(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392774 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.11

(22) Дата подачи заявки
2022.04.08

(51) Int. Cl. ***A01G 13/00*** (2006.01)
A01N 63/00 (2020.01)
A01N 65/00 (2009.01)

(54) ПОДАВЛЕНИЕ НЕМАТОД

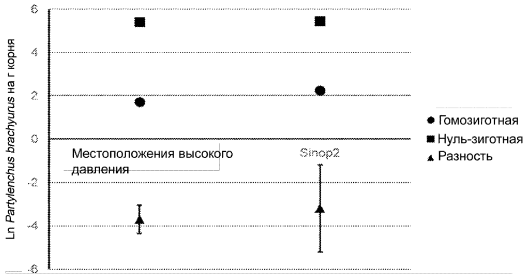
(31) **63/174,191**
(32) **2021.04.13**
(33) **US**
(86) **PCT/US2022/024113**
(87) **WO 2022/221146 2022.10.20**

(71) Заявитель:
БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСИ (US)

(72) Изобретатель:
Маккарвилл Майкл, Даум Джулия, Сараива Родриго Морейра (US)

(74) Представитель:
Беляева Е.Н. (BY)

(57) Изобретение относится к способам подавления нематоды. Также предложены способы повышения урожайности восприимчивого к нематодам растения.



202392774 A1

202392774 A1

ПОДАВЛЕНИЕ НЕМАТОД

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество в соответствии с § 1.19(e) раздела 35 Свода законов США по предварительной заявке на патент США № 63/174,191, поданной 13 апреля 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее описание относится к способам подавления нематоды. Также предложены способы повышения урожайности восприимчивого к нематодам растения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ НА МАТЕРИАЛ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

[0003] Настоящая заявка содержит в качестве отдельной части описания перечень последовательностей в машиночитаемой форме, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки и идентифицируется следующим образом: Имя файла: 202662_Seqlisting.txt; Размер 15 423 байта; Создан: 21 марта 2022 г.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Нематоды представляют собой активные, гибкие, удлиненные организмы, живущие на влажных поверхностях или в жидких средах, включая пленки воды в почве и влажные ткани внутри других организмов. Многие виды нематод превратились в весьма успешных паразитов растений и животных и ответственны за значительные экономические потери в сельском хозяйстве и животноводстве, а также за заболеваемость и смертность людей (Whitehead (1998) Plant Nematode Control. CAB International, New York).

[0005] По оценкам, паразитические нематоды обходятся садоводству и сельскому хозяйству во всем мире в более чем 78 миллиардов долларов в год, исходя из предполагаемых средних ежегодных потерь в 12%, распределенных по всем основным сельскохозяйственным культурам. Например, по оценкам, нематоды вызывают потери сои на сумму около 3,2 миллиарда долларов ежегодно во всем мире (Barker et al. (1994) Plant and Soil Nematodes: Societal Impact and Focus for the Future. The Committee on National Needs and Priorities in Nematology.

Cooperative State Research Service, US Department of Agriculture and Society of Nematologists). Нематоды, паразитирующие на растениях, являются вредителями всех основных пищевых продуктов во всем мире, включая кукурузу, ячмень, сорго, овес, рожь, рис, картофель, маниоку, батат, пшеницу, сою, рапс и подсолнечник (Nicol et al. (2011), помимо того, что они являются значимыми вредителями фруктовых и овощных культур, лубяных культур (например, хлопка), декоративных растений и дерновой травы (Current Nematode Threats to World Agriculture. In: J. Jones et al. (eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions, Springer Science+Business Media B. V. 2011).

[0006] Известно, что нематоды влияют на урожайность, рост и жизнеспособность сельскохозяйственных культур и растений. Физиологические изменения в корнях растения-хозяина, вызванные личинками и/или взрослыми нематодами, могут привести к образованию галлов, что вызывает нарушение сосудистой системы корней растения. Удлинение корней может полностью прекратиться, что может привести к недостаточному снабжению водой и питательными веществами, обеспечиваемыми уменьшенной корневой системой, что приводит к хлорозу и/или увяданию, а также к задержке роста, любое из которых может привести к низкой урожайности или гибели. Кроме того, нематоды могут вызывать физиологические эффекты, приводящие к увеличению восприимчивости корней растений к воздействию бактерий и/или грибов, включая бактерии и/или грибы, к которым в противном случае растение могло бы быть устойчивым. Такое воздействие может привести к обширному вторичному разложению и гниению.

[0007] Корневая ранящая нематода *Pratylenchus brachyurus* становится все более важным патогеном сои. Она имеет широкий спектр хозяев и широко распространена в тропических и субтропических регионах, особенно в Бразилии, Африке и на юге Соединенных Штатов Америки. *Pratylenchus brachyurus* стала проблемой среди производителей хлопка и сои в регионе Серрадо в Бразилии и считается основным нематодным патогеном сои в данном регионе. Эта нематода может снижать урожайность сои на 30–50%, причем на песчаных почвах наблюдается более значительный ущерб.

[0008] Для борьбы с нематодами можно применять несколько способов, охватывающих сельскохозяйственный, биологический и химический контроль. Устойчивость растения-хозяина, форма сельскохозяйственного контроля,

неизменно остается наиболее эффективным и экономически выгодным способом борьбы. Однако устойчивость растения-хозяина недоступна для многих видов нематод, особенно для мигрирующих паразитов, таких как *Pratylenchus brachyurus*. Устойчивость растения-хозяина также может быть ограничена при его внедрении, если наследование является сложным (т. е. задействовано несколько генов), также придаются отрицательные сельскохозяйственные свойства или существуют биотипы вредителей, способные преодолеть устойчивость. Другие тактики сельскохозяйственного контроля включают в себя карантин растений, севооборот и обработку почвы. Карантин растений ограничивает ввоз и перемещение частей растений, которые могут содержать или способствовать увеличению количества инвазивных видов вредителей. Карантин растений может не допустить проникновения нематод в страну или регион, но если вид нематод широко распространен в стране или регионе, например *P. brachyurus* в Бразилии, такой карантин становится нецелесообразным.

[0009] Севооборот представляет собой практику изменения выращивания нескольких культур в зависимости от сезона в одном месте произрастания. Севообороты представляют собой эффективную стратегию борьбы с нематодами-вредителями с ограниченным диапазоном хозяев. Диапазон хозяев нематоды определяется как растения, которые могут поддерживать выживание и размножение видов нематод. Многие мигрирующие вредители, такие как *P. brachyurus*, имеют особенно широкие диапазоны хозяев, что делает непрактичным совооборот с переходом на нехозяев. В случае *P. brachyurus* в Бразилии приемлемыми хозяевами являются все основные экономические культуры, которые чередуются с соей. Лишь ограниченное количество покровных культур, таких как *Crotalaria spectabilis* и *Crotalaria ochroleuca*, не являются хозяевами. Однако эти покровные культуры не обеспечивают урожая товарного зерна или корма и, следовательно, представляют собой затраты на посадку без экономической отдачи. оставление поля под паром на сезон представляет собой еще одну стратегию, аналогичную посадке покровных культур, не являющихся хозяевами. Хотя оставление поля под паром исключает затраты на посадку покровной культуры, оно представляет собой неотъемлемый риск потенциальных неблагоприятных экологических последствий, таких как эрозия почвы. Большинство нематод также могут находиться в состоянии покоя, что позволяет им длительное время выживать на полях под паром до тех пор, пока не будет

посажен приемлемый хозяин. В случае *P. brachyurus* выживаемость может сохраняться более 90 дней в отсутствие растения-хозяина (Ribeiro et al., Heliyon 6: e05075, 2020). Наконец, обработка почвы представляет собой потенциальную тактику борьбы с нематодами, но она недоступна для тех фермеров, которые осуществляют на практике сельское хозяйстве с нулевой обработкой почвы по причинам жизнеспособности почвы. Обработка почвы представляет собой подготовку почвы к посеву путем физического воздействия. Большую часть акров под соей в регионе Серрадо в Бразилии обрабатывают по технологии нулевой обработки почвы (т. е. механическая обработка почвы не производится в течение вегетационного сезона или между сезонами сбора урожая). Обработка почвы также может оказывать противоположное воздействие на разные виды нематод. *Heterodera glycines* (соевая цистообразующая нематода) и *P. brachyurus* одновременно встречаются на многих полях региона Серрадо. Обработка почвы может усилить частоту встречаемости (Workneh et al., Phytopathology 89: 844–850, 1999), распространение (Gavassoni et al., Phytopathology 91: 534–545, 2001) и ущерб со стороны *H. glycines*, в то время как для снижения численности популяций *Pratylenchus* spp. необходимы два-три цикла глубокой обработки почвы в некоторых производственных системах (Khan et al., (2021) Emerging Important Nematode Problems in Field Crops and Their Management. In: Singh K.P., Jahagirdar S., Sarma B.K. (eds) Emerging Trends in Plant Pathology. Springer, Singapore).

[0010] Биологическими мерами борьбы с нематодами нелегко манипулировать. Недавно были разработаны грибковые и бактериальные виды обработки семян с характеристиками подавления нематод. Как правило, эти виды обработки семян имеют несколько ограничений, включая дополнительную стоимость, умеренную эффективность, переменную эффективность в зависимости от окружающей среды и короткие периоды защиты, часто ограниченные ранней частью вегетационного сезона (Dias-Arieira et al., Journal of Phytopathology 166: 722-728, 2018).

[0011] Химические средства борьбы с нематодами, паразитирующими на растениях, по-прежнему очень необходимы для многих культур, которым не хватает надлежащей устойчивости растений-хозяев. Однако действие химических агентов зачастую не избирательно и может оказывать отрицательное воздействие на нецелевые организмы, в том числе временно нанося ущерб популяциям полезных микроорганизмов. В последние годы регистрация нескольких

химических нематицидов была отозвана, отменена или были наложены ограничения на их применение, что ограничило доступность бороздовых нематицидов (Fosu-Nyarko and Jones, In Advances in Botanical Research v73 doi: 10.1016/bs.abr.2014.12.012, 2015).

[0012] Таким образом, существует потребность в дополнительных средствах борьбы с популяциями нематод, которые причиняют вред и/или ущерб важным для сельского хозяйства растениям.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] В одном аспекте в настоящем документе описан способ подавления популяции нематод в местоположении, включающий выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и/или после выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления период времени охватывает один или более вегетационных сезонов, следующих за вегетационным сезоном, в течение которого выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают в себя выращивание вторичного растения в месте произрастания во время, следующее за выращиванием устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают в себя выращивание вторичного растения в месте произрастания во время до выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают в себя выращивание устойчивого к нематодам растения одновременно со вторичным растением в месте произрастания.

[0014] В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение или однолетнее растение. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение картофеля, растение пшеницы, овощное растение, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение

ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу. В некоторых вариантах осуществления популяцию нематод подавляют или поддерживают на уровне или ниже предела обнаружения. В дополнительных вариантах осуществления вторичное растение представляет собой брахиарию, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня. В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой кукурузу, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 300 нематод на грамм корня. В еще других вариантах осуществления вторичное растение представляет собой хлопок, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня. В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой сорго, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод в месте произрастания, в котором выращивают вторичное растение, достигается тогда, когда наблюдается, наблюдается примерно или наблюдается по меньшей мере примерно 5%-е снижение количества нематод на грамм корня по сравнению с количеством нематод на грамм корня в месте произрастания, сопоставимом с местом произрастания, в котором выращивают вторичное растение.

[0015] В другом аспекте в настоящем документе описан способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в первый вегетационный сезон подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания; выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в тот же или последующий вегетационный сезон; и достижение улучшенной жизнеспособности и/или урожайности восприимчивого к нематодам растения по сравнению с

жизнеспособностью и/или урожайностью, ожидаемыми, если бы популяция нематод не была подавлена.

[0016] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение экспрессирует белок Cry, например, без ограничения, нематицидный белок Cry. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, декоративное растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево) или виноградную лозу.

[0017] В некоторых вариантах осуществления нематода представляет собой вид нематод, выбранный из популяций нематод *Pratylenchus* spp., например *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., например *Heterodera glycines, Globodera* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus* spp., например *Helicotylenchus dihystera, Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua,* или *Aphelencoides besseyi*. В некоторых вариантах осуществления *Pratylenchus* spp представляет собой *Pratylenchus brachyurus*.

[0018] В некоторых вариантах осуществления улучшенная жизнеспособность восприимчивого к нематодам растения включает в себя одно или более из следующего: улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков); улучшенная урожайность; более быстрая всхожесть; улучшенное управление стрессом растений, включающее повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса; повышенная механическая прочность; повышенная устойчивость к засухе; сниженное заражение грибковой, бактериальной и/или вирусной инфекцией; или любая их комбинация.

[0019] Также предложены способы защиты восприимчивого к нематодам растения от ущерба или повреждения нематодами, включающие выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в один вегетационный сезон перед посадкой восприимчивого к нематодам растения; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в течение одного вегетационного сезона после выращивания

устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления защита восприимчивого к нематодам растения от повреждения нематодами включает увеличение урожая собранного восприимчивого к нематодам растительного материала или денежных средств, получаемых от продажи собранного восприимчивого к нематодам растительного материала.

[0020] Также предложены способы борьбы с нематодами в месте произрастания, причем способ включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания во время после выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой однолетнее растение.

[0021] В другом аспекте в настоящем описании предложены способы борьбы с нематодами в месте произрастания, причем способ включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания одновременно с восприимчивым к нематодам растением. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой однолетнее растение.

[0022] В другом аспекте в настоящем описании предложены способы борьбы с нематодами в месте произрастания, включающие посадку восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем восприимчивое к нематодам растение представляет собой однолетнее растение или многолетнее растение; и выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания одновременно с посадкой восприимчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение представляет собой овощное растение, плодовое растение, садовое растение, декоративное растение или виноградную лозу.

[0023] В другом аспекте в настоящем описании предложено место произрастания, имеющее плотность подавленной популяции нематод, причем плотность подавленной популяции нематод достигается способами, описанными в настоящем документе. Кроме того, предложены устойчивое к нематодам растение, выращенное в месте произрастания, растительный материал, собранный с

растения, и семена, полученные от этого растения, а также место произрастания, которое (i) не требует обработки почвы; (ii) не требует покровной культуры; или (iii) не обязательно должно находиться под паром один вегетационный сезон в год или за севооборот. В некоторых вариантах осуществления место произрастания обеспечивает одно или более из следующих преимуществ: a) место произрастания не обязательно должно находиться под паром один вегетационный сезон за цикл севооборота; b) место произрастания не обязательно должно быть обработано в один вегетационный сезон за цикл севооборота; и c) место произрастания не обязательно должно быть засажено покровной культурой. В некоторых вариантах осуществления плотность подавленной популяции нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20 или 10 нематод на грамм (г) корня.

[0024] Способы и системы, описанные в настоящем документе, обеспечивают преимущество и ценность в системе севооборота за счет (i) возможности более широкого применения места произрастания, для которого не требуется период под паром, обработка или выращивание покровной культуры в течение по меньшей мере одного вегетационного сезона в цикле севооборота с целью борьбы с нематодами и (ii) обеспечения более успешного применения места произрастания путем подавления популяции нематод в этом месте произрастания, что приводит к успешному росту и увеличению урожая восприимчивых к нематодам растений, имеющих собственную ценность. Также предложены восприимчивое к нематодам растение, выращенное в месте произрастания, растительный материал, собранный из восприимчивого к нематодам растения (например, хлопок-волокно и хлопковое волокно в случае хлопковых растений), и семена, продуцируемые восприимчивым к нематодам растением.

[0025] В другом аспекте в настоящем описании предложена система для более широкого применения места произрастания, причем система включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в последующий вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления каждое из устойчивого к нематодам растения и первого восприимчивого к нематодам растения представляет собой сельскохозяйственное растение, имеющее собственную ценность. В некоторых вариантах осуществления в течение последующего вегетационного сезона место произрастания не находится

под паром в течение вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления покровное растение или покровную культуру не выращивают в течение последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение, первое восприимчивое к нематодам растение и второе восприимчивое к нематодам растение выращивают в течение трех последовательных вегетационных сезонов. В некоторых вариантах осуществления каждое из устойчивого к нематодам растения, первого восприимчивого к нематодам растения и второго восприимчивого к нематодам растения представляет собой сельскохозяйственное растение, имеющее собственную ценность.

[0026] В еще одном аспекте в настоящем описании предложен способ улучшения системы севооборота, включающий выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что делает возможным или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в последующий вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления улучшенная система севооборота может дополнительно включать в себя одно или более из следующего:

a) применение места произрастания в течение по меньшей мере одного дополнительного вегетационного сезона в год;

b) сниженная обработка места произрастания;

c) сниженная обработка семян восприимчивых к нематодам культур нематицидами;

d) уменьшенная площадь обработки места произрастания нематицидами до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

e) сниженный уровень нематицида, наносимого на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

f) уменьшенное количество нанесений нематицид на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания в течение вегетационного сезона;

g) повышенная пригодность места произрастания;

h) повышенная ценность места произрастания;

i) улучшенные устойчивые методы ведения сельского хозяйства и/или

j) увеличенная урожайность восприимчивых к нематодам культур.

[0027] В другом аспекте в настоящем описании предложен способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение вегетационного сезона; и выращивание многолетнего растения в месте произрастания до, во время и/или после вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост многолетнего растения.

[0028] В некоторых аспектах в настоящем описании предложены способы сбыта системы севооборота, причем способ включает в себя: стимулирование применения устойчивого к нематодам растения в течение первого вегетационного сезона; и стимулирование применения восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивых к нематодам растений в последующий вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления последующий вегетационный сезон непосредственно примыкает к первому вегетационному сезону.

[0029] В дополнительных аспектах в настоящем описании предложены маркетинговые материалы, относящиеся к системе севооборота для выращивания устойчивого к нематодам растения в течение первого вегетационного сезона при взаимодействии с или с последующим выращиванием восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления маркетинговые материалы относятся к стимулированию системы севооборота.

[0030] В некоторых аспектах предложены способы борьбы с нематодами в месте произрастания, включающие: выращивание устойчивого к нематодам

растения в месте произрастания до, одновременно или после выращивания вторичной культуры в месте произрастания. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение экспрессирует нематицидный белок Cryl4Ab, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM5. В дополнительных вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM4. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию устойчивое к нематодам растение экспрессирует токсин Cry14Ab-1 *Bacillus thuringiensis*. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM5. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE- GM4.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0031] На Фиг. 1 представлен график, показывающий влияние сои GMB151 на плотности популяции *Pratylenchus brachyurus*. Плотность популяции *Pratylenchus brachyurus* оценивали для гомозиготных и нуль-зиготных линий сои GMB151 на трех предполагаемых участках с высоким давлением и в месте произрастания Sinop2, где плотности популяции *P. brachyurus* были выше, чем предполагалось. Трансгенный признак сои GMB151 значительно снизил популяции P. brachyurus. 95%-й доверительный интервал представлен планками погрешностей относительно предполагаемой разности между гомозиготными и нуль-зиготными линиями.

[0032] На Фиг. 2 представлен график, на котором показана разность урожайности сои между гомозиготной и нуль-зиготной линиями GMB151 на каждом из исследовательских участков. Исследовательские участки расположены в порядке убывания плотности популяции *Pratylenchus brachyurus*. Планки погрешностей предполагаемых различий урожайности представляют собой 95%-е доверительные интервалы. Признак GMB151 не повлиял на урожайность в трех местах произрастания с наименьшими плотностями популяции *P. brachyurus*. На трех участках с самыми высокими плотностями популяции *P. brachyurus* GMB151 значительно повысил урожайность сои в среднем на 7,0 буш./акр или 21%.

[0033] На Фиг. 3 представлена диаграмма полевых испытательных посадок, описанных в примере 3. Сою сажали в сезон сои сафра (летний или первый урожай). На одну обработку высаживали пять повторений в рандомизированном дизайне полного блока. Пробные сорта хлопка и кукурузы сафриньи (озимый или второй урожай) были посажены после сбора урожая сои. Пробные посевы сафриньи были посажены поверх испытательного участка сои, причем ряды культур сафриньи проходили перпендикулярно рядам собираемой сои сафриньи. Дизайны испытаний культур сафриньи также представляли собой рандомизированный дизайн полного блока, но только с тремя повторениями на культуру.

[0034] На Фиг. 4 представлен график, показывающий количество контроля *Pratylenchus brachyurus*, обеспечиваемого соей GMB151 в бразильском вегетационном сезоне 2019/20 г. на поле Рио-Верде, Гояс. Звездочки обозначают значительные разности при $P < 0,05$.

[0035] На Фиг. 5 представлен график, показывающий урожайность сои сафра и кукурузы сафринья за вегетационный сезон 2019/20 г. на поле Рио-Верде, Гояс, а также валовой доход.

[0036] На Фиг. 6 представлен график, показывающий контроль над *Pratylenchus brachyurus* (в виде количества *Pratylenchus brachyurus* на грамм корня в культурах сафриньи), обеспечиваемый соей GMB151 в бразильском вегетационном сезоне 2019/20 на всех полевых испытательных участках.

[0037] На Фиг. 7 представлен график, показывающий урожайность кукурузы и хлопка сафринья в вегетационном сезоне 2019/20 г. на всех полевых испытательных участках.

[0038] На Фиг. 8 представлена иллюстративная система севооборота.

[0039] На Фиг. 9 представлен график, показывающий влияние сои GMB151 на плотности популяции *Pratylenchus brachyurus*. Плотность популяции *Pratylenchus brachyurus* оценивали для гомозиготных и нуль-зиготных линий сои GMB151 на 49 испытательных участках. Трансгенный признак сои GMB151 значительно снизил популяции *P. brachyurus*. Среднеквадратичная погрешность среднего значения представлена планками погрешностей относительно среднего значения гомозиготных и нуль-зиготных линий.

[0040] На Фиг. 10 представлен график, показывающий разность урожайности сои между гомозиготными и нуль-зиготными линиями GMB151 на 48

испытательных участках, взятых для определения урожайности. Планки погрешностей отображают среднеквадратичную погрешность среднего значения обработки. Признак GMB151 значительно повысил урожайность сои на среднее значение 4,2 буш./акр или 9%.

[0041] На Фиг. 11 представлен график, показывающий альтернативные средства борьбы с нематодами и их влияние на плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* в культуре сои сафра. Виды обработки семян нематицидами и бороздовые нематициды наносили как на сою GMB151, так и на нуль-зиготную сою. Значительно больший контроль обеспечивался соей GMB151, чем обработкой семян или бороздовыми нематицидами.

[0042] На Фиг. 12 представлен график, показывающий эффективность тактики сельскохозяйственного контроля нематод при обработке почвы и ее влияние на плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* по сравнению с соевым объектом GMB151. Соя GMB151 обеспечила значительно больший контроль над *Pratylenchus brachyurus*, чем традиционная обработка почвы при посеве сои сафра.

[0043] На Фиг. 13 представлен график, показывающий контроль над *Pratylenchus brachyurus* (в виде количества *Pratylenchus brachyurus* на грамм корня в культурах сафриньи), обеспечиваемый соей GMB151 в полевых испытаниях культуры сафриньи.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0044] Нематоды, паразитирующие на растениях, способны поражать несколько видов культурных растений (определяемых в настоящем документе как «культуры» или «сельскохозяйственные культуры») в системе чередования культур или севооборота и со временем могут создавать большие плотности популяции. Культивируемые растения, которые рассматриваются фермерами как экономически выгодные («товарные культуры») или иным образом ценные или пригодные для фермера (например, корм для скота), и все из которых представляют собой культуры с «собственной ценностью», а также неприбыльные растения или культуры, выращиваемые исключительно для защиты поля от эрозии или для обеспечения других преимуществ жизнеспособности почвы («покровные культуры»), почти все они в большей или меньшей степени подвержены повреждению нематодами. Некоторые растения могут представлять собой либо культуру с собственной ценностью, либо неприбыльную культуру, в зависимости

от того, как они применяются. Одним из таких растений является брахиария, также известная как ветвянка. Ветвянку можно выращивать либо как пастбищную культуру (и, следовательно, как культуру с собственной ценностью), либо как неприбыльную покровную культуру, если ее применяют для выпаса скота. В частности, товарные культуры, такие как соя, хлопок, кукуруза, пшеница, сахарный тростник, картофель, сахарная свекла, рис, люцерна, ячмень, сорго, овес, рожь, маниока, батат, подсолнечник, овощи, фруктовые растения, фруктовые деревья, ореховые деревья, декоративные растения, виноградная лоза и рапс, в качестве неограничивающих примеров, восприимчивы к нематодам, а ущерб или повреждения, вызванные нематодами, могут значительно снизить урожайность, что приведет к снижению дохода фермера. Фермеры должны определить эффективные варианты управления для борьбы с ущербом и повреждением нематодами каждой культуры, которую они выращивают.

[0045] Кроме того, фермерам, возможно, придется скорректировать севооборот или последовательность культур, чтобы избежать выращивания нескольких восприимчивых культур в последовательные вегетационные сезоны. Эта проблема может оказаться сложной, когда фермеры сталкиваются с нематодами с широкими диапазонами хозяев, способными размножаться на многих сельскохозяйственных культурах. В худшем случае фермер может быть вынужден отказаться от посадки экономически выгодной товарной культуры в пользу посадки неприбыльной покровной культуры или, что еще хуже, оставить поле под паром из-за исключительно широкого диапазона хозяев некоторых нематод, включающих даже большинство покровных культур. Даже оставление поля под паром приносит фермеру лишь ограниченную пользу, поскольку большинство нематод могут выжить в течение длительного периода времени (>9 месяцев) без растения-хозяина. Нематода-вредитель может просто существовать в состоянии покоя, пока фермер не посадит восприимчивую культуру.

[0046] Фермеры дополнительно страдают от управления сельскохозяйственными проблемами, связанными с нематодами, учитывая, что такие проблемы необходимо решать в более широком контексте необходимости каждого фермера соблюдать другие требования, направленные на защиту окружающей среды в целом и решение экологических проблем, таких как эрозия почвы. В настоящее время существуют случаи, когда методы борьбы с нематодами и другие сельскохозяйственные методы и требования противоречат друг другу, что

ставит фермеров перед сложным выбором. Например, с *Pratylenchus* spp. можно бороться путем обработки почвы несколько раз в год. Однако обработка почвы может способствовать эрозии почвы, потере воды, потере органического углерода и в общем быть менее благоприятной для урожайности культур. Кроме того, даже в ситуациях, когда фермер может захотеть посадить неприбыльную покровную культуру для борьбы с нематодами, покровные культуры, ограничивающие размножение нематод, могут не быть теми же покровными культурами, которые принесли бы большую пользу для жизнеспособности почвы, например, увеличение количества органического углерода (Amorim et al., Journal of Agricultural Science 11: 333–340, 2019). Наибольшую пользу для фермера приносят методы борьбы с нематодами, включающие методы, которые подавляют или предотвращают увеличение популяции нематод в определенном месте произрастания, одновременно ограничивая вмешательство в рост сельскохозяйственных культур.

[0047] Настоящее описание основано на открытии того, что преимущества нематоцидной активности устойчивого к нематодам растения, выращенного в определенном месте произрастания (например, в поле или в месте произрастания), выходят за рамки периода времени, в течение которого выращивают устойчивое к нематодам растение. Выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания, причем подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод длится в течение периода время после выращивания устойчивого к нематодам растения. Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем описании предложены способы борьбы с нематодами в месте произрастания, причем способ включает: выращивание устойчивого к нематодам растения в поле до, одновременно или после выращивания вторичного растения в месте произрастания.

[0048] В некоторых вариантах осуществления преимущества нематоцидной активности устойчивого к нематодам растения, выращенного в месте произрастания (например, в поле или в месте произрастания) в первый вегетационный сезон, причем такая нематоцидная активность защищает устойчивое к нематодам растение от ущерба и повреждения нематодами, также распространяет защиту от нематод на любое другое растение (например, товарную культуру, которая включает или не включает устойчивые к нематодам растения)

путем простого выращивания другого растения в том же месте произрастания в том же или последующем вегетационном сезоне. Устойчивое к нематодам растение можно выращивать на регулярной основе (например, последовательные вегетационные сезоны, каждый второй вегетационный сезон, каждый третий вегетационный сезон, каждый четвертый вегетационный сезон, каждый пятый вегетационный сезон и т. д.), чтобы уменьшить или контролировать общую плотность популяции нематод в определенном месте произрастания. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают каждый вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в вегетационный сезон, который непосредственно примыкает к вегетационному сезону вторичного растения (например, восприимчивого к нематодам растения). Таким образом, устойчивое к нематодам растение не только защищает себя от поражения нематодами, но также защищает любое растение, включая восприимчивое к нематодам растение, которое выращивают в том же месте произрастания в то же время или в более позднее время.

[0049] В контексте настоящего документа термин «место произрастания» или «места произрастания» относится к месту (или местам), подходящему для выращивания растения. Иллюстративные места произрастания включают в себя, помимо прочего, горшок или другой контейнер, теплицу или другое изолированное место, поле, холм, любой участок земли, фруктовый сад, виноградник или другую среду, подходящую для выращивания растений.

[0050] В контексте настоящего документа термин «устойчивое к нематоде растение» относится к растению, которое экспрессирует нуклеиновую кислоту, которая приводит к нарушению движения, питания, развития, размножения или других функций нематоды, если нематода находится в контакте с растением. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение было обработано или получено из растения, которое было обработано с помощью метода молекулярной биологии для экспрессии такой нуклеиновой кислоты. Без ограничения, одним примером повреждения нематод является гибель нематоды при проглатывании части устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления устойчивые к нематодам растения включают, помимо прочего, растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля или

растение пшеницы. растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, декоративное растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево) или виноградную лозу.

[0051] В контексте настоящего документа термин «восприимчивое к нематодам растение» относится к растению, которое не экспрессирует нуклеиновую кислоту, что приводит к нарушению движения, питания, развития, размножения или других функций нематоды, если нематода находится в контакте с растением. Специалисту в данной области понятно, что любое растение может быть устойчивым к нематодам или восприимчивым к нематодам растением, в зависимости от того, экспрессирует ли растение нуклеиновую кислоту, которая приводит к нарушению движения, питания, развития, размножения или других функций нематоды, если нематода находится в контакте с растением. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение было обработано или получено из растения, которое было обработано с помощью метода молекулярной биологии для экспрессии такой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления восприимчивые к нематодам растения включают, помимо прочего, растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение картофеля, растение пшеницы, овощное растение, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу.

[0052] Настоящее изобретение также основано на открытии того, что рост устойчивого к нематодам растения в месте произрастания приводит к длительному подавлению плотности популяции нематод в месте произрастания. Подавление нематод можно измерить несколькими способами, включая, помимо прочего, определение плотности популяции нематод в месте произрастания, в корнях растений, выращенных в данном месте произрастания, или в другой значимой области.

Способы

[0053] Настоящее описание относится к способу подавления популяции нематод в месте произрастания, включающему: выращивание устойчивого к

нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет популяцию нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и после выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления период времени охватывает один или более вегетационных сезонов, следующих за вегетационным сезоном, в течение которого выращивали устойчивое к нематодам растение.

[0054] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя выращивание вторичного растения (которое может быть любым растением) в месте произрастания во время, следующее за выращиванием устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя выращивание вторичного растения в месте произрастания во время перед выращиванием устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения одновременно со вторичным растением в данном месте произрастания. В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в ряду, примыкающем к ряду, в котором выращивают вторичное растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в том же ряду, что и ряд, в котором выращивают вторичное растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают как в ряду, примыкающем к ряду, в котором выращивают вторичное растение, так и в том же ряду, что и ряд, в котором выращивают вторичное растение. В настоящем описании рассматривается любая известная в данной области конфигурация для выращивания устойчивого к нематодам растения и вторичного растения (например, выращивание в одном и том же или примыкающих рядах; выращивание в узких и широких рядах; выращивание на краях поля, а не в центре поля; выращивание вперемешку без четких рядов). В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение.

[0055] Настоящее описание также относится к способу подавления популяции нематод в месте произрастания, включающему: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет или поддерживает подавление уже подавленной

популяции нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и/или после выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления период времени охватывает один или более вегетационных сезонов, следующих за вегетационным сезоном, в течение которого выращивали устойчивое к нематодам растение. Например, устойчивое к нематодам растение можно выращивать в месте произрастания, в котором ранее выращивали устойчивое к нематодам растение и/или в котором ранее применяли какой-либо другой механизм подавления популяции нематод.

[0056] Настоящее описание также относится к способу подавления популяции нематод, включающему: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон, причем выращивание устойчивого к нематодам растения приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания и выращивание вторичного растения (которое может быть любым растением) в том же месте произрастания в том же или последующем вегетационном сезоне (например, второй, третий, четвертый или пятый вегетационный сезон), причем вторичное растение демонстрирует меньшее повреждение нематодами, чем было бы, если бы устойчивое к нематодам растение не выращивали в месте произрастания в первый вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления последующий вегетационный сезон представляет собой непосредственно примыкающий к нему вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления популяция нематод практически или вовсе не возобновляется в течение последующего вегетационного сезона. Первым вегетационным сезоном может быть любой вегетационный сезон в течение года. Устойчивые к нематодам растения можно выращивать в течение одного или более вегетационных сезонов в году, в том числе в течение последовательных вегетационных сезонов. В некоторых вариантах осуществления популяция нематод в месте произрастания уже подавлена, и выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания поддерживает подавление популяции нематод. Рост устойчивого к нематодам растения не обязательно должен происходить в течение определенного периода времени или на определенной стадии развития, при условии, что популяция нематод в месте произрастания подавляется или подавление популяции нематод в месте произрастания сохраняется. Подавление популяции нематод можно поддерживать путем выращивания устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, которое ранее содержало устойчивое к

нематодам растение, которое подавляло популяцию нематод, причем на сохраняющееся подавление популяции нематод может указывать присутствие меньшего количества нематод в месте произрастания, чем в таком же или сопоставимом месте произрастания. О подавлении популяции нематод или поддержании подавления популяции нематод может свидетельствовать наличие меньшего количества нематод в месте произрастания, чем в таком же или сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодами, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В альтернативном или дополнительном варианте подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод может означать, что рост устойчивого к нематодам растения в месте произрастания достигает уровня и/или поддерживает уровень нематод в месте произрастания, который находится на уровне или ниже предела обнаружения.

[0057] В некоторых вариантах осуществления на подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод указывает присутствие меньшего количества нематод в месте произрастания, чем в таком же или сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодами, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором никогда не выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором устойчивое к нематодам растение выращивали до, но не во время текущего цикла севооборота.

[0058] В некоторых вариантах осуществления подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод, когда вторичным растением является брахиария, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах подавление популяции нематод, когда вторичным растением является брахиария, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 50, 40, 30, 20, 10 или 5 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является брахиария, достигается тогда, когда количество нематод составляет или составляет около 5–60, 10–60, 20–

60, 5–50, 10–50, 20–50, 5–40, 5–30, 5–20, 10–40, 10–30, 10–20, 20–40 или 20–30 нематод на грамм корня.

[0059] В некоторых вариантах осуществления подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод, когда вторичным растением является кукуруза, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 300 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является кукуруза, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20, 10 или 5 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является кукуруза, достигается тогда, когда количество нематод составляет или составляет около 5–300, 5–250, 5–200, 5–150, 5–100, 5–50, 10–300, 10–250, 10–200, 10–150, 10–100, 10–50, 50–300, 50–250, 50–200, 50–150 или 50–100 нематод на грамм корня.

[0060] В некоторых вариантах осуществления подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод, когда вторичным растением является хлопок, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах подавление популяции нематод, когда вторичным растением является хлопок, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 50, 40, 30, 20, 10 или 5 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является хлопок, достигается тогда, когда количество нематод составляет или составляет около 5–60, 10–60, 20–60, 5–50, 10–50, 20–50, 5–40, 5–30, 5–20, 10–40, 10–30, 10–20, 20–40 или 20–30 нематод на грамм корня.

[0061] В некоторых вариантах осуществления подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод, когда вторичное растение представляет собой сорго, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является сорго, достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 200, 150, 100, 50, 20, 10

или 5 нематод на грамм корня. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод, когда вторичным растением является сорго, достигается тогда, когда количество нематод составляет или составляет около 5–250, 5–200, 5–150, 5–100, 5–50, 10–250, 10–200, 10–150, 10–100, 10–50, 50–250, 50–200, 50–150 или 50–100 нематод на грамм корня.

[0062] В некоторых вариантах осуществления подавление популяции нематод или поддержание подавления популяции нематод в месте произрастания, в котором выращивают вторичное растение, достигается тогда, когда наблюдается, наблюдается примерно или наблюдается по меньшей мере примерно 5%-е снижение количества нематод на грамм корня по сравнению с количеством нематод на грамм корня в месте произрастания, сопоставимом с местом произрастания, в котором выращивают вторичное растение. В дополнительных вариантах осуществления подавление популяции нематод в месте произрастания (например, месте произрастания, в котором выращивают вторичное растение) достигается тогда, когда наблюдается, наблюдается примерно или наблюдается по меньшей мере примерно 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80%-е снижение количества нематод на грамм корня относительно количества нематод на грамм корня в сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодам, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором никогда не выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором устойчивое к нематодам растение выращивали до, но не во время текущего цикла севооборота. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию определение количества нематод на грамм корня выполняется обычным специалистом в данной области.

[0063] Настоящее описание относится к способу подавления популяции нематод, включающему в себя: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон, причем выращивание устойчивого к нематодам растения приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, и выращивание восприимчивого к нематодам растения в том же месте произрастания в том же или последующем вегетационном сезоне (например, во втором, третьем, четвертом или пятом вегетационном сезоне),

причем восприимчивое к нематодам растение имеет меньшее количество повреждений из-за, чем было бы, если бы устойчивое к нематодам растение не выращивали в месте произрастания в первый вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления популяция нематод практически или вовсе не возобновляется в течение последующего вегетационного сезона.

[0064] В некоторых вариантах осуществления способ включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения на месте произрастания в первый вегетационный сезон, выращивание первого восприимчивого к нематодам растения на месте произрастания в последующий вегетационный сезон (например, во второй, третий, четвертый или другой вегетационный сезон после выращивания устойчивого к нематодам растения в данном месте произрастания) и выращивание второго восприимчивого к нематодам растения в этом месте произрастания после выращивания первого восприимчивого к нематодам растения. Третье, четвертое, пятое и т. д. восприимчивое к нематодам растение можно выращивать в месте произрастания в последующие вегетационные сезоны.

[0065] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания до выращивания первого восприимчивого к нематодам растения. Специалисту в данной области понятно, что никакого определенного порядка посадки не требуется, если в определенном месте произрастания достигнуто подавление нематод.

[0066] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой однодольное растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой двудольное растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой однолетнее растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение.

[0067] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, декоративное растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево) или виноградную лозу.

[0068] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, и растение сои выращивают в месте произрастания в первый вегетационный сезон, и восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу, выращенные на том же поле или в другом месте произрастания во второй вегетационный сезон, и устойчивое к нематодам растение сои выращивают в третий вегетационный сезон.

[0069] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, и растение сои выращивают в месте произрастания в первый вегетационный сезон, и восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу, выращенные на том же месте произрастания в том же или во втором вегетационном сезоне, и необязательно восприимчивое к нематодам растение выращивают в том же месте произрастания в третьем вегетационном сезоне, причем восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу. Для однолетних растений сезонный порядок посадки не имеет значения при условии, что в месте произрастания выращивают устойчивое к нематодам растение некоторое время перед или одновременно с посадкой

однолетнего растения и при условии, что популяция нематод в месте произрастания становится или остается достаточно подавленной, чтобы принести пользу однолетнему растению.

[0070] В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания с устойчивым к нематодам растением в этом месте произрастания в течение одного и того же вегетационного сезона или в одно и то же время. В некоторых вариантах осуществления восприимчивое к нематодам растение может представлять собой многолетнее растение, включая, помимо прочего, овощное растение, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое дерево или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу. Таким образом, устойчивое к нематодам растение можно применять для защиты многолетних растений от повреждения нематодами. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания перед посадкой многолетнего растения для подавления популяции нематод в месте произрастания перед посадкой многолетнего растения. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают как перед посадкой многолетнего растения, так и одновременно с многолетним растением или вместе с ним, например, ежегодно, если устойчивое к нематодам растение представляет собой однолетнее растение. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания, уже содержащем многолетнее растение, причем многолетнее растение получает пользу от добавления устойчивого к нематодам растения в место произрастания. Для многолетних растений сезонный порядок посадки не имеет значения при условии, что в месте произрастания выращивают устойчивое к нематодам растение до, одновременно или после посадки многолетнего растения, а также при условии, что популяция нематод в месте произрастания становится или остается достаточно подавленной, чтобы принести пользу многолетнему растению.

[0071] Также предложен способ защиты восприимчивого к нематодам растения от повреждения нематодами или ущерба нематодами, включающий выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере за один вегетационный сезон до выращивания восприимчивого к нематодам растения; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в том же или по меньшей мере одном вегетационном сезоне,

следующем за вегетационным сезоном устойчивого к нематоде растения. В контексте настоящего документа термин «повреждение нематодой» относится к физическому вреду или разрушению, причиненному растению нематодой. В контексте настоящего документа термин «повреждение нематодой» относится к денежным убыткам, причиненным товарному продукту нематодой.

[0072] Также предложены способы повышения урожайности восприимчивого к нематодам растения. Способы включают в себя выращивание устойчивого к нематодам растения в поле в течение первого вегетационного сезона; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в поле в течение того же или последующего вегетационного сезона. Выращивание восприимчивого к нематодам растения в тот же вегетационный сезон или сезон, следующий за выращиванием устойчивого к нематодам растения, увеличивает урожайность восприимчивого к нематодам растения по сравнению с урожайностью восприимчивого к нематодам растения, выращенного в том же или сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодами, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления увеличенную урожайность восприимчивого к нематодам растения сравнивают с урожайностью восприимчивого к нематодам растения, выращенного в том же или сопоставимом месте произрастания, в котором устойчивую к нематодам культуру не выращивали в течение самого последнего цикла севооборота. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором никогда не выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором устойчивое к нематодам растение выращивали до, но не во время текущего цикла севооборота.

[0073] В контексте настоящего документа термин «урожайность» растения относится к качеству и/или количеству биомассы, производимой растением. Под термином «биомасса» подразумевается любой измеряемый растительный продукт. Увеличение производства биомассы – это любое улучшение урожайности измеряемого растительного продукта. Увеличение урожайности растения имеет несколько коммерческих применений. Например, увеличение биомассы листьев растений может увеличить урожайность листовых овощей для потребления человеком или животными. Кроме того, увеличение биомассы листьев можно применять для увеличения производства фармацевтических или промышленных

продуктов растительного происхождения. В некоторых вариантах осуществления выращивание восприимчивого к нематодам растения после выращивания устойчивого к нематодам растения увеличивает урожайность восприимчивого к нематодам растения на по меньшей мере 1% (или по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 100%) по сравнению с восприимчивым к нематодам растением, выращенным в том же или сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодами, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором никогда не выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором устойчивое к нематодам растение выращивали до, но не во время текущего цикла севооборота.

[0074] В различных вариантах осуществления выращивание восприимчивого к нематодам растения в вегетационный сезон одновременно с выращиванием или после выращивания устойчивого к нематодам растения приводит, например, к следующим преимуществам для восприимчивого к нематодам растения: улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков); улучшенная урожайность; более быстрая всхожесть; улучшенное управление стрессом растений, включающее повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса; повышенная механическая прочность; повышенная устойчивость к засухе; сниженное заражение грибковой, бактериальной и/или вирусной инфекцией; и/или улучшенная жизнеспособность растений по сравнению с восприимчивым к нематодам растением, которое выращивали в том же или сопоставимом месте произрастания, если не были приняты меры по борьбе с нематодами, включая выращивание устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором никогда не

выращивали устойчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления сопоставимое место произрастания представляет собой место произрастания, в котором устойчивое к нематодам растение выращивали до, но не во время текущего цикла севооборота. Также могут быть получены комбинации любых из этих преимуществ.

[0075] В различных вариантах осуществления выращивание растения в вегетационный сезон после или одновременно с ростом устойчивого к нематодам растения в конкретном месте произрастания может обеспечить рост растений, которые не способны стать устойчивыми к нематодам растениями из-за технических, сельскохозяйственных и/или нормативных причин. Неограничивающие примеры таких растений, которые можно применять в настоящем изобретении, включают в себя фруктовые или ореховые деревья, декоративные растения, виноградные лозы или пшеницу в Австралии.

[0076] Настоящее изобретение применимо как к мигрирующим, так и к оседлым видам нематод. Кроме того, появляются новые виды нематод как мигрирующих, так и оседлых категорий, которые также можно контролировать с помощью настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления нематода происходит из популяции нематод, в частности популяции нематод *Pratylenchus* spp., например *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., например *Heterodera glycines, Globodera* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus* spp., например *Helicotylenchus dihystera, Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua* или *Aphelencoides besseyi*.

[0077] Также рассматривается место произрастания, такое как поле или участок, имеющий плотность подавленной популяции нематод (например, нематод на объем почвы) или уменьшенную численность нематод (например, нематод на грамм корня), причем плотность подавленной популяции нематод или уменьшенная численность нематод достигаются способами, описанными в настоящем документе. Измерения плотности подавленной популяции нематод или сниженная численность нематод в месте произрастания в практическом смысле взаимозаменяемы, поскольку оба понятия являются показателем присутствия нематод в месте произрастания, причем разница заключается только в способе, применяемом для измерения присутствия нематод. Подавленную популяцию нематод можно измерить любым количеством способов, ни один из которых не ограничивает настоящее изобретение. В различных вариантах осуществления

плотность подавленной популяции нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20 или 10 нематод на грамм (г) корня.

Нематицидные нуклеиновые кислоты, нематицидные белки и устойчивые к нематодам растения

[0078] Описанные в настоящем документе способы описывают применение растения, которое экспрессирует нематицидную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем документе, включают в себя применение растения, обработанного методами молекулярной биологии посредством преобразования организмов или применения организмов, содержащих гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую нематицидный белок. Существует ряд методов молекулярной биологии, которые можно применять, чтобы позволить растению экспрессировать нематицидную нуклеиновую кислоту, и технический подход, применяемый для получения устойчивого к нематодам растения, не ограничивается способами, описанными в настоящем документе.

[0079] В контексте настоящего документа термины «нематицидная нуклеиновая кислота» и «нематицидный белок» относятся к токсину, который обладает активностью против одной или более нематод-вредителей, включая, помимо прочего, *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus dihystera, Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua, Aphelencoides besseyi,* and *Pratylenchus spp., including Pratylenchus alleni, Pratylenchus brachyurus, Pratylenchus coffeae, Pratylenchus crenatus, Pratylenchus dulscus, Pratylenchus fallax, Pratylenchus flakkensis, Pratylenchus goodeyi, Pratylenchus hexincisus, Pratylenchus loosi, Pratylenchus minutus, Pratylenchus mulchandi, Pratylenchus musicola, Pratylenchus neglectus, Pratylenchus penetrans, Pratylenchus pratensis, Pratylenchus reniformia, Pratylenchus scribneri, Pratylenchus thornei, Pratylenchus vulnus* и *Pratylenchus zeae*.

[0080] В некоторых вариантах осуществления нематицидный белок представляет собой белок Cry. Белки Cry хорошо известны специалистам в данной области. Нематицидная активность белков Cry описана, например, в международных публикациях WO 2010/027805, WO 2010/027809, WO 2010/027804, WO 2010/027799, WO 2010/027808 и WO 2007/147029. В некоторых вариантах осуществления нематицидный белок содержит белок Cry14 (см., например, международную публикацию № WO2018119336 и предварительную заявку на патент США с серийным № 62/112,832 (поданную 12 ноября 2020 г.), каждая из

которых полностью включена в настоящий документ путем ссылки). В различных вариантах осуществления белок Cry14 представляет собой Cry14Aa1 (номер доступа в GENBANK AAA21516) или Cry14Ab1 (также известный как Cry14Ab-1; номер доступа в GENBANK KC156652). В некоторых вариантах осуществления белок Cry14Ab-1 (SEQ ID NO: 1 (аминокислотная последовательность) и SEQ ID NO: 2 (нуклеотидная последовательность)) соответствует описанному в международных публикациях № WO 2018/119361 и WO 2018/119364, а также их вариантам и фрагментам. В различных вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение экспрессирует нематицидный белок Cryl4Ab, имеющий, имеющий около или имеющий по меньшей мере или по меньшей мере около 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1.

[0081] Специалистам в данной области хорошо известен ряд нуклеиновых кислот, обладающих нематицидной активностью, а также методы молекулярной биологии для создания растений, устойчивых к нематодам. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, экспрессируемая устойчивым к нематодам растением, продуцируется с помощью последовательности, как описано, например, в международных публикациях №№ WO 2011/82217, WO 2013/078153, WO 2020/243365, WO 2018/005491 и WO 2021/016098.

[0082] Методы молекулярной биологии, применяемые для создания устойчивых к нематодам растений включают, в качестве неограничивающих примеров, редактирование генома для создания нуклеиновой кислоты, приводящей к нематоцидной активности; экспрессию молекулы РНК, которая приводит к нематицидной активности; и/или экспрессию гетерологичного или трансгенного нематицидного белка. Для создания растений, устойчивых к нематодам, также можно применять другие методы, такие как индуцированные мутации. В некоторых вариантах осуществления нематицидная нуклеиновая кислота, экспрессируемая устойчивым к нематодам растением, продуцируется геном Cry. В некоторых вариантах осуществления ген Cry представляет собой ген Cry14. В некоторых вариантах осуществления ген Cry14 представляет собой ген Cry14Aa или ген Cry14Ab.

[0083] Устойчивое к нематодам растение может экспрессировать одну или более дополнительных нуклеиновых кислот, введенных методами молекулярной биологии в дополнение к нуклеиновой кислоте, приводящей к нематицидной

активности, включая, помимо прочего, нуклеиновые кислоты, которые обеспечивают толерантность к гербицидам, устойчивость к жесткокрылым вредителям, устойчивость к чешуекрылым вредителям, устойчивость к другим вредителям, включая других насекомых; и/или устойчивость к болезням. Такие другие нуклеиновые кислоты могут возникать, например, в результате методов молекулярной биологии, таких как, помимо прочего, деятельность по редактированию генома, экспрессия РНК или экспрессия гетерологичных белков. Кроме того, устойчивое к нематодам растение может экспрессировать другие ненативные нуклеиновые кислоты благодаря другим методам, таким как введение мутаций, интрогрессия признаков посредством селекции и/или другие методы, хорошо известные специалистам в данной области. Присутствие таких других нуклеиновых кислот и/или признаков не ограничивает способы, описанные в настоящем документе.

[0084] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение экспрессирует одну или более дополнительных ненативных нуклеиновых кислот в дополнение к нуклеиновой кислоте, обеспечивающей нематицидную активность. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, обеспечивающая нематицидную активность, сочетается с одним или более GM объектами сои, обеспечивающими толерантность к любому одному или комбинации веществ на основе глифосата, глюфосината, ингибитора HPPD, сульфонилмочевины или имидазолинона, AHAS- или ALS-ингибирующими гербицидами и/или гербицидами ауксинового типа (например, дикамба, 2,4-D), такими как Объект EE-GM3 (также известный как FG-072, MST-FG072-3, описанный в WO2011063411, петиции USDA-APHIS 09-328-01p), Объект SYHT0H2 (также известный как 0H2, SYN-000H2-5, описанный в WO2012/082548 и 12-215-01p), Объект DAS-68416-4 (также известный как соя Enlist, описанный в WO2011/066384 и WO2011/ 066360, петиции USDA-APHIS 09-349-01p), Объект DAS-44406-6 (также известный как Enlist E3, DAS-44406-6, описанный в WO2012/075426 и USDA-APHIS 11-234-Olp), Объект MON87708 (толерантный к дикамбе объект Roundup Ready 2 Xtend Soybeans, описанный в WO2011/034704 и петиции USDA-APHIS 10-188-Olp, MON-87708-9), Объект MON89788 (также известный как Genuity Roundup Ready 2 Yield, описанный в WO2006/130436 и петиции USDA-APHIS 06-178-01p), Объект 40-3-2 (также известный как Roundup Ready, GTS 40-3-2, MON-04032-6, описанный в петиции USDA-APHIS 93-258-01),

Объект A2704- 12 (также известный как LL27, ACS-GM005-3, описанный в WO2006108674 и петиции USDA-APHIS 96-068-Olp), Объект 127 (также известный как BPS-CV127-9, описанный в WO2010/080829), Объект A5547-127 (также известный как LL55, ACS-GM006-4, описанный в WO2006108675 и в петиции USDA-APHIS 96-068-01p), Объект MON87705 (MON-87705-6, Vistive Gold, опубликованная заявка на патент PCT WO2010/037016, петиция USDA-APHIS 09-201-01p), соевый объект HB4 (уникальный идентификатор ОЭСР IND-00410-05, петиция USDA-APHIS 17-223-01p) или объект DP305423 (также известный как DP-305423-1, опубликованная заявка на патент PCT WO2008/054747, петиция USDA-APHIS 06-354-01p), или нуклеиновая кислота, вызывающая нематицидную активность, сочетается с комбинацией следующих объектов: Объект MON98788 x MON87708 (также известный как соя Roundup Ready 2 Xtend, MON-87708-9 x MON-89788-1), Объект HOS x Объект 40-3-2 (также известный как высокоолеиновая соя Plenish x соя Roundup Ready), объект EE-GM3 x EE-GM2 (также известный как FG-072xLL55, описанный в WO2011063413), объект MON 87701 x MON 89788 (также известный как Intacta RR2 Pro Soybean, MON-87701-2 x MON-89788-1), DAS-81419-2 x DAS-44406-6 (также известный как Conkesta™ Enlist E3™ Soybean, DAS-81419-2 x DAS-44406-6), объект DAS-68416-4 x Event MON 89788 (также известный как Enlist™ RoundUp Ready® 2 Soybean, DAS-68416-4 X MON-89788-1), объект MON-87769-7 x объект MON-89788-1 (также известный как Omega-3 X Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans), объект MON 87705 x объект MON 89788 (также известный как Vistive Gold, MON-87705-6 x MON-89788-1) или объект MON87769 x объект MON89788 (также известный как Omega-3 x Genuity Roundup Ready 2 Yield Soybeans, MON-87769-7 x MON-89788-1). В некоторых вариантах осуществления любой из вышеуказанных признаков модифицируется с помощью мутаций, редактирования генома или других методов молекулярной биологии и сочетается с признаком устойчивости к нематодам, отдельно или в любой комбинации.

[0085] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, содержащее объект EE-GM4, как описано в международной публикации № WO 2018/119361, или растение сои, содержащее объект EE-GM5 (также известный как объект GMB151), как описано. в международной публикации № WO 2018/119364. Описания международных

публикаций WO 2018/119361 и WO 2018/119364 полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

[0086] В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение содержит один или более нативных признаков, обеспечивающих устойчивость к нематодам. Такие нативные признаки хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Fosu-Nyarko, J., and M. G. K. Jones. 2015. Application of biotechnology for nematode control in crop plants. Pages 339-376 in: Advances in Botanical Research Vol. 73, Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships. Chapter 14. C. Escobar and C. Fenoll, eds. Elsevier, Oxford). Нативные признаки могут дополнять подавляющее действие на нематод устойчивого к нематодам растения, и в некоторых вариантах осуществления один или более таких нативных признаков присутствуют в зародышевой плазме устойчивого к нематодам растения.

[0087] Таким образом, в настоящем документе предложены способы уничтожения, подавления или контроля популяции нематод-вредителей, например *Pratylenchus* spp. популяции нематод, например *Pratylenchus brachyurus*, *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., например *Heterodera glycines, Globodera* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus* spp., например *Helicotylenchus dihystera, Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua* или *Aphelencoides besseyi* посредством нематицидной нуклеиновой кислоты или белка, экспрессируемого устойчивым к нематодам растением, как описано в настоящем документе. В конкретных вариантах осуществления нематицидный белок содержит белок Cry14, представленный в международных публикациях WO 2018/119361, WO 2018/119364 или предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/112,832, а также его варианты и фрагменты.

Системы

[0088] В другом аспекте в настоящем документе описана система для повышения эффективности выращивания восприимчивого к нематодам растения, причем система включает в себя: выращивание устойчивого к нематоде растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления второе восприимчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания после выращивания первого восприимчивого к нематодам растения. В некоторых

вариантах осуществления повышение эффективности выращивания восприимчивого к нематодам растения можно определить или измерить с помощью одного или более из следующего: a) применения места произрастания в течение по меньшей мере одного дополнительного вегетационного сезона в год; b) сниженной обработки места произрастания; c) сниженной обработки семян восприимчивых к нематодам культур нематицидами; d) уменьшенной площади обработки места произрастания нематицидами до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения; e) уменьшенного уровня нематицида, наносимого на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения; f) уменьшенное количество нанесений нематицид на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания в течение вегетационного сезона; повышенной пригодности места произрастания; повышенной ценности места произрастания; улучшенных устойчивых методов ведения сельского хозяйства; и/или g) увеличенной урожайности восприимчивой к нематодам культуры.

[0089] В другом аспекте в настоящем документе описана система для более широкого применения места произрастания, причем система включает в себя: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон; и выращивание первого восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в тот же или последующий вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение и первое восприимчивое к нематодам растение выращивают в один и тот же или последовательные вегетационные сезоны. В других вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение и первое восприимчивое к нематодам растение выращивают в непоследовательные вегетационные сезоны. В некоторых вариантах осуществления место произрастания не находится под паром в течение последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления покровную культуру не высаживают в течение последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления место произрастания не обрабатывают.

[0090] В другом аспекте в настоящем документе описана система для более широкого применения места произрастания, такого как, помимо прочего, поле или участок, причем система включает в себя выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон; выращивание

первого восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в тот же или последующий вегетационный сезон; и выращивание второй восприимчивой к нематодам культуры в месте произрастания после выращивания в этом месте произрастания первой восприимчивой к нематодам культуры. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение, первое восприимчивое к нематодам растение и второе восприимчивое к нематодам растение выращивают в последовательные вегетационные сезоны. В других вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение, первое восприимчивое к нематодам растение и второе восприимчивое к нематодам растение выращивают в непоследовательные вегетационные сезоны или только два из трех выращивают в последовательные или непоследовательные вегетационные сезоны. В некоторых вариантах осуществления место произрастания не находится под паром в течение последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления покровную культуру не высаживают в течение последующего вегетационного сезона. В некоторых вариантах осуществления место произрастания не обрабатывают.

[0091] В контексте настоящего документа термин «система севооборота» или «система земледелия» относится к практике следования циклу севооборота, в котором одну сельскохозяйственную культуру высаживают в определенном месте произрастания, например, поле, за которой в течение определенного периода времени следует одна или более последовательных культур. Период времени, охватываемый одним циклом севооборота, не обязательно соответствует календарному году и не обязательно двенадцатимесячному циклу. В некоторых случаях один цикл севооборота может охватывать период времени от двух до трех лет или даже дольше. В некоторых вариантах осуществления сахарный тростник находится в примерно 5-летнем цикле (например, 4–5 лет выращивания сахарного тростника, за которыми следует один сезон отсутствия сахарного тростника). Точные сроки посадки, период времени цикла и культуры, подлежащие посадке, определяются окружающей средой и зависят от конкретного местоположения. Системы севооборота применяются по ряду причин, таких как учет потребностей каждой культуры в питательных веществах, снижение заболеваемости и/или воздействия вредителей, а также диверсификация бизнеса. Например, типичная бразильская система выращивания сои дает два урожая, которые сажают подряд в течение календарного года. Первичный вегетационный сезон, называемый

«сафра», начинается с посадки первого урожая, такого как соя, в сентябре-декабре. Сбор урожая сезона сафра происходит в период с января по март. Сразу после сбора урожая сезона сафра сажают второй урожай сезона, называемый «сафринья». Затем урожай сафриньи собирают в мае-августе. См. Фиг. 8. В Соединенных Штатах цикл севооборота варьируется в зависимости от окружающей среды и целей фермера и не обязательно привязан к календарному году. В одном примере основной вегетационный сезон начинается с посадки основной культуры в феврале-мае, а сбор урожая происходит в августе-октябре. Затем второй урожай сажают в сентябре-ноябре или сажают на следующий год в феврале-мае. Другие местоположения или географические регионы поддерживают рост сельскохозяйственных культур в течение цикла севооборота, состоящего из трех вегетационных сезонов, а еще другие поддерживают рост сельскохозяйственных культур в течение цикла севооборота, состоящего из четырех или более вегетационных сезонов.

[0092] В одном аспекте в настоящем документе описан способ подавления популяции нематод в местоположении, включающий выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и/или после выращивания устойчивого к нематодам растения. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение выращивают в течение сезона сафра. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают в себя выращивание вторичного растения в месте произрастания в течение сезона сафринья, сразу же следующего за сезоном сафра. В некоторых вариантах осуществления вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение. В некоторых вариантах осуществления как устойчивое к нематодам растение, так и вторичное растение представляют собой сельскохозяйственные растения, обладающие собственной ценностью. В некоторых вариантах осуществления как устойчивое к нематодам растение, так и вторичное растение представляют собой растения товарной культуры. В некоторых вариантах осуществления устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, а вторичное растение выбрано из группы, состоящей из кукурузы, хлопка, сорго, пшеницы и сахарного тростника.

[0093] В некоторых аспектах в настоящем документе описан способ улучшения системы севооборота, включающий: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в тот же или последующий вегетационный сезон. В некоторых вариантах осуществления второе восприимчивое к нематодам растение выращивают в месте произрастания после выращивания первого восприимчивого к нематодам растения.

[0094] В некоторых вариантах осуществления улучшенная система севооборота может быть указана или измерена посредством одного или более из следующего: a) применения места произрастания в течение по меньшей мере одного дополнительного вегетационного сезона в год; b) сниженной обработки места произрастания; c) сниженной обработки семян восприимчивых к нематодам культур нематицидами; d) уменьшенной площади обработки места произрастания нематицидами до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения; e) уменьшенного уровня нематицида, наносимого на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения; f) уменьшенное количество нанесений нематицид на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания в течение вегетационного сезона; повышенной пригодности места произрастания; повышенной ценности места произрастания; улучшенных устойчивых методов ведения сельского хозяйства; и/или g) увеличенной урожайности восприимчивой к нематодам культуры.

[0095] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, видами или родами растений, конструкциями и реагентами, описанными как таковые. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Следует отметить, что используемые в

настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «вектор» представляет собой ссылку на один или более векторов и включает в себя их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и так далее.

Маркетинг

[0096] В настоящем документе «маркетинг» представляет собой любое сообщение организации или от ее имени с целью оповещения общественности/потенциальных клиентов о коммерческих продуктах и поощрения их принятия и/или применения. Печатные маркетинговые материалы могут включать в себя, помимо прочего, брошюры, буклеты, листовки, каталоги, визитные карточки, вывески, плакаты, рекламные щиты, торговую литературу, пакеты с семенами, бирки на пакетах с семенами, этикетки или другую рекламу. Другие типы маркетинга/материалов могут включать в себя, помимо прочего, любой тип цифровой информации, включая информацию на веб-сайтах, электронные письма, текстовые сообщения, любые спонсируемые компанией сообщения или мероприятия для продвижения/раскрытия продукта или любые социальные сети. Маркетинг также включает в себя любые скидки/стимулы для фермера, направленные на покупку одного или более продуктов, применение которых в ходе цикла севооборота улучшается за счет применения устойчивого к нематодам растения в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе.

[0097] В некоторых аспектах в настоящем описании также предложены способы сбыта системы севооборота, включающие стимулирование применения устойчивого к нематодам растения в определенном месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и стимулирование применения восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивых к нематодам растений в последующий вегетационный сезон. В дополнительных аспектах предложены способы сбыта системы севооборота для подавления популяции нематод в месте произрастания, включающие стимулирование применения устойчивого к нематодам растения в

месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и стимулирование применения восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивых к нематодам растений в последующий вегетационный сезон.

[0098] В дополнительных аспектах в настоящем документе предложены маркетинговые материалы, направленные на систему выращивания устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона в координации с или с последующим выращиванием восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в последующем вегетационном сезоне. В некоторых вариантах осуществления маркетинговые материалы направлены на продвижение системы выращивания устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона в координации с или с последующим выращиванием восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в последующем вегетационном сезоне.

[0099] В некоторых аспектах в настоящем описании предложен способ улучшения сбыта системы севооборота для сокращения популяций нематод, снижения повреждения урожая нематодами и/или повышения урожайности сельскохозяйственных культур посредством подавления популяций нематод, причем способ включает в себя характеристики, включающие, помимо прочего, одно или более из программы скидок, маркетинговых заявлений связанного предложения или интегрированного решения, или любого торгового предложения, направленного на покупку одного или более продуктов, применение которых в

ходе цикла севооборота улучшается за счет применения устойчивого к нематодам растения в соответствии со способами, предложенными в настоящем документе.

[00100] В дополнительных аспектах в настоящем описании предложен набор, содержащий маркетинговые материалы, как описано в настоящем документе (например, относящиеся к маркетингу системы севооборота) и/или устойчивое к нематодам растение сои или его клетки, части, семена или потомство, каждое из которых описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит вторичное растение или его клетки, части, семена или потомство. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит любой продукт, пригодный для выращивания растений, клеток, частей, семян или их потомства, включая, помимо прочего, гербициды, фунгициды, инсектициды, нематициды, биологические препараты, удобрения, средства для обработки семян, инокулянты, инструменты для принятия решений или дистанционного зондирования, услуги по разведке посевов, инструменты и/или услуги по диагностике посевов. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию набор представляет собой любую упаковку или материал, который включает в себя продажу системы или способ подавления или поддержания популяции нематод в месте произрастания, таким образом, что получаемая популяция нематод в месте произрастания составляет около 250 нематод на грамм (г) корня или меньше. В различных вариантах осуществления набор представляет собой любую упаковку или материал, который включает в себя маркетинг системы или способ подавления или поддержания популяции нематод в месте произрастания, причем получаемая популяция нематод в месте произрастания составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20 или 10 нематод на грамм (г) корня.

[00101] Как описано в настоящем документе, продукты, системы и способы по настоящему описанию также обеспечивают повышенную ценность и устойчивость за счет возможности улучшения методов ведения сельского хозяйства (например, посредством возможностей углеродных квот). Например, возможности устойчивости, создаваемые вариантами осуществления по настоящему описанию, могут включать в себя, помимо прочего, (i) улучшение места произрастания таким образом, чтобы оно требовало меньше обработки почвы; (ii) устранение необходимости выращивать покровные культуры или оставлять место произрастания под паром в течение по меньшей мере одного вегетационного сезона

в год, и/или (ii) обеспечение роста растений с более здоровой и более крупной корневой системой, которая может улавливать больше углерода, чем растения с меньшей корневой системой или корнями, поврежденными нематодами. Еще одно связанное преимущество, обеспечиваемое настоящим описанием, относится к улучшенной фиксации азота. Нематоды уменьшают фиксацию азота в сое, тем самым увеличивая потребность в химическом азоте сельскохозяйственных культур (например, кукурузы), высаживаемых в следующем сезоне. В любом из аспектов или вариантов осуществления по настоящему описанию устойчивые к нематодам растения, как описано в настоящем документе, подавляют популяцию нематод и обеспечивают улучшенную или полную фиксацию азота в сое, что затем снижает потребность урожая кукурузы в химическом азоте в следующем сезоне. Кроме того, химический азот вызывает экологические проблемы и является причиной беспокойства (см., например, Crews *et al.*, Agriculture, Ecosystems and Environment 102 (2004) 279–297).

[00102] Варианты осуществления:

[00103] 1. Способ подавления популяции нематод в месте произрастания, включающий:

[00104] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и/или после выращивания устойчивого к нематодам растения.

[00105] 2. Способ по варианту осуществления 1, в котором период времени охватывает один или более вегетационных периодов, следующих за вегетационным сезоном, в течение которого выращивали устойчивое к нематодам растение.

[00106] 3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, дополнительно включающий выращивание вторичного растения в месте произрастания после выращивания устойчивого к нематодам растения.

[00107] 4. Способ по варианту осуществления 1 или 2, дополнительно включающий выращивание вторичного растения в месте произрастания перед выращиванием устойчивого к нематодам растения.

[00108] 5. Способ по варианту осуществления 1 или 2, дополнительно включающий выращивание устойчивого к нематодам растения одновременно со вторичным растением в месте произрастания.

[00109] 6. Способ по любому из вариантов осуществления 3–5, в котором вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение.

[00110] 7. Способ по любому из вариантов осуществления 1–6, в котором популяцию нематод подавляют или поддерживают на уровне или ниже предела обнаружения.

[00111] 8. Способ по любому из вариантов осуществления 3–6, в котором вторичное растение представляет собой брахиарию, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня.

[00112] 9. Способ по любому из вариантов осуществления 3–6, в котором вторичное растение представляет собой кукурузу, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 300 нематод на грамм корня.

[00113] 10. Способ по любому из вариантов осуществления 3–6, в котором вторичное растение представляет собой хлопок, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня.

[00114] 11. Способ по любому из вариантов осуществления 3–6, в котором вторичное растение представляет собой сорго, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250 нематод на грамм корня.

[00115] 12. Способ по любому из вариантов осуществления 3–11, в котором подавление популяции нематод в месте произрастания, в котором выращивают вторичное растение, достигается тогда, когда наблюдается, наблюдается примерно или наблюдается по меньшей мере примерно 5%-е снижение количества нематод на грамм корня по сравнению с количеством нематод на грамм корня в месте произрастания, сопоставимом с местом произрастания, в котором выращивают вторичное растение.

[00116] 13. Способ защиты растения от ущерба или повреждения нематодами, включающий:

[00117] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере за один вегетационный сезон перед посадкой восприимчивого к нематодам растения; и

[00118] выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в течение одного вегетационного сезона после выращивания устойчивого к нематодам растения.

[00119] 14. Способ по варианту осуществления 13, в котором защита восприимчивого к нематодам растения от повреждения нематодами включает в себя увеличение урожайности и/или денежных средств от продажи собранного восприимчивого к нематодам растительного материала.

[00120] 15. Способ повышения урожайности восприимчивого к нематодам растения, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере за один вегетационный сезон перед посадкой восприимчивого к нематодам растения; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в течение одного вегетационного сезона после выращивания устойчивого к нематодам растения.

[00121] 16. Вариант осуществления 15, в котором повышенную урожайность восприимчивого к нематодам растения сравнивают с урожайностью восприимчивого к нематодам растения, выращенного в том же или сопоставимом месте произрастания, в котором ранее не выращивали устойчивую к нематодам культуру, или увеличенную урожайность восприимчивого к нематодам растения сравнивают с урожайностью восприимчивого к нематодам растения, выращенного в том же месте произрастания до выращивания устойчивого к нематодам растения или сопоставимом месте произрастания.

[00122] 17. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

[00123] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания; и

[00124] выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в то же самое время или во время после выращивания устойчивого к нематодам растения.

[00125] 18. Способ по вариантам осуществления 6–17, в котором восприимчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение или однолетнее растение.

[00126] 19. Способ по любому из вариантов осуществления 6–18, в котором восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение картофеля, растение пшеницы, овощное растение, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу.

[00127] 20. Способ по любому из вариантов осуществления 1–19, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует белок Cry, например, без ограничения, нематицидный белок Cry.

[00128] 21. Способ по любому из вариантов осуществления 1–20, в котором устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, декоративное растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево) или виноградную лозу.

[00129] 22. Способ по любому из вариантов осуществления 1–21, отличающийся тем, что нематода представляет собой вид нематод, выбранный из популяций нематод *Pratylenchus* spp., например *Pratylenchus brachyurus, Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp., например *Heterodera glycines*, *Globodera* spp., *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus* spp., например *Helicotylenchus dihystera*, *Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua* или *Aphelencoides besseyi*.

[00130] 23. Способ по варианту осуществления 22, в котором *Pratylenchus* spp представляет собой *Pratylenchus brachyurus*.

[00131] 24. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

[00132] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания одновременно с растением, восприимчивым к нематодам.

[00133] 25. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

посадку восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания; и

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания одновременно с посадкой восприимчивого к нематодам растения.

[00134] 26. Место произрастания, имеющее плотность подавленной популяции нематод, причем плотности подавленной популяции нематод достигают способом по любому из вариантов осуществления 1–25.

[00135] 27. Место произрастания по варианту осуществления 26, которое обеспечивает одно или более из следующих преимуществ: a) место произрастания не обязательно должно находиться под паром один вегетационный сезон в год или за цикл севооборота; b) место произрастания не обязательно должно быть обработано в один вегетационный сезон за цикл севооборота; и c) место произрастания не обязательно должно быть засажено покровной культурой.

[00136] 28. Место произрастания по варианту осуществления 26 или варианту осуществления 27, в котором плотность подавленной популяции нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20 или 10 нематод на грамм (г) корня.

[00137] 29. Место произрастания по варианту осуществления 26, которое не обязательно должно находиться под паром один вегетационный сезон за цикл севооборота.

[00138] 30. Устойчивое к нематодам растение, выращенное в месте произрастания по варианту осуществления 26.

[00139] 31. Растительный материал, собранный с растения по варианту осуществления 30.

[00140] 32. Семена, произведенные растением по варианту осуществления 31.

[00141] 33. Система для увеличенного применения места произрастания, содержащая:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в последующий вегетационный сезон.

[00142] 34. Система по варианту осуществления 33, в которой место произрастания не находится под паром в течение последующего вегетационного сезона.

[00143] 35. Система по варианту осуществления 33, в которой покровное растение или покровную культуру не выращивают в течение последующего вегетационного сезона.

[00144] 36. Система по варианту осуществления 33, в которой устойчивое к нематодам растение и восприимчивое к нематодам растение выращивают в последовательные вегетационные сезоны.

[00145] 37. Система по любому из вариантов осуществления 33–36, в которой каждое из устойчивого к нематодам растения и восприимчивого к нематодам растения представляет собой сельскохозяйственное растение, имеющее внутреннюю ценность.

[00146] 38. Способ улучшения системы севооборота, включающий:

[00147] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и

[00148] выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в последующий вегетационный сезон.

[00149] 39. Способ по варианту осуществления 38, в котором улучшенная система севооборота может дополнительно включать в себя одно или более из следующего:

[00150] a) применение места произрастания в течение по меньшей мере одного дополнительного вегетационного сезона в год;

[00151] b) сниженная обработка места произрастания;

[00152] c) сниженной обработки семян восприимчивых к нематодам культур нематицидами;

[00153] d) уменьшенная площадь обработки места произрастания нематицидами до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

[00154] e) уменьшенный уровень нематицида, наносимого на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

[00155] f) уменьшенное количество нанесений нематицид на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания в течение вегетационного сезона;

[00156] g) повышенная пригодность места произрастания;

[00157] h) повышенная ценность места произрастания;

[00158] i) улучшенные устойчивые методы ведения сельского хозяйства; и/или

[00159] j) увеличенная урожайность восприимчивых к нематодам культур.

[00160] 40. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

[00161] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение вегетационного сезона; и

[00162] выращивание многолетнего растения в месте произрастания до, во время и/или после вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост многолетнего растения.

[00163] 41. Способ по варианту осуществления 40, в котором многолетнее растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение.

[00164] 42. Способ по варианту осуществления 40, в котором многолетнее растение представляет собой овощное растение, плодовое растение, садовое растение, декоративное растение или виноградную лозу.

[00165] 43. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

[00166] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в первый вегетационный сезон подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания;

[00167] выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в тот же или последующий вегетационный сезон; и

[00168] достижение улучшенной жизнеспособности и/или урожайности восприимчивого к нематодам растения по сравнению со жизнеспособностью и/или урожайностью, ожидаемыми, если бы популяция нематод не была подавлена.

[00169] 44. Способ по варианту осуществления 43, в котором улучшенная жизнеспособность восприимчивого к нематодам растения включает в себя одно или более из следующего: улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков); улучшенная урожайность; более быстрая

всхожесть; улучшенное управление стрессом растений, включающее повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса; повышенная механическая прочность; повышенная устойчивость к засухе; сниженное заражение грибковой, бактериальной и/или вирусной инфекцией; или любая их комбинация.

[00170] 45. Любой из вышеприведенных вариантов осуществления 1–44, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует нематицидный белок Cryl4Ab, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1.

[00171] 46. Любой из вариантов осуществления 1–44, в котором устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM5.

[00172] 47. Любой из вариантов осуществления 1–44, в котором устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM4.

[00173] 48. Любой из вариантов осуществления 1–44, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует токсин Cry14Ab-1 *Bacillus thuringiensis* или его функциональное усечение или вариант.

[00174] 49. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

[00175] выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем устойчивое к нематоде растение выращивают в течение сезона сафра в южноамериканской стране, такой как Бразилия или Парагвай; и

[00176] выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания после выращивания устойчивого к нематодам растения, причем восприимчивое к нематодам растение выращивают в течение сезона сафринья в южноамериканской стране, такой как Бразилия или Парагвай.

[00177] 50. Способ по варианту осуществления 49, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует токсин Cry14Ab-1 Bacillus thuringiensis или его функциональное усечение или вариант, причем восприимчивое к нематодам растение выбрано из группы, состоящей из кукурузы, хлопка, сорго, пшеницы и сахарного тростника.

[00178] Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение растений, устойчивых к нематодам

[00179] Линии сои, содержащие трансгенный объект GMB151 (т. е. EE-GM5, как описано в Международной публикации № WO 2018/119364), были созданы из выбранных растений BC2:F2. Линии сои различались по их зиготности для объекта GMB151. Была создана одна линия, гомозиготная для объекта GMB151, а также была отобрана вторая линия, нуль-зиготная для объекта GMB151. Эти две линии имели прибл. 87,5% генетической идентичности с общей родительской линией обратного скрещивания сои. Таким образом, линии были сельскохозяйственно схожими, за исключением присутствия объекта GMB151.

Пример 2. Борьба с корневой ранящей нематодой Pratylenchus brachyurus (Godfrey) с помощью трансгенной сои GMB151, экспрессирующей токсин Cry14Ab-1 Bacillus thuringiensis.

[00180] Была исследована способность Cry14Ab-1 контролировать *P. brachyurus* в полевых условиях. В частности, предполагалось, что объект GMB151, экспрессирующий Cry14Ab-1, может снизить воспроизводства *P. brachyurus* в сое, выращиваемой в полевых условиях, и что это снижение воспроизводства P. brachyurus приведет к значительной защите урожая.

[00181] Материалы и способы:

[00182] Полевые испытания проводили в штатах Парана, Гояс и Мату-Гросу, Бразилия, в течение вегетационного сезона сои 2018/19 годов. Местоположения полевых испытаний описаны ниже в таблице 1:

[00183] Таблица 1. Места произрастания для исследовательских испытаний *Pratylenchus brachyurus*:

Место произрастания	Ожидаемое давление Pratylenchus[a]	Плотность популяции[b]	Обработка семян[c]
Ибипора, Парана	Низкое	H/O[d]	Нет
Лупинополис, Парана	Высокое	47	Да
Рио-Верде, Гояс	Высокое	462	Да
Sinop1, Мату-Гросу	Высокое	976	Да

Sinop2, Мату-Гросу	Низкое	286	Нет
Тринидад, Гояс	Низкое	1	Нет

[a]Давление *Pratylenchus brachyurus*, определенное по образцам почвы предыдущего года, повреждению урожая и данным руководителя фермы. По данным руководителя фермы, на участке с Sinop2 ожидалось низкое давление *Pratylenchus*, однако давление было относительно высоким.

[b]Фактические плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* на каждом исследовательском участке. Плотности популяции указаны как средняя популяция, восстановленная в результате нуль-зиготной обработки через 90 дней после посадки. Плотности популяции указаны как *P. brachyurus* на грамм корневой ткани.

[c]Включение в испытание подучастков обработки семян. Обработка семян была включена в исследовательские испытания только на участках, где ожидалось высокое давление *P. brachyurus*.

[d]Не обнаружено.

[00184] Объект GMB151 был интрогрессирован в фоновую группу спелости сои IX, адаптированную для производства в Бразилии. Интрогрессия была достигнута путем применения линии группы спелости IX в качестве рекуррентного родителя. В поколении BC2:F2 растения, гомозиготные и нуль-зиготные для объекта GMB151, были отобраны для создания двух линий сои, которые различались присутствием или отсутствием объекта GMB151, но в остальном были примерно на 87,5% генетически связаны с рекуррентным родителем.

[00185] Испытания сои проводили на шести исследовательских участках в зависимости от градиента плотностей популяции *P. brachyurus*, как указано в таблице 1. На трех исследовательских участках *P. brachyurus* содержался при плотностях популяции, которые, как ожидается, снизят урожайность сои, в то время как на трех участках не предполагалось, что *P. brachyurus* будет иметь достаточно высокие плотности популяции, чтобы значительно снизить урожайность сои. Ожидания относительно давления вредителей *P. brachyurus* были основаны на образцах урожая сои 2017/18 года или на основе информации, полученной от руководителей ферм.

[00186] Разности в экспериментальном дизайне и испытательной обработке различались на ожидаемых участках с высоким и низким давлением. Предполагаемые исследовательские участки с низким давлением проводились в виде исследований рандомизированного дизайна полного блока с пятью повторениями. Каждый полевой участок состоял из четырех рядов сои длиной 5 м,

расположенных на расстоянии 0,5 м друг от друга. В каждое испытание были включены два варианта обработки: гомозиготная линия GMB151 (гомозиготная) и нуль-зиготная линия GMB151 (нуль-зиготная).

[00187] На трех участках с высоким давлением в испытания были внесены два изменения по сравнению с участками с низким давлением. Во-первых, объект GMB151 оценивали в сочетании с нематицидной обработкой семян. В испытание были включены три обработки семян. Фактор обработки семян был полностью скрещен с фактором обработки зиготности (т. е. гомозиготный или нуль-зиготный), чтобы получить шесть обработок. Шесть обработок были организованы в виде разделенных участков, причем зиготность служила обработкой всей участка, а обработка семян — обработкой подучастка. Подучастки остались того же размера, что и другие участки: четыре ряда сои длиной 5 м, расположенные на расстоянии 76,2 см друг от друга. Второе изменение, внесенное в испытания на участках с высоким давлением, заключалось в сокращении количества повторений с пяти до трех. Количество повторений было уменьшено из-за включения участков обработки семян и ограничений в пространстве, доступном для полевых испытаний.

[00188] Сбор данных:

[00189] Эффективность GMB151 против *P. brachyurus* оценивали путем измерения плотности популяции *P. brachyurus* в корневых системах сои через 90 дней после посадки (dap). Временная точка 90 дней была выбрана, поскольку она приблизительно соответствует времени отбора проб в предыдущих исследованиях *P. brachyurus* (Lima et al. 2015). Через 90 дней корневые системы сои по десять растений на участок были удалены с поля. Из первого и четвертого ряда каждого участка были отобраны пять корневых систем. Эти ряды были выбраны, поскольку они не собирались, и поэтому отбор проб *P. brachyurus* не повлиял бы на оценки урожайности, полученные в конце сезона. Образцы корней были доставлены в лабораторию, где их взвесили, а затем гомогенизировали в смесителе. Затем нематоды выделяли из кусочков корней по методу Дженкинса (1964). Затем извлеченные нематоды суспендировали в воде и подсчитывали количество *P. brachyurus* в подобразце объемом 1 мл под микроскопом. Для каждого образца рассчитывали количество *P. brachyurus* на 1 г корня.

[00190] Урожайность сои оценивали на каждой участке при физиологической зрелости. Убирали два средних ряда каждого четырехрядного участка. В каждом

месте произрастания измеряли массу зерна и влажность, а урожайность стандартизировали до 13% влажности.

[00191] Анализ данных:

[00192] Данные о плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* были проанализированы отдельно для трех местоположений с высоким давлением и трех местоположений с низким давлением. Перед анализом количество *P. brachyurus* на грамм (г) корня было преобразовано в натуральный логарифм, чтобы уменьшить гетероскадность. Данные по урожайности для каждого испытания анализировали отдельно из-за широкого диапазона плотностей популяции *P. brachyurus*, присутствующих в местах проведения исследовательских испытаний, что могло повлиять на количество повреждений, вызванных *P. brachyurus*. Данные об урожайности анализировали в бушелях на акр.

[00193] Данные были проанализированы для оценки влияния зиготности GMB151 на плотности популяции *P. brachyurus* и урожайность сои. Данные были адаптированы к модели ANOVA со смешанными эффектами, и разность между гомозиготными и нуль-зиготными линиями оценивали с 95% доверительным интервалом. В испытаниях, которые не включали подучастки обработки семян, применяли модель, включающую повторение как случайный эффект и зиготность как фиксированный эффект. Взаимодействие повторения и зиготности считалось остаточным членом. В испытаниях, которые включали подучастки обработки семян, в качестве фиксированных эффектов учитывали зиготность, обработку семян и взаимодействие зиготности с обработкой семян. Повторение и все другие взаимодействия между факторами считались случайными эффектами. Взаимодействие повторения и зиготности считалось остаточным членом всего участка, тогда как взаимодействие повторения, зиготности и обработки семян считалось остаточным членом подучастка. Влияние обработки семян на *P. brachyurus*, урожайность сои и их взаимодействие с признаком GMB151 выходит за рамки исследования, представленного в данном случае. Таким образом, данные суммировали только по зиготности для всех обработок семян.

[00194] Результаты:

[00195] Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* в двух местоположениях с высоким давлением (Рио-Верде и Sinop1) и одном местоположении с низким давлением (Sinop2) была выше той, которая, по наблюдениям Lima et al. (2015), вызывала симптомы надземной болезни. В районе Люпинополиса с высоким

давлением усредненные плотности популяции *P. Brachyurus,* которые находились в пределах диапазона Lima et al. (2015), наблюдались за пределами полевых участков с симптомами, и поэтому можно ожидать, что это привело бы к меньшему снижению урожайности, если таковое вообще имело бы место. В двух последних местоположениях с низким давлением (Ибипора и Тринидад) популяции *P. brachyurus* находились на пределе обнаружения и, следовательно, не должны были влиять на урожайность сои.

[00196] Гомозиготная линия сои снизила плотность популяции *P. brachyurus* на 96% в трех местоположениях с высоким давлением ($P < 0,0001$). Гомозиготная линия также значительно снизила популяции *P. brachyurus* на 90% в предполагаемом местоположении с низким давлением, Sinop2 ($P < 0,01$). В отдельных местоположениях проведения испытаний средние снижения *P. brachyurus* находились в диапазоне от 90% до 97% (Фиг. 1).

[00197] На урожайность сои как на участках Лупинополиса, так и на участках Ибипоры отрицательно повлияла плохая группа спелости, соответствующая данному региону. Плохое соответствие привело к низкой абсолютной урожайности при всех испытательных обработках. Урожайность обработки варьировалась от 12,4 до 16,9 буш./акр на этих двух испытательных участках. Урожайность обработки на других четырех местоположениях находилась в диапазоне от 28,0 до 57,1 буш./акр.

[00198] Разность в урожайности между гомозиготными и нуль-зиготными линиями зависела от плотности популяции *P. brachyurus* в месте проведения испытаний (Фиг. 2). Не наблюдалось значительной разности в урожайности между двумя линиями сои ни в одном из трех местоположений с самыми низкими плотностями популяции *P. brachyurus*. На трех участках с самой высокой плотностью популяции *P. brachyurus* наблюдалась значительная разность в урожайности между гомозиготными и нуль-зиготными линиями. Среднее улучшение урожайности гомозиготной линии по сравнению с нуль-зиготной линией в каждом местоположении составило 6,2–7,8 буш./акр или 14–25%.

[00199] Обсуждение:

[00200] В шести выбранных исследовательских участках плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* варьировались от ниже предела обнаружения до почти 1000 нематод на грамм корневой ткани. Шесть участков дали возможность оценить эффективность трансгенного объекта сои GMB151 против *P. brachyurus* и его

способность защищать урожай сои. Объект GMB151 оказался высокоэффективным против *P. brachyurus*. Через три месяца вегетационного сезона популяции *P. brachyurus* были в среднем на >90% ниже у линии сои, гомозиготной для объекта GMB151 по сравнению с нуль-зиготной линией. Этот уровень контроля намного превышает уровень, обеспечиваемый нынешними методами управления, включая севооборот, пар и химический контроль (Lima et al. 2015, Ribeiro et al. 2014, Rodrigues et al. 2014).

[00201] Польза объекта GMB151 для защиты урожая сои зависела от плотности популяции *P. brachyurus*. При низком давлении *P. brachyurus* признак GMB151 не влиял на урожайность сои. Этот результат указывает на то, что в отсутствие *P. brachyurus* GMB151 не оказывает какого-либо негативного влияния на урожайность сои. В каждом из трех мест проведения испытаний с самыми высокими плотностями популяции *P. brachyurus* урожайность сои была значительно выше у линии сои, гомозиготной по признаку GMB151. Повышение урожайности сои на этих участках варьировалось от 14 до 25%. Таким образом, результаты по изобретению согласуются с предыдущими исследованиями, в которых повреждение урожая *P. brachyurus* оценивали в пределах 10–30% (Dias et al. 2007, Franchini et al. 2007).

[00202] Результаты полевых испытаний, представленные в данном случае, показывают, что признак сои GMB151, экспрессирующий Cry14Ab1, обеспечивает значительную эффективность против *P. brachyurus*, что приводит к повышению урожайности сои. Эти результаты были получены в условиях полевого производства, когда плотности популяции *P. brachyurus* находились в диапазоне, указанном для коммерческих производственных полей в Бразилии (Franchini et al. 2007, Lima et al. 2015). Таким образом, признак GMB151 представляет собой потенциально уникальный новый инструмент борьбы с экономически важным вредителем сельскохозяйственных культур, в отношении которого на сегодняшний день имеется мало жизнеспособных вариантов борьбы.

[00203] Ссылки для примера 2:

[00204] Barbosa, B. F. F., J. M. dos Santos, J. C. Barbosa, P. L. M. Soares, A. R. Ruas, and R. B. de Carvalho. 2013. Aggressiveness of Pratylenchus brachyurus to the sugarcane, compared with key nematode P. zeae. Nematropica 43: 119–130.

[00205] Dias, W. P., N. R. Ribeiro, I. O. N. Lopes, A. Garcia, G. E. S. Carneiro, and J. F. V. Silva. 2007. Manejo de nematoides na cultura da soja. In: Congresso Brasileiro

de Nematologia; 12 August; Goiâna, Brazil. Goiâna: Sociedade Brasileira de Nematologia. p 26–30.

[00206] Franchini, J. C., O. F. Saraiva, H. Debiase, and S. L. Goncalves. 2007. Contribuição de sistema de manejo do solo para produção sustentável da soja. Circular Técnica 46:1–4.

[00207] Inomoto, M. M., A. M. C. Goulart, A. C. Z. Machado, and A. R. Monteiro. 2001. Effect of population densities of Pratylenchus brachyurus on the growth of cotton plants. Fitopatologia Brasileira 26: 192–196.

[00208] Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 692.

[00209] Lima, F. S. D. O., G. R. D. Santos, S. R. Nogueira, P. R. R. D. Santos, and V. R. Correa. 2015. Population dynamics of the root lesion nematode, Pratylenchus brachyurus, in soybean fields in Tocantins State and its effect to soybean yield. Nematropica 45: 170–177.

[00210] Lima, F. S. O., V. R. Correa, S. R. Nogueira, and P. R. R. Santos. 2017. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. Intech doi: 10.5772/67030.

[00211] Ribeiro, N. R., W. P. Dias, and J. M. Santos. 2010. Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja no estado do Mato Grosso. Boletim de Pesquisa de Soja. Fundação MT, Rondonópolis, MT, 289–296.

[00212] Ribeiro, L. M, H. D. Campos, C. R. Dias-Arieira, D. L. Neves, and G. C. Ribeiro. 2014. Effect of soybean seed treatment on the population dynamics of Pratylenchus brachyurus under water stress conditions. Bioscience Journal 30: 616-622.

[00213] Rios, A. D. F., M. R. Rocha, A. S. Machado, K. A. G. B. Avila, R. A. Teixeira, L. C. Santos, and L. R. S. Rabelo. 2016. Host suitability of soybean and corn genotypes to the lesion caused by nematode under natural infestation conditions. Ciência Rural. 46: 580–584.

[00214] Rodrigues, D. B., C. R. Dias-Arieira, M. V. V. Vedoveto, M. Roldi, H. F. D. Molin, and V. H. F. Abe. 2014. Crop rotation for Pratylenchus brachyurus control in soybean. Nematropica 44: 146–151.

[00215] Wei, J., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wong, S. Fang, and F. V. Aroian. 2003. Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 2760–2765.

Пример 3. Трансгенная соя GMB151, экспрессирующая токсин Cry14Ab-1 *Bacillus thuringiensis*, обеспечивает нематицидную защиту в культурах сафриньи («второй урожай»).

[00216] Бразильская система выращивания сои позволяет получать два урожая за календарный год. Первичный вегетационный сезон, называемый «сафра», начинается с посадки сои в сентябре-декабре. Сбор урожая сои сезона сафра происходит в период с января по март. Сразу после сбора урожая сои высевают второй сезонный урожай, называемый «сафринья». Затем урожай сафриньи собирают в мае-августе. В системе выращивания сои наиболее распространенными культурами сафриньи в Бразилии являются кукуруза и хлопок. В Бразилии соя, кукуруза и хлопок восприимчивы к паратизирующей на растениях нематоде *Pratylenchus brachyurus*. Таким образом, было изучено, может ли посадка сои GMB151 в сезон сафра обеспечить подавление нематод в последующих культурах сезона сафринья, восприимчивых к нематодам.

[00217] Две линии сои, одна гомозиготная и одна нуль-зиготная по признаку GMB151, были высажены на производственных полях, зараженных *P. brachyurus*. В 2018 и 2019 гг. для исследования были применены три поля, зараженные *P. brachyurus*. Полевые испытания сои состояли из трех (2018 г.) или пяти (2019 г.) повторений, организованных в рандомизированном полном блочном дизайне с отдельными участками длиной 6 метров и шириной 12 рядов сои. Сразу после пробного сбора сои в апреле/мае 2019 и 2020 годов на той же земле был посажен урожай сафриньи. В 2019 году в качестве культуры сафриньи была посажена ветвянка. Участки ветвянки были посажены параллельно рядам собранной сои в каждом местоположении. Три повторения ветвянки были посажены поверх полевой испытательной земли для сои. Таким образом, участки имели длину 6 метров и ширину 12 рядов. В апреле 2020 года вслед за соей в качестве культур сафриньи были посажены кукуруза и хлопок. Три повторения участков кукурузы и три повторения участков хлопка были засажены поверх испытательного участка сои. Ряды кукурузы и хлопка были засажены перпендикулярно рядам собранной сои. Участки хлопка были засажены поверх первого, второго повторения и первых трех м третьего повторения. Участки кукурузы были засажены поверх пятого, четвертого и последних трех м третьего повторения. Таким образом, участки хлопка и кукурузы имели длину 9 м, причем два повторения имели ширину в 8 рядов, а третье повторение каждой культуры имело ширину в 4 ряда (Фиг. 3).

[00218] Были собраны данные, чтобы определить, будет ли обеспечена защита от *P. brachyurus* культурам сафриньи, посаженным после сои GMB151. Защиту культур сафриньи оценивали путем измерения плотностей популяции *P. brachyurus* и урожайности сельскохозяйственных культур. Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* измеряли как количество нематод на грамм корневой ткани. Плотности популяции *P. brachyurus* измеряли через 30 дней после посева (dap), 60 dap и 90 dap в культурах сафриньи. Для каждого измерения *P. brachyurus* собирали корневую систему десяти растений с каждого участка. Пять корней собирали из первого и последнего ряда каждого участка. Образцы из средних рядов не отбирались, поскольку образцы корней разрушительны и могут помешать сбору данных об урожайности из средних рядов каждого участка. Урожай зерна собран со средних рядов участков хлопка и кукурузы сафринья в августе 2020 года. Ветвянку выращивают как пастбищную культуру, поэтому урожай на участках ветвянки в 2019 году не собирали.

[00219] Анализировали данные, чтобы оценить, различались ли плотности популяции *P. brachyurus* и урожайность зерна на участках после сои GMB151 по сравнению с традиционной соей. Данные анализировали отдельно для каждой культуры сафриньи; кукурузы, хлопка и ветвянки. Все данные анализировали с помощью модели ANOVA со смешанными эффектами. Модели включали фиксированные эффекты местоположения, зиготности GMB151 и их взаимодействия. Экспериментальное повторение считалось случайным эффектом.

[00220] Обсуждение:

[00221] Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* были значительно снижены во всех трех культурах сафриньи за счет предшествующего посева сои GMB151 в сезон сафра. В зависимости от культуры сафриньи, местоположения проведения испытаний и момента отбора образцов плотности популяции *P. brachyurus* снижались на 28–100%, при среднем снижении на 87%. Не было четких указаний на то, что подавление популяции *P. brachyurus* уменьшилось в течение сезона сафриньи на любой из трех культур или что произошло возобновление популяции нематод. Таким образом, посадка сои GMB151 снизила популяцию *P. brachyurus* во всей системе земледелия (см., например, Фиг. 8), начиная с культуры сои сафра и заканчивая сбором урожая культуры сафриньи. Соя GMB151 снизила популяцию *P. brachyurus* на 99% в конце сезона сои, что привело к значительному подавлению *P. brachyurus* на протяжении всего сезона культуры сафриньи, от

посева до сбора урожая культуры кукурузы сафриньи (Фиг. 4 и Фиг. 7) и культуры хлопка сафриньи (Фиг. 7).

[00222] Защита культур сафриньи привела к существенному повышению урожайности в случае выращивании кукурузы в Риу-Верде, Мату-Гросу. Например, как показано на Фиг. 5, контроль *P. brachyurus*, обеспечиваемый соей GMB151, привел к количественному повышению урожайности сои и значительному увеличению урожайности кукурузы в сезон выращивания культур сафриньи. Повышение урожайности, обеспечиваемое GMB151 в результате борьбы с *P. brachyurus*, принесло фермеру примерно 90 долларов США за акр в виде увеличения валового дохода. Оценка валового дохода основана на средних ценах на зерно в Бразилии, составляющих 9,00 доллара США за бушель сои и 6,30 доллара США за бушель кукурузы.

[00223] Данные, представленные в этом примере, демонстрируют, что включение высокоэффективного трансгенного нематицидного белка в культуру-хозяина может обеспечить защиту не только преобразованной культуры, но и восприимчивых культур, которые чередуются с преобразованной культурой или впоследствии высаживаются в том же месте произрастания, что и преобразованная культура. Это обеспечивает эффективный способ борьбы с нематодами во всей производственной фермерской системе. Преобразование одной культуры для обеспечения защиты всей производственной системы ограничивает затраты на разработку и регулирование, связанные с производством и регистрацией трансгенной культуры. Это также обеспечивает экономически эффективный способ придания устойчивости к нематодам сельскохозяйственным культурам, где нативная устойчивость недоступна, что является особенно распространенной проблемой с мигрирующими нематодами, паразитирующими на растениях, такими как *Pratylenchus* spp. Данный подход также дает возможность обеспечить защиту от трансгенных нематод сельскохозяйственных культур, таких как пшеница, где принятие трансгенного зерна конечным потребителем может быть препятствием, но *Pratylenchus* spp. может быть серьезным патогеном, снижающим урожайность, причем существует мало эффективных вариантов борьбы с ней.

[00224] В одном варианте осуществления трансгенная соя GMB151 приносит бразильским производителям значительные преимущества в управлении урожайностью и системой земледелия. Высокая эффективность GMB151 против *P. brachyurus* обеспечивает производителям защиту сои сафра и защиту нескольких

видов сельскохозяйственных культур сафринья. Именно это преимущество для культур сафриньи также дает производителям свободу и гибкость в их производственной системе для выбора наиболее прибыльного и сельскохозяйственно выгодного севооборота, независимо от восприимчивости культуры к *P. brachyurus*.

[00225] Ссылки для примера 3:

[00226] Barker, K. R., and S. R. Koenning. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. Annual Review of Phytopathology 36: 165–205.

[00227] Cook, R. 2004. Genetic resistance to nematodes: where is it useful? Australasian Plant Pathology 33: 139–150.

[00228] Inagaki, H., and M. Tsutsumi. 1971. Survival of the soybean cyst nematode Heterodera glycines Ichinohe (Tylenchida: Heteroderidae) under certain storage conditions. Applied Entomology and Zoology 6: 156–162.

[00229] IRAC. 2018. Nematicide resistance risk statement. https://irac-online.org/teams/nematodes.

[00230] Nicol, J. M., S. J. Turner, D. L. Coyne, L. den Nijs, S. Hockland, and Z. T. Maafi. 2011. Current nematode threats to world agriculture, in: J. Jones, G. Gheysen, C. Fenoll (Eds.), Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interaction, Springer, Germany, pp. 21– 43.

[00231] Wei, J., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wong, S. Fang, and F. V. Aroian. 2003. Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 2760–2765.

Пример 4. Борьба с корневой ранящей нематодой Pratylenchus brachyurus (Godfrey) с помощью трансгенной сои GMB151, экспрессирующей токсин Cry14Ab-1 Bacillus thuringiensis.

[00232] В дополнение к экспериментам, описанным в примере 2, дополнительно исследовали способность Cry14Ab-1 контролировать *P. brachyurus* в полевых условиях. В частности, предполагалось, что объект GMB151, экспрессирующий Cry14Ab-1, может снизить воспроизводство *P. brachyurus* в сое, выращенной в полевых условиях, и что это снижение воспроизводства *P. brachyurus* приведет к значительной защите урожая.

[00233] Материалы и способы:

[00234] Полевые испытания были проведены в штатах Баия, Гояс, Мату-Гросс, Парана и Сан-Паулу, Бразилия, в течение сезонов выращивания сои 2018/19,

2019/20 и 2020/21 годов. В общей сложности за три сезона сафра было посажено 49 опытных образцов сои.

[00235] Объект GMB151 был внедрен в несколько фонов выращивания сои от MG VI до IX, каждый из которых адаптирован для производства в Бразилии. Интрогрессия была достигнута путем применения адаптированного бразильского происхождения в качестве рекуррентного родителя. Для каждого фона в поколениях BC2:F2 или BC3:F2 были отобраны гомозиготные и нуль-зиготные по объекту GMB151 растения для создания двух линий сои, которые различались присутствием или отсутствием объекта GMB151, но в остальном были примерно на 87,5% BC2:F2) или 93,75% (BC3:F2) генетически связаны с рекуррентным родителем.

[00236] Испытания сои были проведены на исследовательских участках, зараженных *P. brachyurus* с диапазоном плотностей популяции.

[00237] В экспериментальном дизайне и испытательной обработке были различия на разных испытательных участках. Каждый из 49 испытательных участков включал в себя два основных участка обработки, воспроизведенных в рандомизированном полном блоке с пятью-шестью повторениями. Двумя основными обработками участков, включенными в каждое испытание, были (1) линия BC2:F2 или BC3:F2, гомозиготная по признаку GMB151, и (2) соответствующая линия BC2:F2 или BC3:F2, нуль-зиготная по признаку GMB151. Дополнительные обработки разделенных участков были включены в подмножество местоположений. Девять местоположений прошли обработку химическими нематицидами на отдельных участках. В этих девяти местоположениях каждую линию сои обрабатывали (1) базовой обработкой семян фунгицидом/инсектицидом, (2) базовой обработкой семян фунгицидом/инсектицидом и обработкой семян нематицидом, и (3) базовой обработкой семян фунгицидом/инсектицидом и внесение в борозды жидкого нематицида. В трех других местоположениях применяли несколько другой дизайн испытаний, в котором основной обработкой участка был уровень обработки почвы: традиционная обработка почвы или нулевая обработка почвы. Затем обработкой на разделенных участках на этих трех участках была линия сои, либо гомозиготная по признаку GMB151, либо нуль-зиготная.

[00238] Во всех местоположениях участки имели длину 5 м и ширину в четыре ряда.

[00239] Сбор данных:

[00240] Эффективность GMB151, химических нематицидов и обработки почвы против *P. brachyurus* оценивали путем измерения плотности популяции *P. brachyurus* в корневой системе сои через 90 дней после посадки (dap). Временная точка 90 дней была выбрана, поскольку она приблизительно соответствует времени отбора проб в предыдущих исследованиях *P. brachyurus* (Lima et al. 2015). Через 90 дней корневые системы сои по десять растений на участок были удалены с поля. Из первого и четвертого ряда каждого участка отбирали от трех до пяти корневых систем. Эти ряды были выбраны, поскольку они не собирались, и поэтому отбор проб *P. brachyurus* не повлиял бы на оценки урожайности, полученные в конце сезона. Образцы корней были доставлены в лабораторию, где их взвесили, а затем гомогенизировали в смесителе. Затем нематоды выделяли из кусочков корней по методу Дженкинса (1964). Затем извлеченные нематоды суспендировали в воде и подсчитывали количество *P. brachyurus* в подобразце объемом 1 мл под микроскопом. Для каждого образца рассчитывали количество *P. brachyurus* на 1 г корня.

[00241] Урожайность сои оценивали на каждой участке при физиологической зрелости. Убирали два средних ряда каждого четырехрядного участка. В каждом месте произрастания измеряли массу зерна и влажность, а урожайность стандартизировали до 13% влажности.

[00242] Анализ данных:

[00243] Сначала были проанализированы данные о плотности популяции и урожайности *Pratylenchus brachyurus* во всех местоположениях, чтобы оценить влияние GMB151 на плотности популяции *P. brachyurus*. Перед анализом количество *P. brachyurus* на грамм (г) корня было преобразовано в натуральный логарифм, чтобы уменьшить гетероскадность. Данные об урожайности анализировали в бушелях на акр.

[00244] Затем данные о плотности популяции и урожайности *Pratylenchus brachyurus* были проанализированы отдельно для девяти исследований по оценке химических нематицидов в сочетании с GMB151. Затем был выполнен третий анализ для оценки трех испытательных местоположений, сравнивающий методы обработки почвы и признак GMB151 для контроля *Pratylenchus brachyurus* и защиты урожая сои.

[00245] Результаты:

[00246] Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* на нулевой линии GMB151 были выше тех, которые наблюдалась Lima et al. (2015) как вызывающая симптомы надземного заболевания в 33 из 49 испытаний.

[00247] Гомозиготная линия сои снизила плотности популяции *P. brachyurus* на 91% в 49 испытаниях ($P < 0,0001$) (Фиг. 9). Признак GMB151 также значительно улучшил урожайность сои в среднем на 4,2 буш./акр или 9% (Фиг. 10). Гомозиготная линия обеспечивала значительно лучший контроль *P. brachyurus*, чем обработка семян или обработка бороздовыми нематицидом (Фиг. 11). Гомозиготная линия также обеспечивала значительно больший контроль, чем традиционная обработка почвы (Фиг. 12).

[00248] Разность в урожайности между гомозиготными и нуль-зиготными линиями зависела от плотности популяции *P. brachyurus* в месте проведения испытаний, причем больший выигрыш в урожайности обычно наблюдался в испытаниях с более высокими плотностями популяции *P. brachyurus*. В среднем у гомозиготной линии урожайность сои была на 4,2 буш./акр, или на 9,4% выше, чем у нулевой линии (Фиг. 2).

[00249] Обсуждение:

[00250] В 49 проведенных научных исследованиях плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* варьировались от почти предела обнаружения до почти 1000 нематод на грамм корневой ткани. Испытания дали возможность оценить эффективность трансгенного объекта сои GMB151 против *P. brachyurus* и его способность защищать урожай сои. Объект GMB151 оказался высокоэффективным против *P. brachyurus*. Через три месяца вегетационного сезона популяции *P. brachyurus* были в среднем на >90% ниже у линии сои, гомозиготной для объекта GMB151 по сравнению с нуль-зиготной линией. Этот уровень контроля намного превышает уровень, обеспечиваемый нынешними методами управления, включая севооборот, пар и химический контроль (Lima et al. 2015, Ribeiro et al. 2014, Rodrigues et al. 2014).

[00251] Результаты полевых испытаний, представленные в данном случае, показывают, что признак сои GMB151, экспрессирующий Cry14Ab1, обеспечивает значительную эффективность против *P. brachyurus*, что приводит к повышению урожайности сои. Эти результаты были получены в условиях полевого производства, когда плотности популяции *P. brachyurus* находились в диапазоне, указанном для коммерческих производственных полей в Бразилии (Franchini et al.

2007, Lima et al. 2015). Таким образом, признак GMB151 представляет собой потенциально уникальный новый инструмент борьбы с экономически важным вредителем сельскохозяйственных культур, в отношении которого на сегодняшний день имеется мало жизнеспособных вариантов борьбы.

[00252] Ссылки для примера 4:

[00253] Barbosa, B. F. F., J. M. dos Santos, J. C. Barbosa, P. L. M. Soares, A. R. Ruas, and R. B. de Carvalho. 2013. Aggressiveness of Pratylenchus brachyurus to the sugarcane, compared with key nematode P. zeae. Nematropica 43: 119–130.

[00254] Dias, W. P., N. R. Ribeiro, I. O. N. Lopes, A. Garcia, G. E. S. Carneiro, and J. F. V. Silva. 2007. Manejo de nematoides na cultura da soja. In: Congresso Brasileiro de Nematologia; 12 August; Goiâna, Brazil. Goiâna: Sociedade Brasileira de Nematologia. p 26–30.

[00255] Franchini, J. C., O. F. Saraiva, H. Debiase, and S. L. Goncalves. 2007. Contribuição de sistema de manejo do solo para produção sustentável da soja. Circular Técnica 46:1–4.

[00256] Inomoto, M. M., A. M. C. Goulart, A. C. Z. Machado, and A. R. Monteiro. 2001. Effect of population densities of Pratylenchus brachyurus on the growth of cotton plants. Fitopatologia Brasileira 26: 192–196.

[00257] Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 692.

[00258] Lima, F. S. D. O., G. R. D. Santos, S. R. Nogueira, P. R. R. D. Santos, and V. R. Correa. 2015. Population dynamics of the root lesion nematode, Pratylenchus brachyurus, in soybean fields in Tocantins State and its effect to soybean yield. Nematropica 45: 170–177.

[00259] Lima, F. S. O., V. R. Correa, S. R. Nogueira, and P. R. R. Santos. 2017. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. Intech doi: 10.5772/67030.

[00260] Ribeiro, N. R., W. P. Dias, and J. M. Santos. 2010. Distribuição de fitonematoides em regiões produtoras de soja no estado do Mato Grosso. Boletim de Pesquisa de Soja. Fundação MT, Rondonópolis, MT, 289–296.

[00261] Ribeiro, L. M, H. D. Campos, C. R. Dias-Arieira, D. L. Neves, and G. C. Ribeiro. 2014. Effect of soybean seed treatment on the population dynamics of Pratylenchus brachyurus under water stress conditions. Bioscience Journal 30: 616–622.

[00262] Rios, A. D. F., M. R. Rocha, A. S. Machado, K. A. G. B. Avila, R. A. Teixeira, L. C. Santos, and L. R. S. Rabelo. 2016. Host suitability of soybean and corn genotypes to the lesion caused by nematode under natural infestation conditions. Ciência Rural. 46: 580–584.

[00263] Rodrigues, D. B., C. R. Dias-Arieira, M. V. V. Vedoveto, M. Roldi, H. F. D. Molin, and V. H. F. Abe. 2014. Crop rotation for Pratylenchus brachyurus control in soybean. Nematropica 44: 146–151.

[00264] Wei, J., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wong, S. Fang, and F. V. Aroian. 2003. Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 2760–2765.

Пример 5. Трансгенная соя GMB151, экспрессирующая токсин Cry14Ab-1 Bacillus thuringiensis, обеспечивает нематицидную защиту в культурах сафриньи («второй урожай»).

[00265] Опираясь на эксперименты, описанные в примере 3, и расширяя их, в этом примере была предпринята попытка дополнительно определить, может ли посадка сои GMB151 в сезон сафра обеспечить подавление нематод в последующих культурах сезона сафринья, чувствительных к нематодам.

[00266] Две линии сои, одна гомозиготная и одна нулевая по признаку GMB151, были посажены на производственных полях в течение сезона производства сайры на полях, зараженных *P. brachyurus*. Сразу после пробного сбора сои в апреле/мае 2019, 2020 и 2021 годов поверх той же земли был посажен обычный урожай сафриньи. Каждое испытание урожая сафриньи состояло из трех повторений, организованных в рандомизированный полный блочный дизайн. В 2019 году в качестве культуры сафриньи была посажена брахиария (ветвянка). Участки ветвянки были посажены параллельно рядам собранной сои в каждом местоположении. Участки имели длину 5 метров и ширину в 12 рядов. В апреле 2020 и 2021 годов вслед за соей в качестве культур сафриньи были посажены кукуруза и хлопок. Три повторения участков кукурузы и три повторения участков хлопка были засажены поверх испытательного участка сои. Ряды кукурузы и хлопка были посажены перпендикулярно рядам собранной сои. Участки хлопка были засажены поверх первого, второго повторения и первых трех м третьего повторения. Участки кукурузы были засажены поверх пятого, четвертого и последних трех м третьего повторения. Таким образом, участки хлопка и кукурузы

имели длину 9 м, причем два повторения имели ширину в 8 рядов, а третье повторение каждой культуры имело ширину в 4 ряда (Фиг. 3). В 2021 году в трех местоположениях испытания сафриньи на хлопке были заменены испытаниями сафриньи на сорго.

[00267] Были собраны данные, чтобы определить, будет ли обеспечена защита от *P. brachyurus* восприимчивых культур сафриньи, посаженных после сои GMB151. Защиту культур сафриньи оценивали путем измерения плотностей популяции *P. brachyurus* и урожайности сельскохозяйственных культур. Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* измеряли как количество нематод на грамм корневой ткани. Плотности популяции *P. brachyurus* измеряли через 30 дней после посева (dap), 60 dap и 90 dap в культурах сафриньи. Для каждого измерения *P. brachyurus* собирали корневую систему десяти растений с каждого участка. Из первого и последнего ряда каждого участка собирали от трех до пяти корней. Образцы из средних рядов не отбирались, поскольку образцы корней разрушительны и могут помешать сбору данных об урожайности из средних рядов каждого участка. Урожай зерна был собран со средних рядов участков хлопка, кукурузы и сорго сафринья в августе 2020 и 2021 годов. Брахиарию выращивают как пастбищную культуру, поэтому урожай на участках ветвянки в 2019 году не собирали.

[00268] Анализировали данные, чтобы оценить, различались ли плотности популяции *P. brachyurus* и урожайность зерна на участках после сои GMB151 по сравнению с традиционной соей. Данные анализировали отдельно для каждой культуры сафриньи; кукурузы, хлопка, сорго и брахиарии. Все данные анализировали с помощью модели ANOVA со смешанными эффектами. Модели включали фиксированные эффекты местоположения, зиготности GMB151 и их взаимодействия. Экспериментальное повторение считалось случайным эффектом.

[00269] Обсуждение:

[00270] Плотности популяции *Pratylenchus brachyurus* были значительно снижены во всех четырех культурах сафриньи за счет предшествующего посева сои GMB151 в течение сезона сафра (Фиг. 13). В зависимости от культуры сафриньи плотности популяции *brachyurus* снижались в среднем на 66–93% через 90 дней после посадки, причем среднее снижение составляло 80%. Не было четких указаний на то, что подавление популяции *P. brachyurus* уменьшилось в течение сезона сафриньи на любой из трех культур или что произошло возобновление

популяции нематод. Таким образом, посадка сои GMB151 снизила популяцию *P. brachyurus* во всей системе земледелия (см., например, Фиг. 8), начиная с культуры сои сафра и заканчивая сбором урожая культуры сафриньи. Это привело к повышению урожайности как культуры сои сафра (Фиг. 10), так и последующих культур сафринья (Фиг. 7). В данном иллюстративном местоположении соя GMB151 снизила популяцию *P. brachyurus* на 99% в конце сезона сои, что привело к значительному подавлению *P. brachyurus* на протяжении всего сезона культуры сафриньи, от посева до сбора урожая культуры кукурузы сафриньи (Фиг. 4 и Фиг. 6) и культуры хлопка сафриньи (Фиг. 6).

[00271] Защита культур сафриньи привела к существенному повышению урожайности в случае выращивании кукурузы в Риу-Верде, Мату-Гросу. Например, как показано на Фиг. 5, контроль *P. brachyurus*, обеспечиваемый соей GMB151, привел к количественному повышению урожайности сои и значительному увеличению урожайности кукурузы в сезон выращивания культур сафриньи. Повышение урожайности, обеспечиваемое GMB151 в результате борьбы с P. *brachyurus*, принесло фермеру примерно 90 долларов США за акр в виде увеличения валового дохода. Оценка валового дохода основана на средних ценах на зерно в Бразилии, составляющих 9,00 доллара США за бушель сои и 6,30 доллара США за бушель кукурузы.

[00272] Данные, представленные в примере 3 и в этом примере 5, демонстрируют, что включение высокоэффективного трансгенного нематицидного белка в культуру-хозяина может обеспечить защиту не только преобразованной культуры, но и восприимчивых культур, которые чередуются с преобразованной культурой или впоследствии высаживаются в том же месте произрастания, что и преобразованная культура. Это обеспечивает эффективный способ борьбы с нематодами во всей производственной фермерской системе. Преобразование одной культуры для обеспечения защиты всей производственной системы ограничивает затраты на разработку и регулирование, связанные с производством и регистрацией трансгенной культуры. Это также обеспечивает экономически эффективный способ придания устойчивости к нематодам сельскохозяйственным культурам, где нативная устойчивость недоступна, что является особенно распространенной проблемой с мигрирующими нематодами, паразитирующими на растениях, такими как *Pratylenchus* spp. Данный подход также дает возможность обеспечить защиту от трансгенных нематод сельскохозяйственных культур, таких как пшеница, где

принятие трансгенного зерна конечным потребителем может быть препятствием, но *Pratylenchus* spp. может быть серьезным патогеном, снижающим урожайность, причем существует мало эффективных вариантов борьбы с ней.

[00273] В одном варианте осуществления трансгенная соя GMB151 приносит бразильским производителям значительные преимущества в управлении урожайностью и системой земледелия. Высокая эффективность GMB151 против *P. brachyurus* обеспечивает производителям защиту сои сафра и защиту нескольких видов сельскохозяйственных культур сафринья. Именно это преимущество для культур сафриньи также дает производителям свободу и гибкость в их производственной системе для выбора наиболее прибыльного и сельскохозяйственны выгодного севооборота, независимо от восприимчивости культуры к *P. brachyurus*.

[00274] Воздействия, показанные в данном документе в отношении одного восприимчивого к нематодам растения, можно также ожидать на хозяевах, имеющих такую же восприимчивость к нематодам. Ниже приведена таблица, показывающая восприимчивость некоторых распространенных культур:

Культура	Бразильская площадь в акрах (миллион акров)	Приемлемость хозяина *P. Brachyurus*
Ветвянка‡	251,9	Хороший хозяин
Соя	99,8	Хороший хозяин
Кукуруза	51,4	Хороший хозяин
Просо*	12,4	Слабый хозяин
Обыкновенная фасоль	7,2	Хороший хозяин
Пшеница	6,7	Хороший хозяин
Рис	4,2	Хороший хозяин
Хлопок	4,0	Хороший хозяин

Сорго	2,2	Хороший хозяин
Овес	1,1	Хороший хозяин
Подсолнечник	0,1	Слабый хозяин

‡ Оценка площади пастбищ в акрах.

*Включает акры покровных культур

Оценочные площади посевных площадей см. также в Camila Thaiana Rueda da Silva et al., Agriculture 2020, 10, 13; doi:10.3390/agriculture10010013; Renato Lara De Assis et al., Expl Agric.: page 1 of 20 ©Cambridge University Press 2017 doi:10.1017/S0014479717000333; and U.S. Department of Agriculture, "World Agricultural Production", Foreign Agriculture Service, Global Market Analysis, Circular Series WAP 2-22, February 2022.

[00275] Ссылки для примера 5:

[00276] Barker, K. R., and S. R. Koenning. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. Annual Review of Phytopathology 36: 165–205.

[00277] Cook, R. 2004. Genetic resistance to nematodes: where is it useful? Australasian Plant Pathology 33: 139–150.

[00278] Inagaki, H., and M. Tsutsumi. 1971. Survival of the soybean cyst nematode Heterodera glycines Ichinohe (Tylenchida: Heteroderidae) under certain storage conditions. Applied Entomology and Zoology 6: 156–162.

[00279] IRAC. 2018. Nematicide resistance risk statement. https://irac-online.org/teams/nematodes.

[00280] Nicol, J. M., S. J. Turner, D. L. Coyne, L. den Nijs, S. Hockland, and Z. T. Maafi. 2011. Current nematode threats to world agriculture, in: J. Jones, G. Gheysen, C. Fenoll (Eds.), Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interaction, Springer, Germany, pp. 21– 43.

[00281] Wei, J., K. Hale, L. Carta, E. Platzer, C. Wong, S. Fang, and F. V. Aroian. 2003. Bacillus thuringiensis crystal proteins that target nematodes. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 2760–2765.

[00282] Все публикации и патентные заявки, упомянутые в описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в

настоящий документ путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана как включенная путем ссылки.

[00283] Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера для ясности понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть реализованы на практике в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Способ подавления популяции нематод в месте произрастания, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания, причем выращивание устойчивого к нематодам растения подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания в течение периода времени во время и/или после выращивания устойчивого к нематодам растения.

2. Способ по п. 1, в котором период времени охватывает один или более вегетационных сезонов, следующих за вегетационным сезоном, в течение которого выращивали устойчивое к нематодам растение.

3. Способ по п. 1 или п. 2, дополнительно включающий выращивание вторичного растения в месте произрастания после выращивания устойчивого к нематодам растения.

4. Способ по п. 1 или п. 2, дополнительно включающий выращивание вторичного растения в месте произрастания перед выращиванием устойчивого к нематодам растения в месте произрастания.

5. Способ по п. 1 или п. 2, дополнительно включающий выращивание устойчивого к нематодам растения одновременно со вторичным растением.

6. Способ по любому из пп. 3 - 5, в котором вторичное растение представляет собой восприимчивое к нематодам растение.

7. Способ по любому из пп. 1 - 6, в котором популяцию нематод подавляют или поддерживают на уровне или ниже предела обнаружения.

8. Способ по любому из пп. 3 - 6, в котором вторичное растение представляет собой брахиарию, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня.

9. Способ по любому из пп. 3 - 6, в котором вторичное растение представляет собой кукурузу, и подавление популяции нематод достигается тогда,

когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 300 нематод на грамм корня.

10. Способ по любому из пп. 3 - 6, в котором вторичное растение представляет собой хлопок, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 60 нематод на грамм корня.

11. Способ по любому из пп. 3 - 6, в котором вторичное растение представляет собой сорго, и подавление популяции нематод достигается тогда, когда количество нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250 нематод на грамм корня.

12. Способ по любому из пп. 3 - 11, в котором подавление популяции нематод в месте произрастания, в котором выращивают вторичное растение, достигается тогда, когда наблюдается, наблюдается примерно или наблюдается по меньшей мере примерно 5%-е снижение количества нематод на грамм корня по сравнению с количеством нематод на грамм корня в месте произрастания, сопоставимом с местом произрастания, в котором выращивают вторичное растение.

13. Способ защиты восприимчивого к нематодам растения от ущерба или повреждения нематодами, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере за один вегетационный сезон перед посадкой восприимчивого к нематодам растения; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в течение одного вегетационного сезона после выращивания устойчивого к нематодам растения.

14. Способ повышения урожайности восприимчивого к нематодам растения, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере за один вегетационный сезон перед посадкой восприимчивого к нематодам растения; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания по меньшей мере в течение одного вегетационного сезона после выращивания устойчивого к нематодам растения.

15. Способ по п. 14, в котором увеличенную урожайность восприимчивого к нематодам растения сравнивают с урожайностью восприимчивого к нематодам растения, выращенного в том же или сопоставимом месте произрастания, в котором устойчивую к нематодам культуру не выращивали в течение самого последнего цикла севооборота.

16. Способ по любому из пп. 3 - 15, в котором восприимчивое к нематодам растение представляет собой многолетнее растение или однолетнее растение.

17. Способ по любому из пп. 3 - 16, в котором восприимчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение картофеля, растение пшеницы, овощное растение, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, плодовое растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево), декоративное растение или виноградную лозу.

18. Способ по любому из пп. 1 - 17, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует нематицидный белок Cry.

19. Способ по любому из пп. 1 - 18, в котором устойчивое к нематодам растение представляет собой растение сои, растение кукурузы, растение хлопка, растение канолы, растение сахарного тростника, растение сахарной свеклы, растение картофеля, растение пшеницы, растение риса, растение люцерны, растение ячменя, растение сорго, растение овса, растение ржи, растение маниоки, растение батата, растение подсолнечника, овощное растение, плодовое растение, декоративное растение, садовое растение (например, фруктовое или ореховое дерево) или виноградную лозу.

20. Способ по любому из пп. 1 - 19, в котором нематода представляет собой вид нематод, выбранный из популяций нематод Pratylenchus spp., например Pratylenchus brachyurus, Meloidogyne spp., Heterodera spp., например Heterodera glycines, Globodera spp., Rotylenchulus reniformis, Helicotylenchus spp., например

Helicotylenchus dihystera, Scutellonema brachyurus, Tubixaba tuxaua, или Aphelencoides besseyi.

21. Способ по п. 20, в котором Pratylenchus spp представляет собой Pratylenchus brachyurus.

22. Место произрастания, имеющее плотность подавленной популяции нематод, причем плотности подавленной популяции нематод достигают способом по любому из пп. 1 - 21.

23. Место произрастания по п. 22, которое обеспечивает одно или более из следующих преимуществ:

a) место произрастания не обязательно должно находиться под паром один вегетационный сезон за цикл севооборота;

b) место произрастания не обязательно должно быть обработано в один вегетационный сезон за цикл севооборота; и

c) место произрастания не обязательно должно быть засажено покровной культурой.

24. Место произрастания по п. 22 или п. 23, в котором плотность подавленной популяции нематод составляет, составляет около или составляет менее около 250, 200, 150, 100, 50, 20 или 10 нематод на грамм (г) корня.

25. Устойчивое к нематодам растение, выращенное на месте произрастания по любому из пп. 22 - 24.

26. Растительный материал, собранный с растения по п. 25.

27. Семена, произведенные растением по п. 25.

28. Система для увеличенного применения места произрастания, содержащая:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в последующий вегетационный сезон.

29. Система по п. 28, в которой место произрастания не находится под паром в течение последующего вегетационного сезона.

30. Система по п. 28, в которой покровное растение или покровную культуру не выращивают в течение последующего вегетационного сезона.

31. Система по п. 28, в которой устойчивое к нематодам растение и восприимчивое к нематодам растение выращивают в последовательные вегетационные сезоны.

32. Система по п. 28, в которой каждое из устойчивого к нематодам растения и восприимчивого к нематодам растения представляет собой сельскохозяйственное растение, имеющее внутреннюю ценность.

33. Способ улучшения системы севооборота, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона; и

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения в последующий вегетационный сезон.

34. Способ по п. 33, в котором улучшенная система севооборота может дополнительно включать в себя одно или более из следующего:

a) применение места произрастания в течение по меньшей мере одного дополнительного вегетационного сезона в год;

b) сниженная обработка места произрастания;

c) сниженной обработки семян восприимчивых к нематодам культур нематицидами;

d) уменьшенная площадь обработки места произрастания нематицидами до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

e) сниженный уровень нематицида, наносимого на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания до или во время вегетационного сезона восприимчивого к нематодам растения;

f) уменьшенное количество нанесений нематицид на восприимчивое к нематодам растение и/или место произрастания в течение вегетационного сезона;

g) повышенная пригодность места произрастания;

h) повышенная ценность места произрастания;

i) улучшенные устойчивые методы ведения сельского хозяйства; и/или

j) увеличенная урожайность восприимчивых к нематодам культур.

35. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий:

выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в первый вегетационный сезон, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в первый вегетационный сезон подавляет популяцию нематод в месте произрастания или поддерживает подавление популяции нематод в месте произрастания;

выращивание восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в тот же или последующий вегетационный сезон; и

достижение улучшенной жизнеспособности и/или урожайности восприимчивого к нематодам растения по сравнению со жизнеспособностью и/или урожайностью, ожидаемыми, если бы популяция нематод не была подавлена.

36. Способ по п. 35, в котором улучшенная жизнеспособность восприимчивого к нематодам растения включает в себя одно или более из следующего: улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков); улучшенная урожайность; более быстрая всхожесть; улучшенное управление стрессом растений, включающее повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса; повышенная механическая прочность; повышенная устойчивость к засухе; сниженное заражение грибковой, бактериальной и/или вирусной инфекцией; или любая их комбинация.

37. Способ сбыта системы севооборота, включающий:

стимулирование применения растений, устойчивых к нематодам, в течение первого вегетационного сезона; и

стимулирование применения восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение того же или последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивых к нематодам растений в последующий вегетационный сезон.

38. Способ по п. 37, в котором последующий вегетационный сезон непосредственно примыкает к первому вегетационному сезону.

39. Маркетинговые материалы, относящиеся к системе севооборота для выращивания устойчивого к нематодам растения в течение первого вегетационного сезона при взаимодействии с или с последующим выращиванием восприимчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение последующего вегетационного сезона, причем выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания в течение первого вегетационного сезона приводит к подавлению популяции нематод в месте произрастания, что обеспечивает или улучшает рост восприимчивого к нематодам растения.

40. Маркетинговые материалы по п. 39, в которых маркетинговые материалы относятся к стимулированию системы севооборота.

41. Способ борьбы с нематодами в месте произрастания, включающий: выращивание устойчивого к нематодам растения в месте произрастания до, одновременно или после выращивания вторичной культуры в месте произрастания.

42. Способ по любому из пп. 1 - 21, 33 - 38 или 41, в котором устойчивое к нематодам растение экспрессирует нематицидный белок Cryl4Ab, имеющий по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO. 1.

43. Способ по любому из пп. 1 - 21, 33 - 38 или 40 - 42, в котором устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM5.

44. Способ по любому из пп. 1 - 21, 33 - 38 или 40 - 42, в котором устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM4.

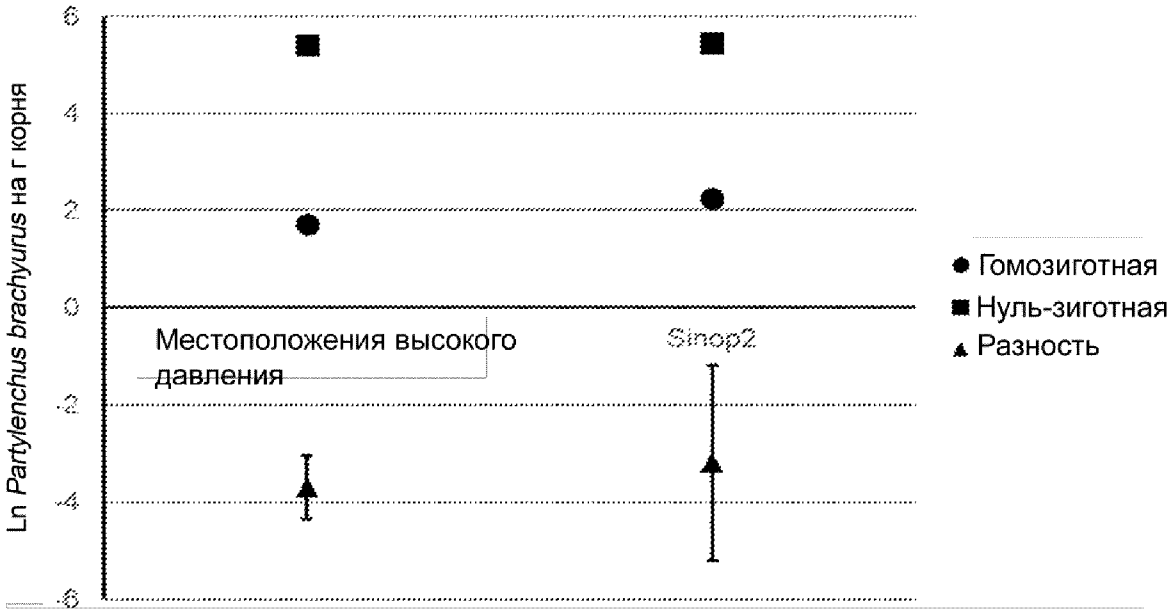
45. Место произрастания по любому из пп. 22 - 24, устойчивое к нематодам растение по п. 25, растительный материал по п. 26, семена по п. 27, система по любому из пп. 28 - 32 или маркетинговые материалы по п. 39 или п. 40, в которых устойчивое к нематодам растение экспрессирует токсин Cry14Ab-1 Bacillus thuringiensis.

46. Место произрастания по любому из пп. 22 - 24, устойчивое к нематодам растение по п. 25, растительный материал по п. 26, семена по п. 27,

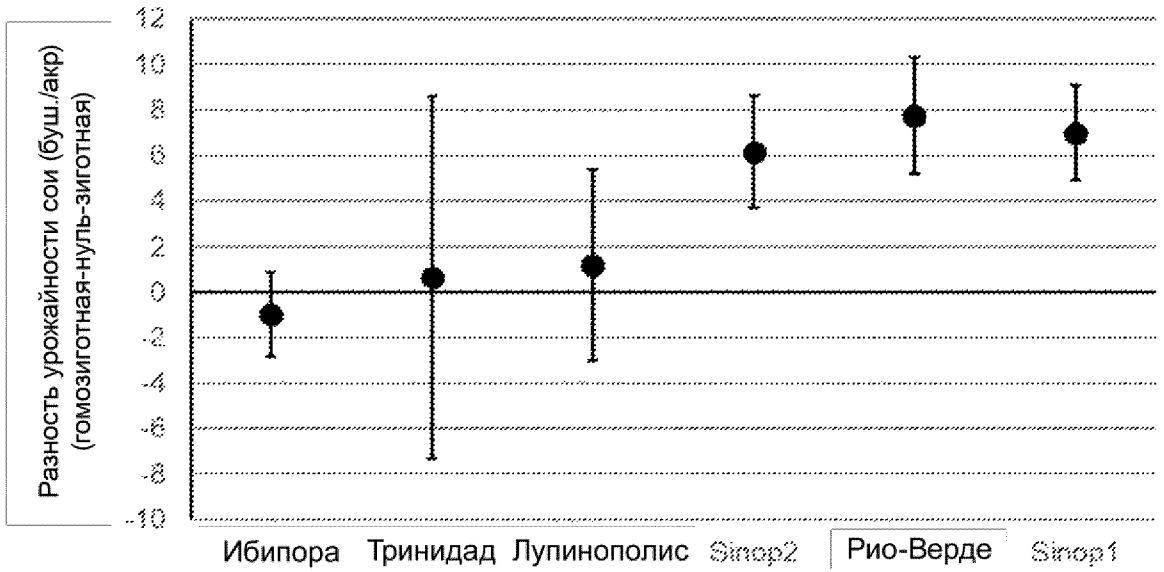
система по любому из пп. 28 - 32 или маркетинговые материалы по п. 39 или п. 40, в которых устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM5.

47. Место произрастания по любому из пп. 22 - 24, устойчивое к нематодам растение по п. 25, растительный материал по п. 26, семена по п. 27, система по любому из пп. 28 - 32 или маркетинговые материалы по п. 39 или п. 40, в которых устойчивое к нематодам растение содержит элитный объект EE-GM4.

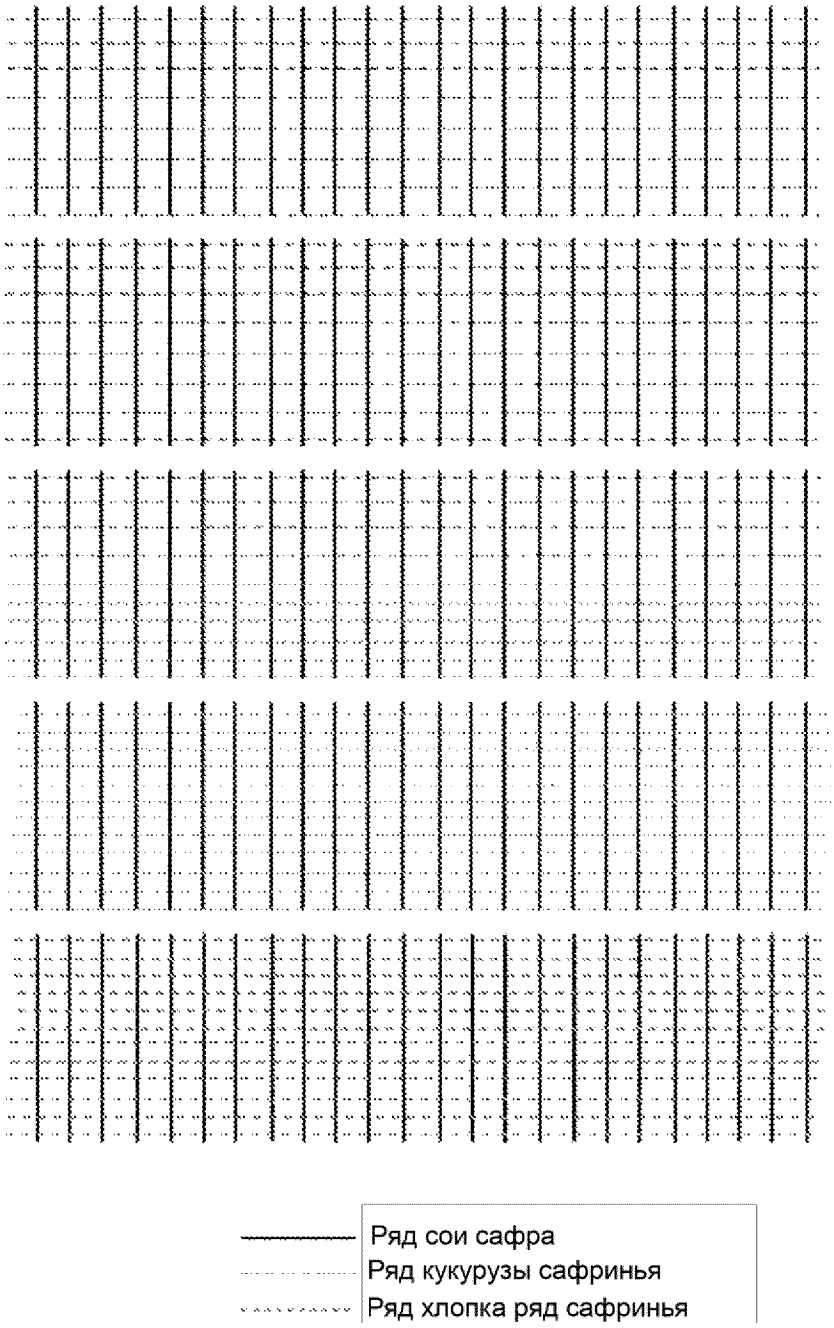
Фиг. 1


6
4
2
0
-2
-4
-6
Ln Partylenchus brachyurus на г корня
Местоположения высокого давления
Sinop2
Гомозиготная
Нуль-зиготная
Разность

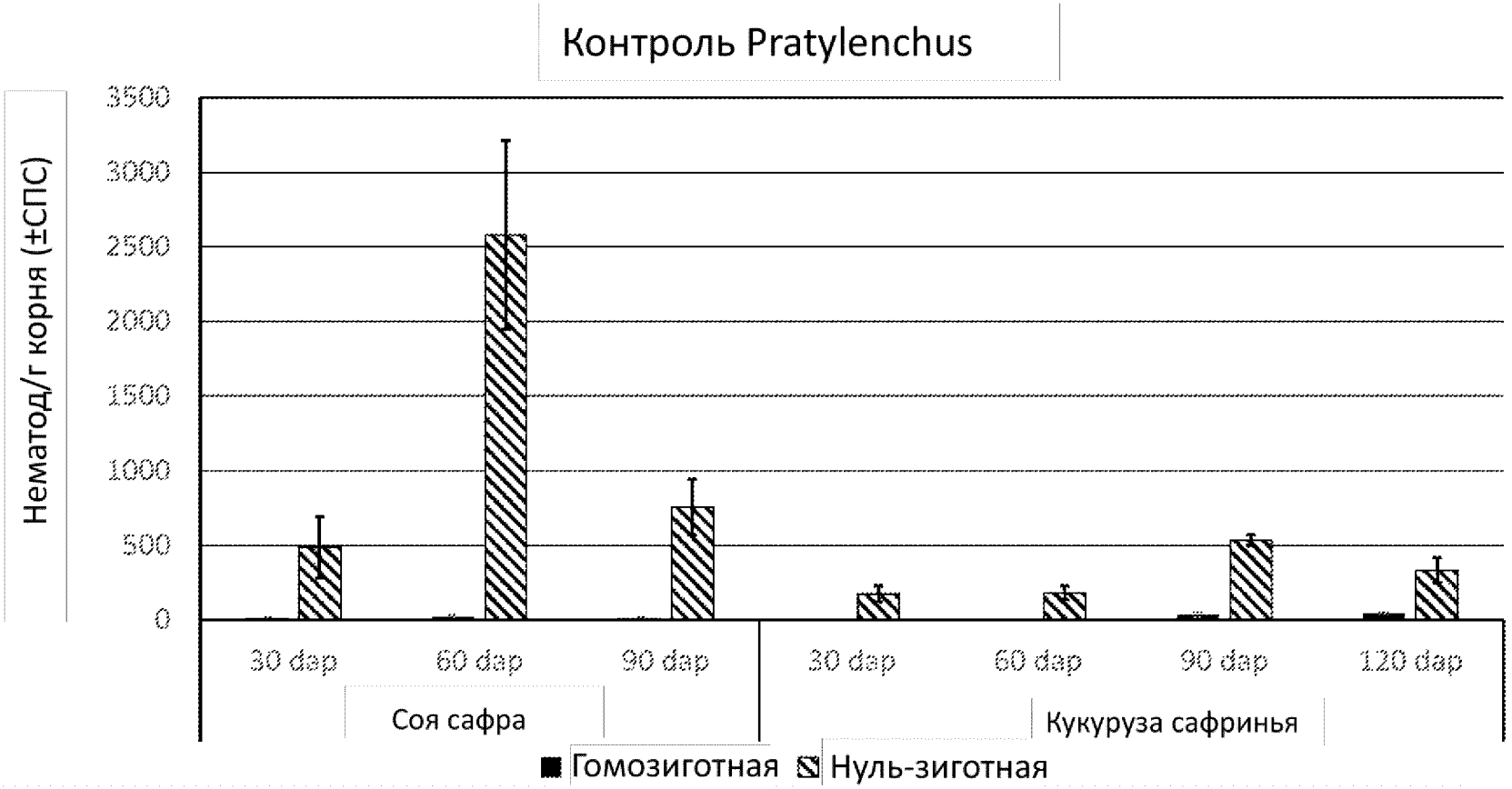
Фиг. 2


Разность урожайности сои (буш./акр)
(гомозиготная-нуль-зиготная)
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
Ибипора
Тринидад
Лупинополис
Sinop2
Рио-Верде
Sinop1

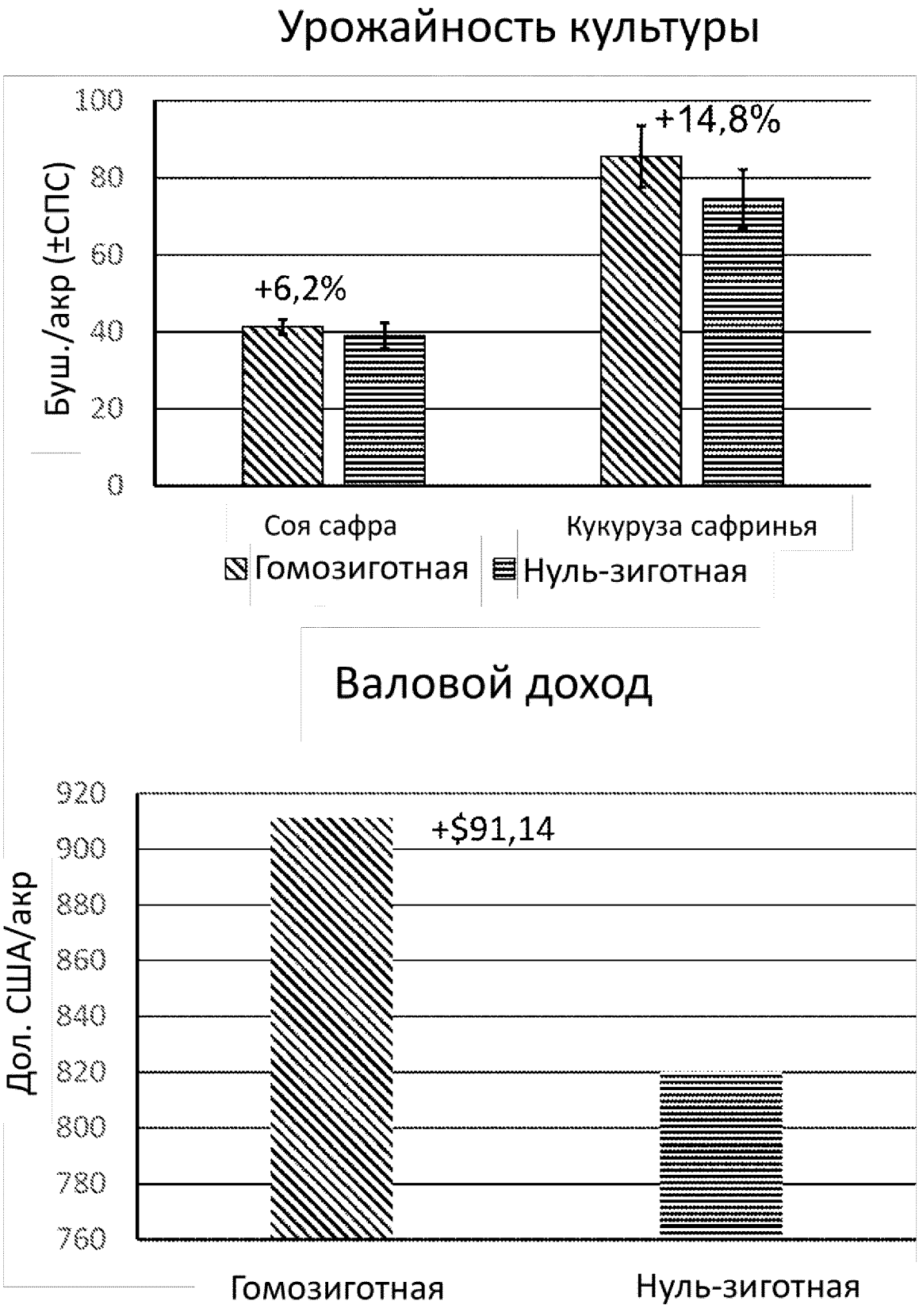
Фиг. 3


Ряд сои сафра
Ряд кукурузы сафринья
Ряд хлопка ряд сафринья

Фиг. 4

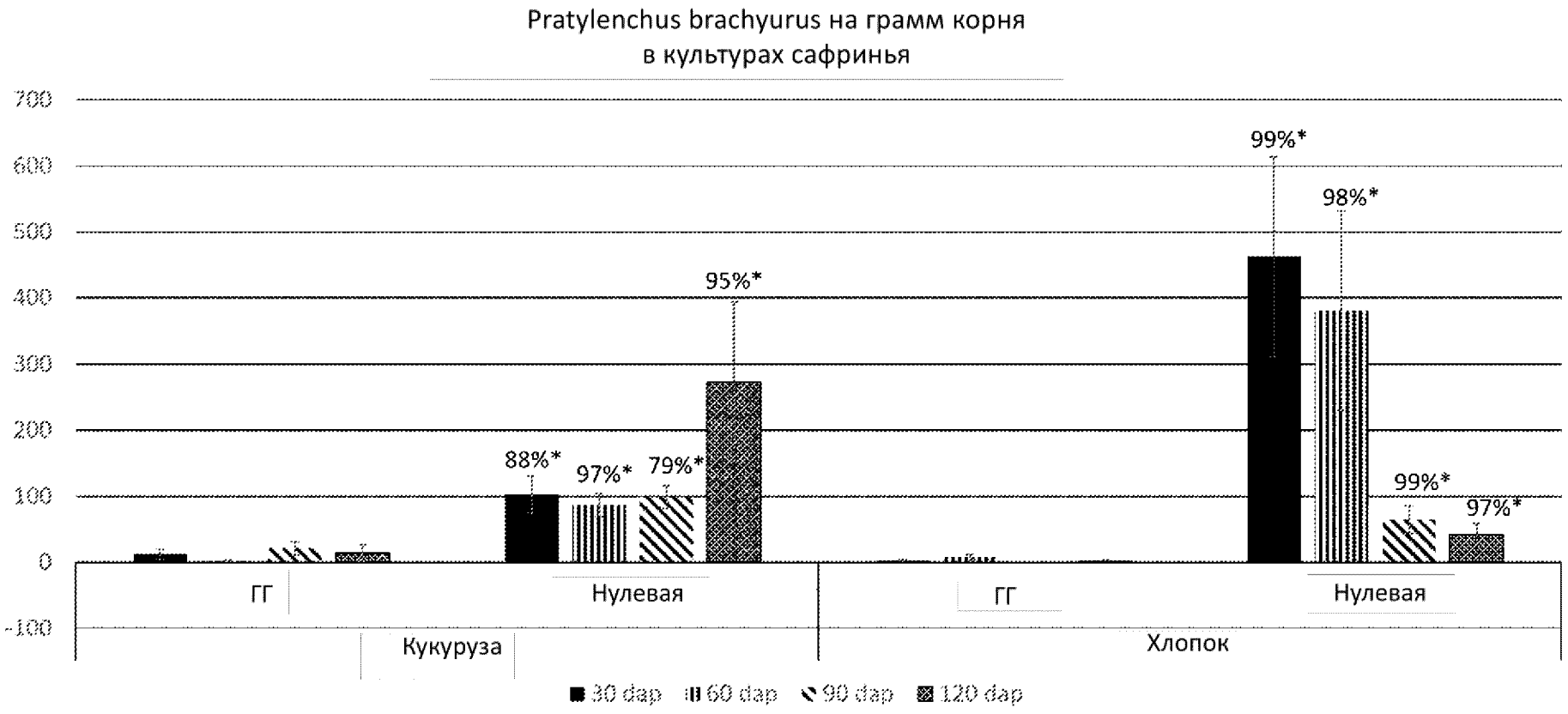

Контроль Pratylenchus
Нематод/г корня (±СПС)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
30 dap
60 dap
90 dap
30 dap
60 dap
90 dap
120 dap
Соя сафра
Кукуруза сафринья
Гомозиготная
Нуль-зиготная

Фиг. 5



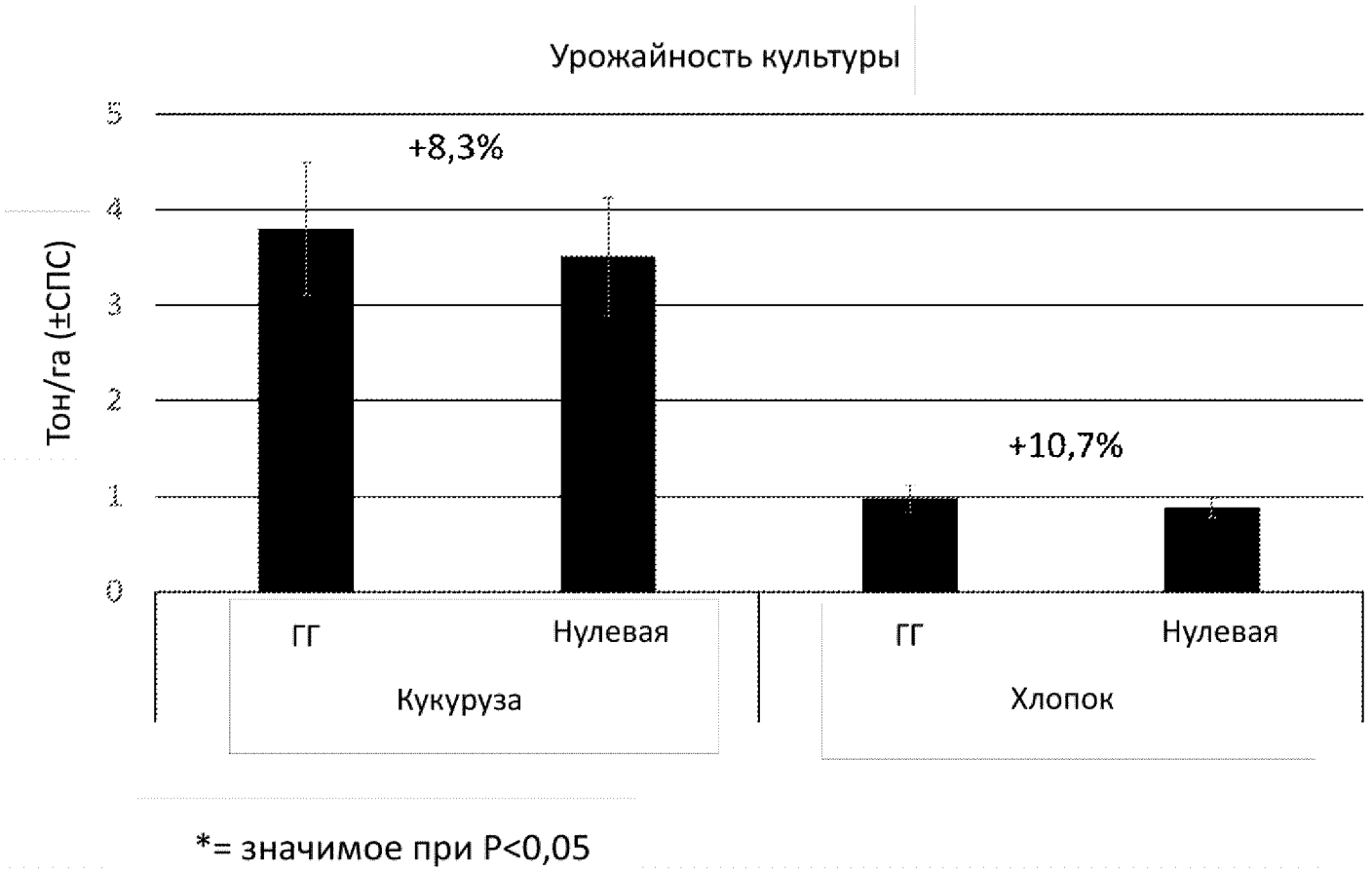
*= значимое при P<0,05

Фиг. 6



*= значимое при P<0,05

Фиг. 7

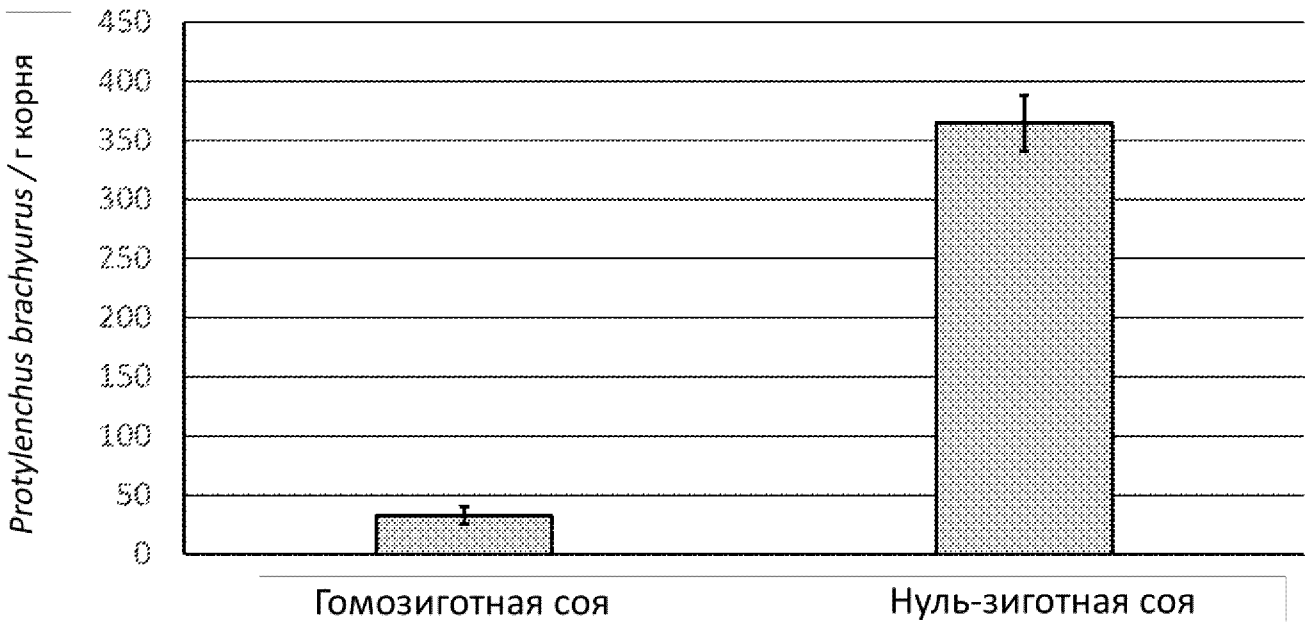


*= значимое при P<0,05

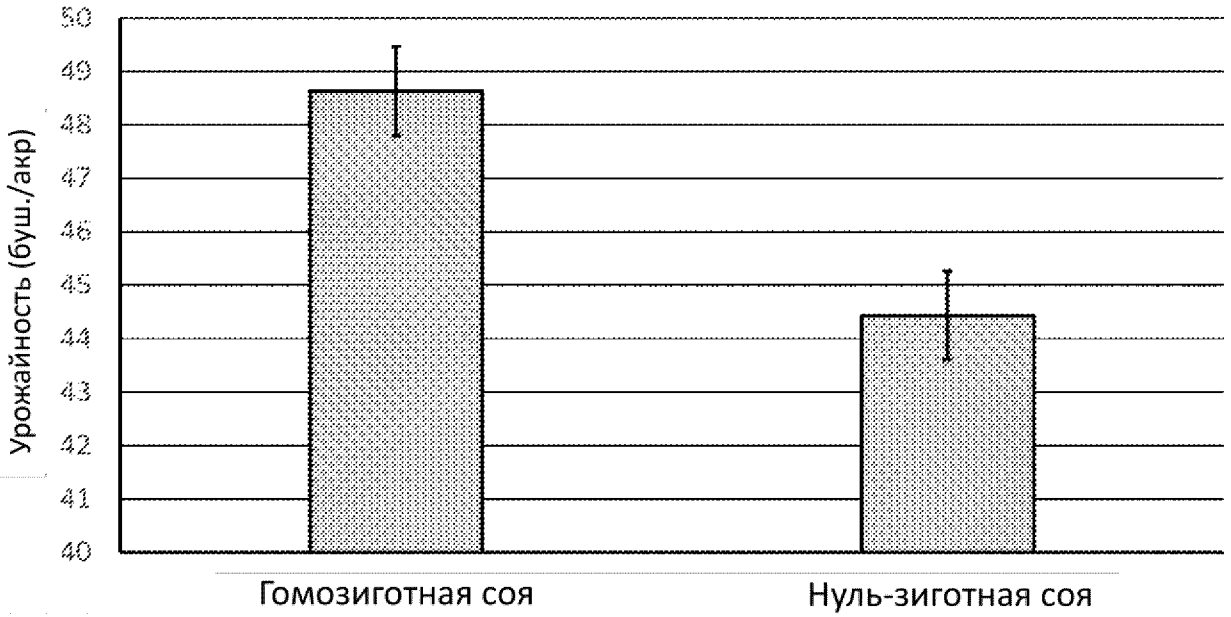
Фиг. 8

Культура	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь
Соя сафра	Сбор								Посадка			
Кукуруза сафринья	Посадка				Сбор							
Хлопок сафринья	Посадка				Сбор							

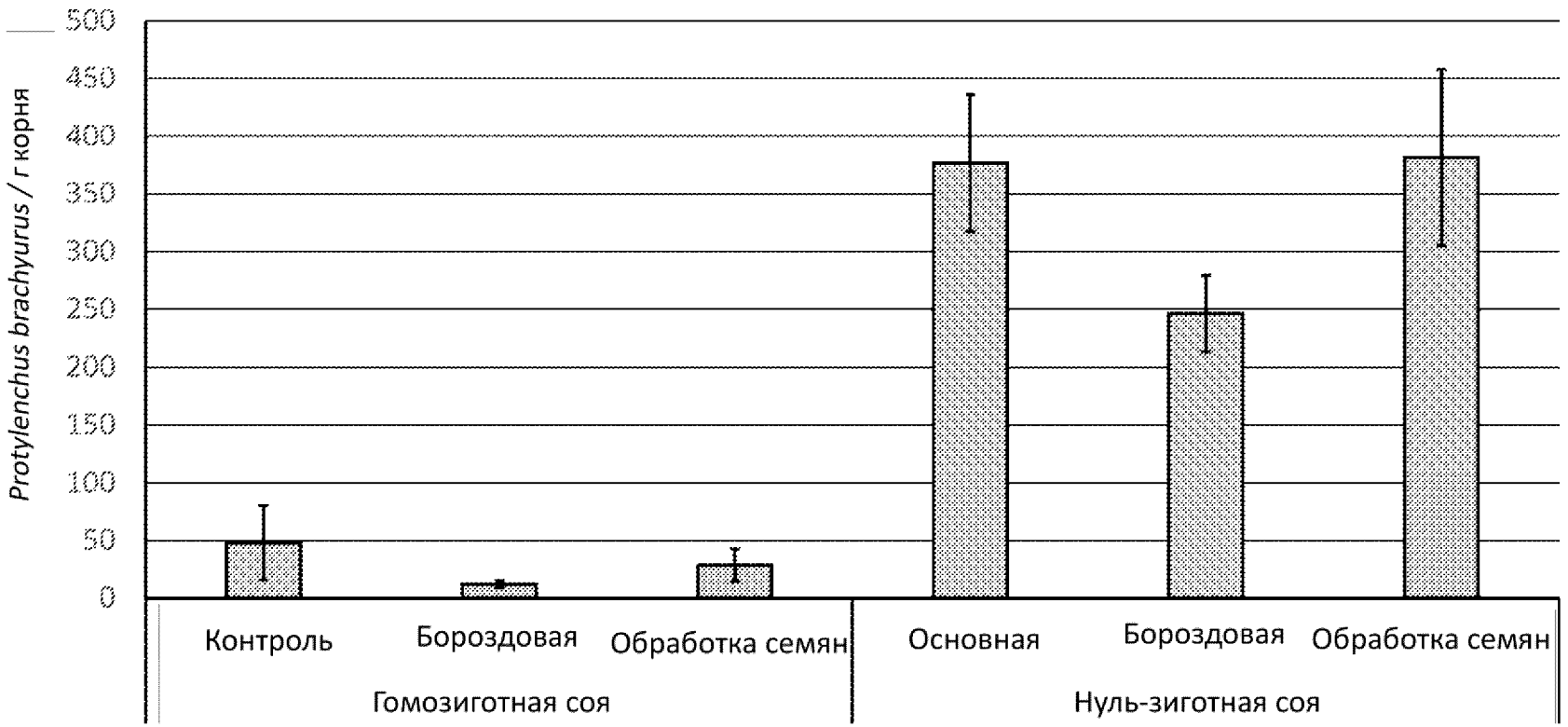
Фиг. 9


Protylenchus brachyurus / г корня
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Гомозиготная соя
Нуль-зиготная соя

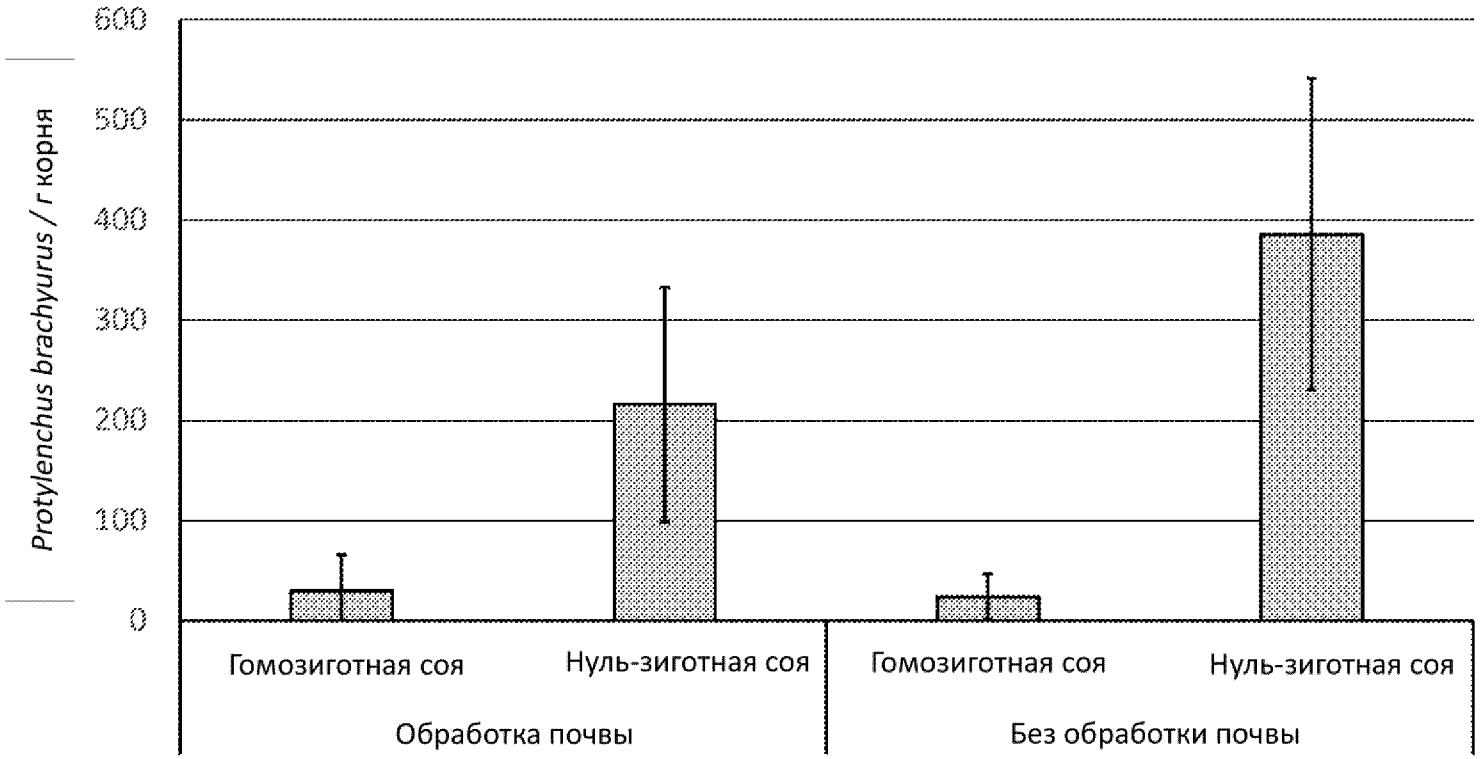
Фиг. 10


Урожайность (буш./акр)
50
49
48
47
46
45
44
43
42
41
40
Гомозиготная соя
Нуль-зиготная соя

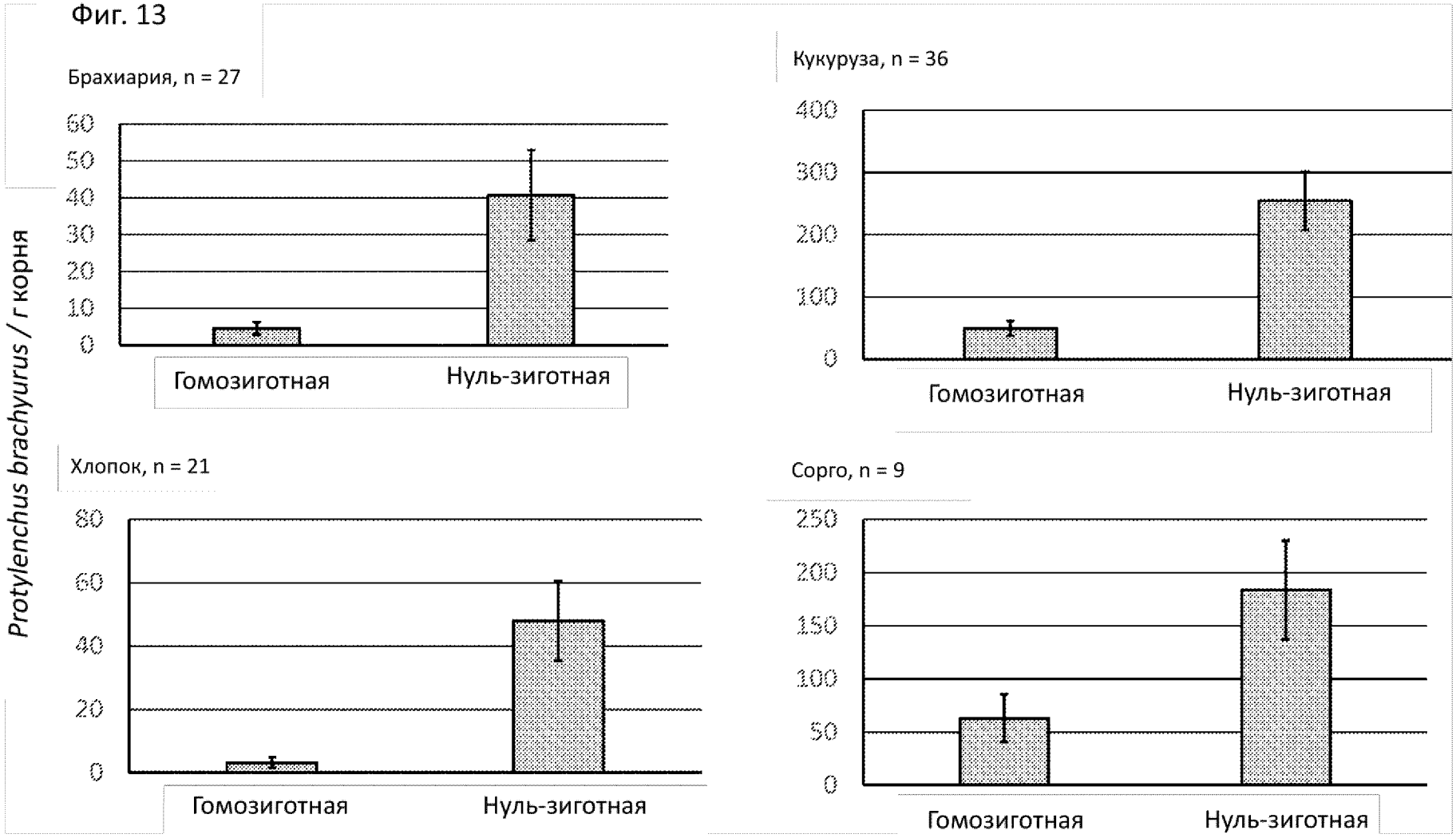
Фиг. 11


Protylenchus brachyurus / г корня
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Контроль
Бороздовая
Обработка семян
Основная
Бороздовая
Обработка семян
Гомозиготная соя
Нуль-зиготная соя

Фиг. 12


600
500
400
300
200
100
0
Protylenchus brachyurus / г корня
Гомозиготная соя
Нуль-зиготная соя
Гомозиготная соя
Нуль-зиготная соя
Обработка почвы
Без обработки почвы

Фиг. 13


Брахиария, n = 27
60
50
40
30
20
10
0
Гомозиготная
Нуль-зиготная
Кукуруза, n = 36
400
300
200
100
0
Гомозиготная
Нуль-зиготная
Хлопок, n = 21
80
60
40
20
0
Гомозиготная
Нуль-зиготная
Сорго, n = 9
250
200
150
100
50
0
Гомозиготная
Нуль-зиготная
Protylenchus brachyurus / г корня