xét nghiệm ăn của côn trùng sử dụng ấu trùng của ECB tuổi thứ nhất phù hợp với các phương pháp tiêu chuẩn được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nói ngắn gọn, các xét nghiệm sinh học được thực hiện trong các đĩa 24 giếng Costar (Fisher Scientific, Cat. # PD 10-047-05). Các dung dịch thử được chuẩn bị bởi việc pha loãng chất thử Cry1Ab lỏng trong chất đệm amoni cacbonat 0,6µM. Một trăm µl mỗi dung dịch pha loãng được bổ sung vào 100µl khẩu phần của ECB (Khẩu phần của côn trùng cánh vảy thông thường từ BioServe, Inc.; Frenchtown, NJ, USA) và được trộn kỹ. Khẩu phần của côn trùng là ECB được chuẩn bị phù hợp với các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mỗi ống chứa 200µl khẩu phần của côn trùng chứa các nồng độ Cry1Ab nằm trong khoảng từ 3 đến 372ng/ml khẩu phần. Mỗi xử lý cấu tạo từ 24 giếng sinh sản chứa một ấu trùng của ECB/giếng. Các đĩa được giữ ở các điều kiện phòng thí nghiệm về nhiệt độ, việc chiếu sáng và độ ẩm tương đối. Để tránh thiên lệch, các ấu trùng được bố trí ngẫu nhiên vào các nhóm xử lý. Để làm mẫu đối chứng, các ấu trùng được tiếp xúc với khẩu phần của côn trùng mà không có chất thử (khẩu phần đơn lẻ); khẩu phần của côn

trùng được xử lý với cùng một nồng độ chất đệm sử dụng trong việc sử dụng nồng độ chất thử cao nhất đối với khẩu phần (100 µl của khoảng 0,6 µM 50 mM NH_4HCO_3, pH 9,25, chất đệm/100ml khẩu phần); và khẩu phần xử lý với dung dịch chất thử Cry1Ab bất hoạt nhiệt (30 phút ở 100°C) ở nồng độ tương đương với nồng độ chất thử cao nhất (372ng Cry1Ab/ml khẩu phần) sử dụng trong xét nghiệm sinh học. Sự xử lý protein bất hoạt nhiệt dùng để kiểm soát các tác dụng tiềm ẩn của protein bổ sung trong khẩu phần của côn trùng và các tạp chất (nghĩa là, các thành phần phi Cry1Ab) trong chất thử. Tỷ lệ chết được đánh giá trong khoảng 144 giờ.

Chương trình phân tích probit US EPA, phiên bản 1.5, US EPA, 1992 được sử dụng để xác định các giá trị LC50 và LC90; hơn nữa, phương trình hệ số góc để hồi qui quan hệ probit log - liều đã được sử dụng để xác định các giá trị LC30 và LC70 cùng với bảng probit phân bố chuẩn (Geigy Scientific Tables, Lentner, 1982). Các chương trình probit khác cũng có thể được sử dụng.

Đánh giá LC30, LC70 và LC90 đối với liều - phản ứng của CPB đối với mCry3A: Việc sử dụng chất thử mCry3A, LC30, LC70 và LC90 của mCry3A đối với CPB tuổi thứ nhất được xác định theo cùng một cách như cách đã được mô tả ở trên đối với ECB sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các dung dịch thử được chuẩn bị bởi việc hòa tan chất thử được đông khô nhanh trong nước MilliQ®. Một trăm µg của mỗi dung dịch pha loãng được bổ sung vào 100µg khẩu phần của CPB (BioServe, Inc., Frenchtown, New Jersey, USA) và được trộn kỹ. Khẩu phần của côn trùng CPB được chuẩn bị khi dùng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Mỗi giếng chứa 200µl khẩu phần của côn trùng với các nồng độ mCry3A nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5µg/ml khẩu phần. Để làm mẫu đối chứng, các ấu trùng được tiếp xúc với khẩu phần của côn trùng mà không có chất thử được bổ sung (khẩu phần đơn lẻ), khẩu phần của côn trùng xử lý với cùng một thể tích nước MilliQ được sử dụng trong việc sử dụng dung dịch chất thử đối với khẩu phần đơn lẻ, và khẩu phần xử lý với dung dịch protein mCry3A bất hoạt nhiệt từ chất thử (30 phút ở 100°C) ở nồng độ tương đương với nồng độ chất thử cao nhất (5µg mCry3A/ml khẩu phần) được sử dụng trong xét nghiệm sinh học. Tỷ lệ chết được đánh giá trong 96 giờ.

Đánh giá tác dụng của mCry3A lên độc tính của Cry1Ab: Tác dụng của mCry3A lên độc tính của Cry1Ab được đo bởi sự tiếp xúc ECB tuổi thứ nhất bằng LC30 (tương đương với 27ng Cry1Ab/ml khẩu phần) và LC70 (tương đương với 70ng

Cry1Ab/ml khẩu phần) của Cry1Ab và việc so sánh tỷ lệ chết khi có và không có mCry3A. Nồng độ mCry3A tương ứng với LC90 của CPB (tương đương với 2,4µg mCry3A/ml khẩu phần) được xác định như mô tả ở trên.

Xét nghiệm sinh học tương tác được thực hiện sử dụng cùng một cách và điều kiện nuôi mô tả ở trên, ngoại trừ việc các đĩa nuôi 24 giếng lặp ba được sử dụng cho mỗi xử lý. Mỗi đĩa xử lý chứa 24 ấu trùng, trong tổng 72 ấu trùng cho một xử lý. Để làm mẫu đối chứng, các ấu trùng được tiếp xúc với khẩu phần của côn trùng mà không có chất thử (khẩu phần đơn lẻ); khẩu phần của côn trùng xử lý với cùng một nồng độ chất đệm được sử dụng trong việc sử dụng nồng độ chất thử cao nhất đối với khẩu phần (100 µl của khoảng 0,6 µM 50 mM NH_4HCO_3, pH 9,25, chất đệm/100 ml khẩu phần); khẩu phần xử lý với dung dịch Cry1Ab bất hoạt nhiệt (30 phút ở 100°C) ở nồng độ tương đương với nồng độ Cry1Ab cao nhất (372ng cry1Ab/ml khẩu phần) được sử dụng trong xét nghiệm sinh học; và mCry3A được định lượng ở 2,4µg/ml khẩu phần, tương ứng với LC90 của mCry3A kháng CPB. Khẩu phần của CPB xử lý với LC70 (tương đương với 1,4µg mCry3A/ml khẩu phần) của mCry3A kháng CPB được sử dụng làm sự kiểm soát dương tính cạnh tranh để khẳng định hoạt tính diệt côn trùng của mCry3A. Tỷ lệ chết được đánh giá sau khoảng 144 và 168 giờ. Toàn bộ xét nghiệm sinh học tương tác với ECB được thực hiện hai lần.

Đánh giá tác dụng của Cry1Ab lên độc tính của mCry3A: Tác dụng của Cry1Ab lên độc tính của mCry3A được đo bởi sự tiếp xúc CPB tuổi thứ nhất bằng các nồng độ LC30 (tương đương 0,62µg mCry3A/ml khẩu phần) và LC70 (tương đương 1,35µg mCry3A/ml khẩu phần) của mCry3A và việc so sánh tỷ lệ chết khi có và không có Cry1Ab. Nồng độ của Cry1Ab là LC90 của ECB (tương đương với 142ng Cry1Ab/ml khẩu phần). Số các xử lý lặp lại và sự phân tích các số liệu tỷ lệ chết của CPB giống như mô tả ở trên.

Các xét nghiệm sinh học tương tác được thực hiện khi dùng cùng một cách và điều kiện nuôi mô tả ở trên, ngoại trừ việc các đĩa nuôi 24 giếng lặp ba được sử dụng cho mỗi xử lý. Mỗi đĩa xử lý chứa 24 ấu trùng, trong tổng 72 ấu trùng cho một xử lý. Để làm mẫu đối chứng, các ấu trùng được tiếp xúc với khẩu phần của côn trùng mà không có chất thử (khẩu phần đơn lẻ); khẩu phần của côn trùng xử lý với cùng một thể tích nước MilliQ được sử dụng trong việc sử dụng dung dịch chất thử vào khẩu phần đơn lẻ, khẩu phần xử lý với dung dịch Cry1Ab bất hoạt nhiệt (30 phút ở 100°C) ở

nồng độ tương đương với nồng độ mCry3A cao nhất (5µg mCry3A/ml khẩu phần) được sử dụng trong xét nghiệm sinh học, và Cry1Ab được định lượng ở 142ng/ml khẩu phần tương ứng với LC90 của Cry1Ab kháng ECB. Khẩu phần của ECB xử lý với nồng độ LC70 (tương đương với 70ng Cry1Ab/ml khẩu phần) của Cry1Ab kháng ECB được sử dụng làm sự kiểm soát dương tính cạnh tranh để khẳng định hoạt tính diệt côn trùng của Cry1Ab được sử dụng trong xét nghiệm sinh học tái tổ hợp. Tỷ lệ chết được đánh giá sau khoảng 72 và 96 giờ. Toàn bộ xét nghiệm sinh học tương tác với ECB được thực hiện hai lần.

Các phương pháp thống kê: trong mỗi khảo sát, một số tiêu chuẩn đã được đáp ứng đối vói dạng thực nghiệm và các phân tích số liệu được mô tả dưới đây là các phép thử hợp lệ và có hiệu quả đối với tương tác giữa các protein: (1) không có tác dụng của chất đệm được sử dụng để hòa tan các protein; (2) không có tác dụng của bản thân sự bổ sung protein; hoặc (3) "phi độc tố" là không độc đối với loài xét nghiệm sinh học không nhạy cảm ở các nồng độ được sử dụng trong thí nghiệm này. Đối với cả hai thí nghiệm của ECB và CPB, các tiêu chuẩn này được đáp ứng.

Một khi tỷ lệ chết được quan sát thấy trong các xét nghiệm sinh học, tỷ lệ chết được ghi lại mỗi ngày cho đến khi có tỷ lệ chết khoảng 30% trong xử lý LC30 và tỷ lệ chết 70% trong xử lý LC70. Số liệu từ mỗi lần lấy mẫu trong mỗi nghiên cứu tương tác protein được phân tích riêng rẽ. Ở mỗi lần lấy mẫu, các phân tích riêng rẽ được thực hiện đối với mỗi xét nghiệm riêng lẻ và đối với số liệu tổ hợp từ cả hai xét nghiệm.

Ở mỗi lần lấy mẫu trong mỗi xét nghiệm sinh học, sự phản ứng được phân tích là tỷ lệ biến đổi căn bậc hai acsin của các ấu trùng chết cho mỗi lần lặp. Các tác dụng của các xử lý khác nhau được thử bởi ANOVA. Đối với cả hai thí nghiệm (ECB và CPB), hai xét nghiệm được phân tích riêng rẽ và được tổ hợp (nếu hợp lệ). Giả định quyết định của ANOVA là có tính đồng nhất của các biến trạng giữa các xử lý và các chất dư được phân bố chuẩn. Điều này khó có thực nếu các xử lý kiểm soát âm tính được bao gồm, khi tỷ lệ các ấu trùng chết là không trong nhiều lặp lại. Đây là vấn đề cụ thể đối với ANOVA của các số liệu biến đổi của căn bậc hai acsin. Vì vậy các số liệu kiểm soát âm tính bị loại trừ khỏi sự phân tích, vì sự có giá trị của các giả định của phương pháp của chúng là rõ ràng mà không cần phân tích thống kê. Đối với các xét nghiệm được phân tích riêng rẽ, ANOVA có tác dụng xử lý được thực hiện. Sự thử

Levene (SAS, 2002-2003) được sử dụng để kiểm tra giả định tính đồng nhất của các biến trạng trong mỗi xử lý trong số bốn xử lý và sự thử Shapiro-Wilks (SAS, 2002-2003) được sử dụng để kiểm tra giả định của các chất dư được phân bố chuẩn. Đối với phân tích các xét nghiệm tổ hợp, ANOVA có các tác dụng đối với xét nghiệm và xử lý được thực hiện. Sự thử Shapiro-Wilks được sử dụng để kiểm tra giả định về các chất dư được phân bố chuẩn. Không sự thử chính thức nào về giả định đồng nhất của các biến trạng được thực hiện, vì sự thử Levene không thể được áp dụng nếu có nhiều hơn một tác dụng trong phân tích sự thay đổi (SAS, 2002-2003). Tuy nhiên, sự so sánh bằng mắt các điểm của các số liệu biến đổi căn bậc hai của acsin được sử dụng để khẳng định là tính đồng nhất của sự giả định thay đổi có giá trị đối với các số liệu tổ hợp.

Cấu trúc yếu tố của các xử lý cho phép ba tác dụng được khảo sát: (1) tác dụng chính của protein độc (nồng độ của độc tố có tác động đến phản ứng không ?); (2) tác dụng chính của protein không độc (sự có mặt của phi độc tố có tác động đến phản ứng không ?) và (3) sự tương tác giữa nồng độ của độc tố và sự có mặt của phi độc tố (tác dụng của phi độc tố có phụ thuộc vào nồng độ của độc tố không, và tác dụng của nồng độ độc tố có phụ thuộc vào sự có mặt của phi độc tố không ?)

Các tác dụng được khảo sát bởi việc thiết lập các tương phản xử lý tập trung vào một tác dụng trong khi loại bỏ các tác dụng khác. Điều này đạt được bởi việc kiểm tra các tổ hợp thích hợp của các cách xử lý (sự tổ hợp các cách xử lý được biết là sự tương phản). Mỗi tương phản là tổng các hệ số tương phản riêng được nhân lên bởi các cách xử lý kèm theo. Mức tin cậy thống kê của mỗi tương phản có thể được đánh giá bằng giả định không thích hợp. Các giả định không đối với ba thuật ngữ như sau: (1) H_o: phản ứng ở các nồng độ thấp và cao của protein độc là giống nhau; (2) H_o: phản ứng là giống nhau với có hoặc không có protein không độc; và (3) H_o: các tác dụng bất kỳ của các protein độc và không độc tác độc độc lập với mỗi tác dụng khác.

Mỗi tương phản được đánh giá ở tỷ lệ sai số loại I 5% sử dụng đánh giá sai số từ ANOVA. Các sự thử tương phản xử lý 2 ở đó có sự hiệp đồng (hoặc đối kháng) giữa hai protein. Vì vậy nếu giả định không cho tương phản 2 bị loại bỏ sau khi các số liệu cung cấp bằng chứng hiệp đồng (hoặc đối kháng). Sự kiểm tra tiếp dấu hiệu của các tương phản đáng kể bất kỳ xác định hoặc có sự hiệp đồng hoặc đối kháng (ví dụ,

giá trị tương phản 2 dương ám chỉ tỷ lệ chết lớn hơn khi có protein không độc, vì vậy có sự hiệp đồng).

Các giá trị trung bình và các độ lệch tiêu chuẩn của các xét nghiệm sinh học tổ hợp được tính khi dùng Microsoft Excel®.

Kết quả

Đánh giá LC30, LC70 và LC90 đối với Cry1Ab kháng ECB: sự đánh giá hoạt tính sinh học đối với Cry1Ab kháng các ấu trùng sâu đục thân ngô châu Âu thể hiện LC30 của khoảng 27, LC70 của khoảng 70 và LC90 của khoảng 142ng Cry1Ab/ml khẩu phần sau 144 giờ. Các khẩu phần kiểm soát âm tính chỉ thể hiện tỷ lệ chết thấp, là 8% đối với xử lý khẩu phần đơn lẻ, 4% đối với khẩu phần xử lý chất đệm, và 4% đối với khẩu phần xử lý với Cry1Ab bất hoạt.

Đánh giá LC30, LC70 và LC90 đối với mCry3A kháng CPB: sự đánh giá hoạt tính sinh học đối với mCry3A kháng các ấu trùng bọ cánh cứng Colorado thể hiện LC30 của khoảng 0,6, LC70 của khoảng 1,4 và LC90 của khoảng 2,4µg mCry3A/ml khẩu phần sau 96 giờ. Các khẩu phần kiểm soát âm tính thể hiện không hoặc chỉ tỷ lệ chết thấp là 0% đối với xử lý khẩu phần đơn lẻ, 8% đối với khẩu phần xử lý nước, và 4% đối với khẩu phần xử lý với mCry3A bất hoạt.

Đánh giá tác dụng của mCry3A lên độc tính của Cry1Ab: Có tỷ lệ chết trung bình thấp (7% hoặc thấp hơn) trên khẩu phần đơn lẻ, trên khẩu phần xử lý chất đệm, trên khẩu phần xử lý Cry1Ab bất hoạt nhiệt và khẩu phần xử lý với mCry3A ở LC90 của CPB (khẩu phần 2,4µg mCry3A/ml) sau 168 giờ. Hơn nữa, có sự khác nhau rõ ràng giữa các khẩu phần xử lý độc tố và các khẩu phần kiểm soát âm tính. Vì vậy, một số điều kiện cần thiết cho dạng thí nghiệm hợp thức được chứng minh.

Đối với cả hai xét nghiệm sau 144 giờ, các tỷ lệ chết trong các xử lý LC30 và LC70 (cả hai có và không có mCry3A) lần lượt thấp đáng kể theo thống kê 30% và 70%. Vì vậy, các xét nghiệm được tiếp tục để đến được các điểm cuối của độc tính cần thiết của thí nghiệm. Sau 168 giờ, các điểm cuối (tức là, lần lượt tỷ lệ chết 30% và 70% trong các xử lý LC30 của một mình Cry1Ab và LC70 của một mình Cry1Ab) đã đạt được. Các số liệu ở 144 giờ được coi là có khả năng phát hiện các tác dụng của mCry3A lên Cry1Ab.

Các kết quả của số liệu tổ hợp chứng minh là các tác dụng của nồng độ Cry1Ab và sự có mặt của mCry3A là độc lập ở 144 giờ và 168 giờ ($p>0,05$) kháng sâu đục thân ngô châu Âu. Vì vậy, tác dụng của nồng độ Cry1Ab có thể được thử bởi phân tích liên kết các số liệu có và không có mCry3A. Tương tự, tác dụng của mCry3A có thể được thử bởi phân tích liên kết các số liệu LC30 và LC70.

Đối với các số liệu tổ hợp, có tác dụng đáng kể theo thống kê của nồng độ của Cry1Ab ($p<0,05$). Ở 144 giờ và ở 168 giờ, tác dụng của nồng độ Cry1Ab là đáng kể theo thống kê đối với các số liệu tổ hợp. Các số liệu này chỉ báo là ECB phản ứng như được trông đợi đối với các nồng độ Cry1Ab khác nhau.

Đối với các số liệu tổ hợp, không tác dụng đáng kể theo thống kê nào của mCry3A lên độc tính của Cry1Ab được phát hiện ở 144 giờ hoặc ở 168 giờ ($p>0,05$). Do không tác dụng nào của một mình mCry3A lên ECB được phát hiện trong nghiên cứu này, các kết quả không cung cấp bằng chứng về sự tương tác giữa Cry1Ab và mCry3A trong việc diệt hoặc kiểm soát sâu đục thân ngô châu Âu.

Đánh giá tác dụng của Cry1Ab lên độc tính của mCry3A: Đối với các xét nghiệm của CPB có tỷ lệ chết trung bình thấp (4% hoặc thấp hơn) trên khẩu phần đơn lẻ, trên khẩu phần xử lý nước, trên khẩu phần xử lý Cry1Ab bất hoạt nhiệt và khẩu phần xử lý với Cry1Ab ở LC90 của ECB (142ng Cry1Ab/ml khẩu phần) sau 96 giờ. Hơn nữa, có sự khác nhau rõ ràng giữa các khẩu phần xử lý độc tố và các khẩu phần kiểm soát âm tính. Vì vậy, một số điều kiện cần thiết cho dạng thí nghiệm hợp thức được chứng minh.

Đối với cả hai xét nghiệm sinh học của CPB, sau 72 giờ một số tỷ lệ chết được quan sát; tuy nhiên, các tỷ lệ chết trong các xử lý LC30 và LC70 lần lượt thấp đáng kể theo thống kê 30% và 70% đối với ít nhất một xét nghiệm sinh học. Vì vậy các xét nghiệm được tiếp tục để đến được các điểm cuối của tỷ lệ chết cần thiết của thí nghiệm. Sau 96 giờ, các điểm cuối (nghĩa là, lần lượt tỷ lệ chết 30% và 70% đối với LC30 của một mình mCry3A và LC70 của một mình mCry3A) đã đạt được. Các số liệu ở 72 giờ được coi là có khả năng phát hiện các tác dụng của mCry3A lên Cry1Ab. Đối với các xét nghiệm riêng rẽ và các số liệu tổ hợp, các tiêu chuẩn độ chuẩn và độ đồng đều của sự thay đổi được gặp ở cả hai 72 giờ và 96 giờ.

Đối với các số liệu tổ hợp, các tác dụng của nồng độ mCry3A và sự có mặt của Cry1Ab là độc lập ở 72 giờ và 96 giờ ($p>0,05$). Vì vậy tác dụng của nồng độ mCry3A có thể được thử bởi sự phân tích liên kết các số liệu có và không có Cry1Ab. Tương tự, tác dụng của Cry1Ab có thể được thử bởi phân tích liên kết các số liệu LC30 và LC70.

Đối với các số liệu tổ hợp, có tác dụng đáng kể theo thống kê của nồng độ mCry3A ở 72 giờ và 96 giờ ($p<0,05$). Các số liệu này chỉ báo CPB phản ứng như được trông đợi đối với các nồng độ khác nhau của mCry3A.

Đối với các số liệu tổ hợp, không tác dụng đáng kể theo thống kê nào của Cry1Ab lên độc tính của mCry3A được phát hiện ở 96 giờ ($p>0,05$). Tuy nhiên, đối với các số liệu tổ hợp ở 72 giờ tác dụng đáng kể theo thống kê của Cry1Ab được phát hiện ($p<0,05$). Vì vậy, sự tương tác giữa mCry3A và Cry1Ab được chỉ báo ở 72 giờ đối với các số liệu tổ hợp. Tỷ lệ chết cao hơn với sự có mặt của Cry1Ab chỉ báo tác dụng là sự hiệp đồng (như được định nghĩa bởi Tabashnik, 1992) hoặc sự tăng cường hiệu lực (như được định nghĩa bởi Haghdoost *và các cộng sự*, 1997). Vì vậy, Cry1Ab tăng cường hiệu lực hoặc hiệp đồng với hoạt tính của mCry3A làm cho mCry3A hoạt động nhanh hơn chống lại các côn trùng cánh cứng đích so với có thể được trông đợi với một mình mCry3A. Trên phạm vi thương mại, sự diệt nhanh hơn chuyển thành sự thiệt hại cây ít hơn và ít cơ hội hơn để các loài gây hại là côn trùng cánh cứng phát triển tính kháng thuốc.

Ví dụ 2. Sự tương tác giữa các độc tố kháng sâu hại rễ ngô

Ví dụ này khảo sát có hay không sự tương tác, về hoạt tính trừ côn trùng, giữa hỗn hợp protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy bao gồm Cry1Ab và Vip3Aa20 ("chế phẩm Lep"), và hỗn hợp protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng bao gồm mCry3A ("chế phẩm Col").

Các tác dụng của chế phẩm Lep lên sâu đục thân ngô châu Âu (*Ostrinia nubilalis*; ECB) là loài gây hại nhạy cảm được khảo sát với sự có hoặc không có chế phẩm Col. Các ấu trùng tuổi thứ nhất được sử dụng để thực hiện xét nghiệm sinh học đồng hóa khẩu phần của ECB. Phần trăm tỷ lệ chết của ECB được đánh giá ở 120 giờ sau khi nhiễm trùng. Đường cong liều - phản ứng của ECB với tám nồng độ của chế phẩm Lep được thiết lập trước tiên. Hai liều, liều ECB 1 và liều ECB 2, của chế phẩm

Lep cho mức độ trung gian của phản ứng được chọn từ đường cong liều - phản ứng để thực hiện xét nghiệm sinh học tương tác protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy và có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng. Liều ECB 1 bao gồm khoảng 25ng Cry1Ab và khoảng 12,5ng Vip3Aa20 trên ml khẩu phần và liều ECB 2 bao gồm khoảng 50ng Cry1Ab và khoảng 25ng Vip3Aa20 trên ml khẩu phần. Vì vậy, liều ECB 2 có khoảng gấp 2 lần lượng protein Cry1Ab và VipAa20 so với liều ECB 1.

Các kết quả của xét nghiệm sinh học của ECB được thể hiện trên bảng 1. Không có sự tăng đáng kể theo thống kê nào về phần trăm tỷ lệ chết của ECB được phát hiện khi có liều WCR 2 của chế phẩm Col, chỉ báo không có sự tương tác nào giữa chế phẩm Col bao gồm mCry3A và chế phẩm Lep bao gồm Cry1Ab + Vip3Aa20 dự vào xét nghiệm sinh học của ECB.

Bảng 1. Các kết quả xét nghiệm sinh học của ECB

Xử lý	Phần trăm tỷ lệ chết của ECB
Liều ECB 1	21
Liều ECB 1 + Liều WCR 2	22
Liều ECB 2	36
Liều ECB 2 + Liều WCR 2	40
Liều WCR 2	4
Chất đệm Lep (kiểm tra âm tính)	1
Chất đệm Lep + Col (kiểm tra âm tính)	4

Các tác dụng của chế phẩm Col lên sâu hại rễ ngô miền Tây (WCR, *Diabrotica virgifera*) là loài gây hại nhạy cảm được khảo sát với sự có hoặc không có chế phẩm Lep. Các ấu trùng tuổi thứ nhất được sử dụng để thực hiện xét nghiệm sinh học đồng hóa khẩu phần của WCR. Phần trăm tỷ lệ chết của WCR được đánh giá ở 120 giờ sau khi nhiễm trùng. Đường cong liều - phản ứng của WCR với tám nồng độ của chế phẩm Col được thiết lập trước tiên. Hai liều, liều WCR 1 và liều WCR 2, của chế phẩm Col cho mức độ trung gian của phản ứng được chọn từ đường cong liều - phản ứng để thực hiện xét nghiệm sinh học tương tác của chế phẩm Lep và chế phẩm Col. Liều WCR 1 bao gồm khoảng 50µg mCry3A trên ml khẩu phần và liều WCR 2 bao

gồm khoảng 200µg mCry3A trên ml khẩu phần. Vì vậy, liều WCR 2 có khoảng gấp 4 lần lượng protein mCry3A so với liều WCR 1.

Các kết quả xét nghiệm sinh học của WCR được thể hiện trên bảng 2. Các kết quả chỉ báo phần trăm tỷ lệ chết của WCR cao hơn khi có liều 2 của chế phẩm Lep bao gồm Cry1Ab + Vip3Aa20, chỉ báo sự phối hợp của chế phẩm Lep và chế phẩm Col diệt WCR ở mức độ cao hơn so với có thể được trông đợi bởi chính chế phẩm Col.

Bảng 2. Các kết quả xét nghiệm sinh học của WCR

Xử lý	Phần trăm tỷ lệ chết của WCR
Liều WCR 1	17
Liều WCR 1 + Liều ECB 2	46
Liều WCR 2	48
Liều WCR 2 + Liều ECB 2	65
Liều ECB 2	1
Chất đệm Col (kiểm tra âm tính)	1
Chất đệm Col + Lep (kiểm tra âm tính)	1

Cần hiểu rằng các ví dụ và các phương án được mô tả ở đây chỉ nhằm mục đích minh họa và các sửa đổi khác nhau hoặc các thay đổi một chút của chúng về mô tả sẽ xảy đến với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được bao gồm trong ý tưởng và phạm vi của đơn sáng chế này và phạm vi của các yêu cầu bảo hộ đính kèm.

Tất cả các công bố và các đơn sáng chế được nêu trong bản mô tả này biểu thị trình độ của những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này mà sáng chế này liên quan.

Tài liệu tham khảo

Haghdoost, N.R., Newman, L.M. and Johnson, E.M. (1997) Multiple chemical exposures: synergism vs. individual exposure levels. *Reproductive Toxicology* **11:** 9-27.

MacIntosh, S.C., Stone, T.B., Sims, S.R., Hunst, P.L., Greenplate, J.T., Marrone, P.G., Perlak, FJ., Fischoff, D.A. and Fuchs, R.L. (1990) Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 56: 258-266.

SAS Software, Version 9.1 of the SAS System for Windows. Copyright (C) 2002-2003 SAS Institute Inc. SAS and all other SAS Institute Inc. product or service names are registered trademarks of SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.

Tabashnik, B. (1992) Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3343-3346.

Tajima, 0., Schoen, E.D., Feron, VJ. and Groten, J.P. (2002) Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food and Chemical Toxicology* 40: 685-695.

US EPA (1992) EPA Probit Analysis Program version 1.5. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng bao gồm việc sử dụng cho loài gây hại là côn trùng cánh cứng hoặc môi trường của nó chế phẩm bao gồm ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và ít nhất một protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy, trong đó chế phẩm này kiểm soát loài gây hại là côn trùng cánh cứng đến mức độ tốt hơn mong đợi bởi một mình protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng riêng bất kỳ được bao gồm trong đó, trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng là protein Cry3A cải biến và trong đó protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy là protein Cry1Ab.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó loài gây hại là côn trùng cánh cứng là bọ cánh cứng hại khoai tây Colorado hoặc sâu hại rễ ngô.

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó sâu hại rễ ngô được chọn từ nhóm bao gồm sâu hại rễ ngô miền Tây, sâu hại rễ ngô miền Bắc, sâu hại rễ ngô miền Nam và sâu hại rễ ngô Mexico.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm là cây chuyển gen biểu hiện protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh cứng và protein có hoạt tính đối với côn trùng cánh vảy.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó cây chuyển gen là cây ngô chuyển gen.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó cây ngô chuyển gen là chồng nhân giống bao gồm các bộ phận MIR604 và Bt11 của ngô chuyển gen.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cây ngô chuyển gen còn bao gồm bộ phận MIR162 của ngô chuyển gen.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 đến 7, trong đó côn trùng cánh cứng là loài gây hại là sâu hại rễ ngô, và trong đó phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho loài gây hại là sâu hại rễ ngô hoặc môi trường của nó chế phẩm bao gồm protein Cry3A cải biến (mCry3A) và protein Cry1Ab, trong đó chế phẩm này kiểm soát loài gây hại là sâu hại rễ ngô đến mức độ tốt hơn mong đợi bởi một mình protein mCry3A.