

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190969** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.10.18

(51) Int. Cl. *C07K 14/325* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.21

(54) **НОВЫЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ НАСЕКОМЫХ**

(31) 62/795,066

(32) 2019.01.22

(33) US

(86) PCT/US2020/014437

(87) WO 2020/154301 2020.07.30

(71) Заявитель:
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК
(US)

(72) Изобретатель:

Боуэн Дэвид Дж., Чья Кэтрин А.,
Чэнь Даньци, Цихе Тодд А., Хоу
Арлин Р., Лутке Дженнифер Л.,
Уиггинс Барбара И., Чжан Юаньци
(US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Веселицкая И.А.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Раскрыты пестицидные белки, проявляющие токсическую активность против видов чешуекрылых вредителей, и они включают, но не ограничиваются ими, TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3. Представлены конструкции ДНК, которые содержат последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую один или несколько раскрытых пестицидных белков. Представлены трансгенные растения, растительные клетки, семена и части растений, устойчивые к заражению чешуекрылыми насекомыми, которые содержат последовательности рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующие пестицидные белки по настоящему изобретению. Также представлены способы обнаружения присутствия последовательностей рекомбинантных нуклеиновых кислот или белков по настоящему изобретению в биологическом образце и способы борьбы с вредителями видов чешуекрылых с использованием любого из пестицидных белков TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3. Также раскрыты способы и композиции для улучшения инсектицидной активности пестицидного белка против видов насекомых-вредителей. Кроме того, раскрыты способ и композиции для снижения экспрессии пестицидного белка в тканях органов размножения трансгенного растения.

A1

202190969

202190969

A1

НОВЫЕ БЕЛКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ НАСЕКОМЫХ

5 ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[01] Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки США № 62/795066, поданной 22 января 2019 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

10 ВКЛЮЧЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[02] Файл под названием «MONS469WO_ST25.txt», содержащий машиночитаемую форму списка последовательностей, был создан 21 января 2020 г. Этот файл имеет размер 82,7 килобайта (измеряется в MS-Windows[®]), одновременно подан в электронном виде (с использованием системы хранения EFS-Web Патентного
15 ведомства США) и полностью включен посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[03] Изобретение в целом относится к области белков, ингибирующих активность насекомых. Раскрыт новый класс белков, проявляющих ингибирующую активность
20 против значимых с точки зрения сельского хозяйства насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур и семян. В частности, описанный класс белков является инсектицидно активным в отношении значимых с точки зрения сельского хозяйства вредителей сельскохозяйственных культур и семян, особенно видов чешуекрылых насекомых-вредителей. Предоставлены растения, части растений и семена,
25 содержащие рекомбинантную полинуклеотидную конструкцию, кодирующую один или несколько раскрытых токсинных белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[04] Повышение урожайности сельскохозяйственных значимых культур, включая,
30 среди прочего, кукурузу, сою, сахарный тростник, рис, пшеницу, овощи и хлопок, становится все более важным. В дополнение к растущей потребности в сельскохозяйственных продуктах для питания, одежды и обеспечения энергией растущего населения, ожидается, что воздействие климата и интенсивная эксплуатация земли не для сельскохозяйственных целей со стороны растущего населения уменьшат

количество доступных пахотных земель для сельского хозяйства. Эти факторы привели к негативным прогнозам продовольственной безопасности, особенно в отсутствие значимых улучшений в биотехнологии растений и агрономической практике. Из-за этой интенсивной эксплуатации экологически устойчивые улучшения в технологиях, методах ведения сельского хозяйства и борьбе с вредителями являются

5 жизненно важными инструментами для расширения производства сельскохозяйственных культур на ограниченном количестве пахотных земель, доступных для ведения сельского хозяйства.

[05] Насекомые, в частности, насекомые из отряда Lepidoptera и Coleoptera, считаются основной причиной повреждения полевых культур, что снижает урожайность на зараженных территориях. Виды чешуекрылых вредителей, которые отрицательно воздействуют на сельское хозяйство, включают, но не ограничиваются ими, черную совку луговую (*Spodoptera exempta*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку хлопковую (*Helicoverpa zea*), совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*),

15 моль капустную (*Plutella xylostella*), мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), совку травяную (*Spodoptera frugiperda*), устойчивую к Cry1Fa1 совку травяную (*Spodoptera frugiperda*), древнего коробочного червя (OWB, *Helicoverpa armigera*), южную совку луговую (*Spodoptera eridania*), соевую совку (*Chrysodeixis includens*), совку пятнистую (*Earias vittella*), огневку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), табачную

20 листовертку (*Heliothis virescens*), азиатскую хлопковую совку (*Spodoptera litura*, также известную как гусеница гроздевая), западную бобовую совку (*Striacosta albicosta*) и гусеницу бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*).

[06] Исторически сложилось так, что интенсивное применение синтетических химических инсектицидов считалось средством борьбы с вредителями в сельском

25 хозяйстве. Забота об окружающей среде и здоровье человека, в дополнение к возникающим проблемам устойчивости, способствовала исследованиям и разработке биологических пестицидов. Эти исследовательские работы привели к прогрессивному открытию и использованию различных энтомопатогенных видов микробов, включая бактерии.

30 [07] Парадигма биологического контроля изменилась, когда потенциал энтомопатогенных бактерий, в частности, бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus*, был обнаружен и разработан как биологическое средство борьбы с вредителями. Штаммы бактерий *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) были использованы в качестве источника пестицидных белков, поскольку было обнаружено, что штаммы *Bt* проявляют высокую

токсичность в отношении определенных насекомых. Известно, что штаммы *Bt* продуцируют дельта-эндотоксины, которые локализуются внутри параспоральных кристаллических телец включения в начале образования спор и во время стационарной фазы роста (*например*, белки Cry), и также известно, что они продуцируют секретлируемый инсектицидный белок. При попадании в организм чувствительного насекомого дельта-эндотоксины, а также секретлируемые токсины оказывают свое действие на поверхность эпителия средней кишки, разрушая клеточную мембрану, что приводит к разрушению и гибели клеток. Гены, кодирующие инсектицидные белки, также были идентифицированы у других видов бактерий, помимо *Bt*, включая другие *Bacillus* и множество дополнительных видов бактерий, таких как *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls", ранее известная как *Bacillus sphaericus*), *Paenibacillus popilliae* и *Paenibacillus lentimorbus*.

[08] Кристаллические и секретлируемые растворимые инсектицидные токсины высокоспецифичны для своих хозяев и получили всемирное признание в качестве альтернативы химическим инсектицидам. Например, инсектицидные токсиновые белки применялись в различных сельскохозяйственных целях для защиты важных с точки зрения сельского хозяйства растений от заражения насекомыми, уменьшения потребности в химических пестицидах и повышения урожайности. Инсектицидные токсиновые белки используются для борьбы со значимыми с точки зрения сельского хозяйства вредителями сельскохозяйственных культур с помощью механических методов, таких как распыление для распространения микробных композиций, содержащих различные штаммы бактерий, на поверхности растений, а также с использованием методов генетической трансформации для получения трансгенных растений и семян, экспрессирующих инсектицидный токсиновый белок.

[09] Использование трансгенных растений, экспрессирующих инсектицидные токсиновые белки, приспособлено во всем мире. Например, в 2016 году 23,1 миллиона гектаров были засеяны трансгенными культурами, экспрессирующими токсины *Bt*, и 75,4 миллиона гектаров были засеяны трансгенными культурами, экспрессирующими токсины *Bt*, обладающие признаками устойчивости к гербицидам (*ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY*). Всемирное использование трансгенных культур, защищенных от насекомых, и ограниченного количества инсектицидных токсиновых белков, используемых в этих культурах, обеспечило давление отбора для существующих аллелей насекомых,

которые придают устойчивость к используемым в настоящее время инсектицидным белкам.

[10] Развитие устойчивости у целевых вредителей к инсектицидным токсинным белкам создает постоянную потребность в выявлении и разработке новых форм инсектицидных токсинных белков, которые пригодны для контроля повышения устойчивости насекомых к трансгенным культурам, экспрессирующим инсектицидные токсинные белки. Новые белковые токсины с улучшенной эффективностью, которые демонстрируют контроль над более широким спектром чувствительных видов насекомых, уменьшат количество выживших насекомых, у которых могут развиваться аллели устойчивости. Кроме того, использование в одном растении двух или более трансгенных инсектицидных токсинных белков, токсичных для одного и того же насекомого-вредителя и проявляющих разные способы действия, снижает вероятность устойчивости у любого отдельного вида целевых вредителей.

[11] Таким образом, авторы изобретения раскрывают в данном документе новое семейство белковых токсинов из *Paenibacillus lentimorbus*, наряду с аналогичными токсинными белками, вариантными белками и иллюстративными рекомбинантными белками, которые проявляют инсектицидную активность против целевых видов чешуекрылых.

20 СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[12] В данном документе раскрыта новая группа пестицидных белков с ингибирующей активностью в отношении насекомых (токсинные белки), называемых в данном документе ПТС7941, принадлежащих к классу белковых токсинов ПТС7941, которые, как показано, проявляют ингибирующую активность против одного или более вредителей сельскохозяйственных культур. Белок ПТС7941 и белки из класса белковых токсинов ПТС7941 могут использоваться отдельно или в комбинации с другими инсектицидными белками и токсичными веществами в составах и *in planta*, обеспечивая тем самым альтернативу инсектицидным белкам и инсектицидным химическим составам, которые в настоящее время используются в сельскохозяйственных системах.

[13] В одном варианте осуществления в настоящей заявке раскрыта молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая фрагмент гетерологичного промотора, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его фрагмент, где (a) указанный пестицидный белок содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (b) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (c) указанный участок полинуклеотида гибридизуется с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13; или (d) указанный участок полинуклеотида, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, содержит полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 65%, или 70%, или 75%, или 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98 %, или 99%, или приблизительно 100% идентичность последовательности с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13; или (e) указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с вектором, и указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, фагмиды, бакмиды, космиды и бактериальной или дрожжевой искусственной хромосомы. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты может содержать последовательность, которая функционирует для экспрессии пестицидного белка в растении; или экспрессируется в растительной клетке с образованием пестицидно эффективного количества пестицидного белка.

[14] В другом варианте осуществления настоящей заявки представлены клетки-хозяева, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по настоящей заявке, где клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной и растительной клетки. Предполагаемые бактериальные клетки-хозяева включают *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* и *Erwinia*. В определенных вариантах осуществления указанный вид *Bacillus* представляет собой *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанный вид *Brevibacillus* представляет собой *Brevibacillus laterosporus*, или вид *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*. Предполагаемые клетки-хозяева растения включают клетку двудольного растения и клетку однодольного растения. Предполагаемые растительные клетки дополнительно включают клетки люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты кочанной, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокоса,

кофе, кукурузы, клевера, хлопка (*Gossypium* sp.), тыквы, огурца, лжетсуги, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливки, лука, декоративных растений, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны

5 лучистой, редиса, рапса, риса, корневища, ржи, сафлора, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, тыквы крупноплодной, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, помидора, тритикале, дернообразующей травы, арбуза и пшеницы.

10 [15] В другом варианте осуществления пестицидный белок проявляет активность в отношении чешуекрылых насекомых, включая гусеницу бархатных бобов, точильщика сахарного тростника, малого кукурузного точильщика, совку хлопковую, табачную листовертку, соевую совку, черную совку луговую, южную совку луговую, совку травяную, совку малую, древнего коробочного червя, восточную гусеницу, розового

15 коробочного червя, совку-ипсилон, огневку кукурузную юго-западную, совку хлопковую американскую, моль капустную, совку пятнистую, азиатскую хлопковую совку, западную бобовую совку и мотылька кукурузного.

[16] В этой заявке также рассматриваются растения, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащую фрагмент гетерологичного

20 промотора, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его фрагмент, где: (а) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (b) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или

25 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (c) указанный участок полинуклеотида гибридизуется в жестких условиях гибридизации с комплементом нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13; или (d) указанное растение демонстрирует определяемое

30 количество указанного пестицидного белка. В некоторых вариантах осуществления пестицидный белок содержит SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления растение является либо двудольным, либо однодольным растением. В другом варианте осуществления растение дополнительно выбрано из группы, состоящей из люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты

кочанной, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокоса, кофе, кукурузы, клевера, хлопка, тыквы, огурца, лжетцуги, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливки, лука, декоративных
 5 растений, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневища, ржи, сафлора, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, тыквы крупноплодной, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, помидора,
 10 тритикале, дернообразующей травы, арбуза и пшеницы.

[17] В дополнительных вариантах осуществления раскрыты семена, содержащие молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты.

[18] В другом варианте осуществления рассмотрена композиция, ингибирующая активность насекомых, содержащая молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты,
 15 раскрытые в настоящей заявке. Композиция, ингибирующая активность насекомых, может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одно другое пестицидное средство, которое отличается от указанного пестицидного белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно
 20 другое пестицидное средство выбрано из группы, состоящей из белка, ингибирующего активность насекомых, молекулы дцРНК, ингибирующей активность насекомых, и вспомогательного белка. Также предполагается, что по меньшей мере одно другое пестицидное средство в композиции, ингибирующей активность насекомых, проявляет
 25 активность против одного или нескольких видов вредителей отрядов Lepidoptera, Coleoptera или Hemiptera. По меньшей мере одно другое пестицидное средство в композиции, ингибирующей активность насекомых, в одном варианте осуществления
 30 выбрано из группы, состоящей из Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, вариантов Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, химер Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, вариантов Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC3131, TIC2160, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AXMI-036, AXMI-045, Axmi52, Axmi58, Axmi88, Axmi97, Axmi102, Axmi112, Axmi117, Axmi100, AXMI-115, AXMI-113 и AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, Axmi171, AXMI-184, axmi196, axmi204, axmi207,

axmi209, Axmi205, AXMI218, AXMI220, AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z и AXMI225z, AXMI238, AXMI270, AXMI279, AXMI335, AXMI345, AXMI-R1 и его вариантов, IP3 и его вариантов, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-11, белка DIG-657, вариантов РН1-4, вариантов Р1Р-72, вариантов Р1Р-45, вариантов Р1Р-64, вариантов Р1Р-74, вариантов Р1Р-77, DIG-305, вариантов Р1Р-47, DIG-17, DIG-90, DIG-79 и DIG-303.

[19] Также рассматриваются товарные продукты, содержащие определяемое количество молекул рекомбинантной нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящей заявке. Такие товарные продукты включают товарную кукурузу, упакованную в мешки зернопереработчиком, кукурузные хлопья, кукурузные блинчики, кукурузную муку, кукурузную муку непросеянную, кукурузный сироп, кукурузное масло, кукурузный силос, кукурузный крахмал, кукурузную крупу и т.п., а также соответствующие товарные продукты, полученные из соевых бобов, риса, пшеницы, сорго, голубиного гороха, арахиса, фруктов, дыни и овощей, включая, где это применимо, соки, концентраты, джемы, желе, мармелады и другие пищевые формы таких товарных продуктов, содержащие определяемое количество таких полинуклеотидов и/или полипептидов по настоящей заявке, целые или переработанные семена хлопка, хлопковое масло, пух, семена и части растений, переработанные для корма или пищи, волокна, бумагу, биомассы и топливные продукты, такие как топливо, полученное из хлопкового масла, или гранулы, полученные из отходов хлопкоочистки, целые или переработанные семена сои, соевое масло, соевый белок, соевый шрот, соевая мука, соевые хлопья, соевые отруби, соевое молоко, соевый сыр, соевое вино, корм для животных, содержащий сою, бумагу, содержащую сою, сливки, содержащие сою, биомассу сои и топливные продукты, полученные с использованием растений сои и частей растений сои.

[20] В настоящей заявке также рассматривается способ получения семян, содержащих молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящей заявке. Способ включает высадку по меньшей мере одного из семян, содержащих молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, раскрытые в настоящей заявке; выращивание растения из семян; и сбор семян растений, при этом собранные семена содержат молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты в настоящей заявке.

[21] В другом иллюстративном варианте осуществления предоставлено растение, устойчивое к заражению насекомыми, где клетки указанного растения содержат: (а) молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую инсектицидно эффективное количество пестицидного белка, как указано в SEQ ID NO:4, SEQ ID

NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (b) инсектицидно эффективное количество белка, содержащего аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14.

[22] В настоящей заявке также раскрыты способы борьбы с вредителями вида чешуекрылых насекомых и борьбы с заражением растений видами чешуекрылых, в частности, сельскохозяйственных растений. В одном варианте осуществления способ включает (a) приведение в контакт вредителя с инсектицидно эффективным количеством пестицидных белков, как указано в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (b) приведение в контакт вредителя с инсектицидно эффективным количеством одного или нескольких пестицидных белков, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, или 90%, или 95%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14.

[23] Кроме того, в данном документе предложен способ обнаружения присутствия молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей участок полинуклеотида, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, где: (a) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (b) указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или (c) указанный участок полинуклеотида гибридизуется с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13. В одном варианте осуществления изобретения способ включает приведение в контакт образца нуклеиновых кислот с зондом для нуклеиновых кислот, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации с геномной ДНК растения, содержащего участок полинуклеотида, кодирующий пестицидный белок или его фрагмент, представленный в данном документе, и не гибридизуется в таких условиях гибридизации с геномной ДНК другого изогенного растения, которое не содержит участок, где зонд гомологичен или комплементарен SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 или

SEQ ID NO:13, или последовательностью, которая кодирует пестицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14. Способ может дополнительно включать (a) воздействие на образец и пробу строгих условий гибридизации; и (b) обнаружение гибридизации пробы с ДНК образца.

[24] Изобретение также относится к способам обнаружения присутствия пестицидного белка или его фрагмента в образце, содержащем белок, где указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14. В одном варианте осуществления способ включает: (a) приведение образца в контакт с иммунореактивным антителом; и (b) обнаружение присутствия белка. В некоторых вариантах осуществления стадия обнаружения включает ИФА или вестерн-блоттинг.

[25] В настоящей заявке также раскрыт способ улучшения инсектицидной активности нативного инсектицидного белка против видов насекомых-вредителей, включающий: конструирование варианта инсектицидного белка путем вставки фрагмента ДНК, кодирующего пептид, связывающий рецептор в кишечнике насекомого, в кодирующую последовательность, которая кодирует инсектицидный белок; где инсектицидная активность сконструированного инсектицидного белка больше, чем инсектицидная активность нативного инсектицидного белка по отношению к указанным видам насекомых-вредителей. В одном варианте осуществления изобретения рецептор в кишечнике насекомых может представлять собой кадгерин-подобный белок (CADR), GPI-заякоренную аминопептидазу-N (APN), GPI-заякоренную щелочную фосфатазу, трансмембранный переносчик ABC или ADAM-металлопротеиназу. В другом варианте осуществления изобретения фрагмент ДНК, кодирующий пептид, связывающий рецептор в кишечнике насекомых, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16, и кодирует пептид, связывающий рецептор, представленный как SEQ ID NO:17.

[26] В одном варианте осуществления изобретения представлена молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая гетерологичный промотор, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его пестицидный фрагмент, функционально связанный с последовательностью ДНК, содержащей элемент сайта связывания мишени микроРНК, специфичной для ткани органов размножения, при этом указанный элемент сайта связывания мишени микроРНК является гетерологичным по отношению к указанному участку полинуклеотида, кодирующему пестицидный белок или его пестицидный фрагмент. Элементы сайта связывания мишени микроРНК выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23.

[27] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ снижения экспрессии пестицидного белка в ткани органов размножения трансгенного растения, включающий экспрессию в указанном трансгенном растении молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащей гетерологичный промотор, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его пестицидный фрагмент, функционально связанный с последовательностью ДНК, содержащей элемент сайта связывания мишени микроРНК, специфичной для ткани органов размножения, причем указанный элемент сайта связывания мишени микроРНК является гетерологичным по отношению к указанному участку полинуклеотида, кодирующему пестицидный белок или его пестицидный фрагмент. Элементы сайта связывания мишени микроРНК выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23. Еще один вариант осуществления изобретения представляет собой молекулу рекомбинантной ДНК, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[28] SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7941, полученный из *Paenibacillus lentimorbus*, вида DSC020651.

[29] SEQ ID NO:2 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7941.

[30] SEQ ID NO:3 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, которая кодирует пестицидный белок TIC7941PL_1, предназначенный для экспрессии в растительной клетке.

5 [31] SEQ ID NO:4 представляет собой аминокислотную последовательность белка TIC7941PL_1, в которую дополнительная аминокислота аланин вставлена сразу после иницирующего метионина.

[32] SEQ ID NO:5 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7941_His, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая гистидиновую метку, функционально связана на 5'-конце и в
10 рамке с кодирующей последовательностью TIC7941.

[33] SEQ ID NO:6 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7941_His.

[34] SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7941_2His, где последовательность нуклеиновой
15 кислоты, кодирующая гистидиновую метку, функционально связана на 5'-конце и в рамке.

[35] SEQ ID NO:8 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7941_2His.

[36] SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пестицидный белок TIC7941_3His, где последовательность нуклеиновой
20 кислоты, кодирующая гистидиновую метку, функционально связана на 5'-конце и в рамке.

[37] SEQ ID NO:10 представляет собой аминокислотную последовательность пестицидного белка TIC7941_3His.

25 [38] SEQ ID NO:11 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, которая кодирует пестицидный белок TIC7941PL_2, предназначенный для экспрессии в растительной клетке.

[39] SEQ ID NO:12 представляет собой аминокислотную последовательность TIC7941PL_2, в которую дополнительная аминокислота аланин вставлена сразу после
30 иницирующего метионина.

[40] SEQ ID NO:13 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, которая кодирует пестицидный белок TIC7941PL_3, предназначенный для экспрессии в растительной клетке.

[41] SEQ ID NO:14 представляет собой аминокислотную последовательность TIC7941PL_3, в которую дополнительная аминокислота аланин вставлена сразу после иницирующего метионина.

5 [42] SEQ ID NO:15 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность (FAWPEPBIN_Vac), которая кодирует последовательность FAWPEPBIN пептида, связывающего рецептор FAW ABCc4, для экспрессии в бактериях. Синтетическая последовательность находится в положениях нуклеотидов 2413-2448 TIC7941_2His и в положениях нуклеотидов 2410-2445 TIC7941_3His.

10 [43] SEQ ID NO:16 представляет собой синтетическую кодирующую последовательность (FAWPEPBIN_PL), которая кодирует последовательность FAWPEPBIN пептида, связывающего рецептор FAW ABCc4, для экспрессии в растительной клетке. Синтетическая последовательность находится в положениях нуклеотидов 2386-2421 TIC7941PL_2 и в положениях нуклеотидов 2383-2418 TIC7941PL_3.

15 [44] SEQ ID NO:17 представляет собой последовательность (FAWPEPBIN) пептида, связывающего рецептор FAW ABCc4, кодируемая SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16, и расположена в положениях аминокислот 805-816 TIC7941_2His, 804-815 TIC7941_3His, 796- 807 TIC7941PL_2 и 795-806 TIC7941PL_3.

20 [45] SEQ ID NO:18 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания мишени микроРНК Gm.miR395_1.

[46] SEQ ID NO:19 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания мишени микроРНК Gm.miR395_2.

25 [47] SEQ ID NO:20 представляет собой последовательность ДНК (SUP-miR395), где сайты связывания мишени микроРНК Gm.miR395_1 и Gm.miR395_2 связаны с использованием последовательности ДНК SP-ART.8a-1.

[48] SEQ ID NO:21 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания мишени микроРНК Gm.miR4392_1.

[49] SEQ ID NO:22 представляет собой последовательность ДНК, кодирующую сайт связывания мишени микроРНК Gm.miR4392_2.

30 [50] SEQ ID NO:23 представляет собой последовательность ДНК (SUP-miR4392), где сайты связывания мишени микроРНК Gm.miR4392_1 и Gm.miR4392_2 связаны с использованием последовательности ДНК SP-ART.8a-1.

[51] SEQ ID NO:24 представляет собой последовательность ДНК линкера SP-ART.8a-1.

[52] SEQ ID NO:25 представляет собой последовательность ДНК (TIC7941PL_1-mi395), кодирующую TIC7941PL_1, функционально связанный с SUP-miR395.

[53] SEQ ID NO:26 представляет собой последовательность ДНК (TIC7941PL_1-mi4392), кодирующую TIC7941PL_1, функционально связанный с SUP-miR4392.

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[54] Проблему в области борьбы с сельскохозяйственными вредителями можно охарактеризовать как потребность в новых токсинных белках, которые эффективны против целевых вредителей, проявляют токсичность широкого спектра против видов целевых вредителей, способны экспрессироваться в растениях, не вызывая нежелательных агрономических проблем, и обеспечивают альтернативный способ действия по сравнению с существующими токсинами, которые коммерчески используются в растениях.

[55] Новые пестицидные белки, представленные TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3, раскрыты в данном документе и предназначены для удовлетворения каждой из этих потребностей, в частности, борьбы с широким спектром чешуекрылых насекомых-вредителей и, в частности, в отношении совки-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совки хлопковой (*Helicoverpa zea*), мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), совки травяной (*Spodoptera frugiperda*), южной совки луговой (*Spodoptera eridania*), соевой совки (*Chrysodeixis includens*), огневки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*).

[56] Ссылки в настоящей заявке на TIC7941, «белок TIC7941», «белковый токсин TIC7941», «токсинный белок TIC7941», «пестицидный белок TIC7941», «токсины, связанные с TIC7941», «токсинные белки, связанные с TIC7941», TIC7941PL_1, «белок TIC7941PL_1», «белковый токсин TIC7941PL_1», «токсинный белок TIC7941PL_1», «пестицидный белок TIC7941PL_1», «токсины, связанные с TIC7941PL_1», «токсинные белки, связанные с TIC7941PL_1» и т.п. относятся к любому новому пестицидному белку или белку, ингибирующему активность насекомых, который содержит, который состоит из, который по существу гомологичен, который подобен или который получен из любого пестицидного белка или последовательности белка, ингибирующего активность насекомых, TIC7941 (SEQ ID NO:2), TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:4), TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12) и TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14) и их пестицидных или ингибирующих активность насекомых участков или их комбинаций, которые придают активность против чешуекрылых вредителей,

включая любой белок, проявляющий пестицидную активность или ингибирующую активность насекомых, если выравнивание такого белка с TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 приводит к идентичности аминокислотной последовательности любой процентной доли от около 80% до около 100% процентов.

5 Белки TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 включают как нацеленные на пластиды формы белков, так и ненацеленные на пластиды формы белков.

[57] Термин «участок» или «фрагмент» используется в настоящей заявке для описания последовательных последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот, которые короче, чем полная последовательность аминокислот или нуклеиновых кислот, описывающих белок TIC7941. Участок или фрагмент, демонстрирующий ингибирующую активность в отношении насекомых, также раскрыт в настоящей заявке, если выравнивание такого участка или фрагмента с соответствующим участком белка TIC7941, указанного в SEQ ID NO:2, или белка TIC7941PL_1, указанного в SEQ ID NO:4, или белка TIC7941PL_2, указанного в SEQ ID NO:12, или белка TIC7941PL_3, указанного в SEQ ID NO:14, приводит к идентичности аминокислотной последовательности любой доли процента от около 80 до около 100 процентов между участком или фрагментом и соответствующим участком белка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3.

[58] В других конкретных вариантах осуществления фрагмент белка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 может быть определен как проявляющий пестицидную активность, которой обладает исходная молекула белка, из которой он получен. Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей белок TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3, может быть определен как кодирующий белок, проявляющий пестицидную активность, которой обладает молекула белка, кодируемая исходной последовательностью нуклеиновой кислоты, из которой она получена. Описанный в данном документе фрагмент или вариант может дополнительно содержать идентифицированный в данном документе домен, который отвечает за пестицидную активность белка.

[59] В конкретных вариантах осуществления предложены фрагменты белка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3, содержащие по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 75, по меньшей мере около 95, по меньшей мере около 100, по меньшей мере около 125, по меньшей мере около 150, по меньшей мере около 175, по меньшей мере около 200, по меньшей мере около 225, по меньшей мере около 250, по меньшей мере около 275, по меньшей мере около 300, по меньшей мере около 500, по

меньшей мере около 600, по меньшей мере около 700, по меньшей мере около 750, по меньшей мере около 800, по меньшей мере около 900, по меньшей мере около 1000, по меньшей мере около 1100, по меньшей мере около 1150 или по меньшей мере около 1175 смежных аминокислот или более белка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3, обладающего пестицидной активностью, как раскрыто в данном документе. В определенных вариантах осуществления в изобретении предусмотрены фрагменты любой из SEQ ID NO:2, 4, 12 или 14, обладающие активностью полноразмерной последовательности. Способы получения таких фрагментов из исходной молекулы хорошо известны в данной области техники.

10 [60] Ссылки в настоящей заявке на термины «активный» или «активность», «пестицидная активность» или «пестицидный», или «инсектицидная активность», «ингибирующий активность насекомых» или «инсектицидный» относятся к эффективности токсичного вещества, такого как белковый токсин, в ингибировании (ингибировании роста, питания, плодовитости или жизнеспособности), подавлении (подавлении роста, питания, плодовитости или жизнеспособности), борьбе (борьбе с заражением вредителями, борьбе с активностью питания вредителей на конкретной культуре, содержащей эффективное количество белка TIC7941) или уничтожении (вызывании заболеваемости, смертности или снижения плодовитости) вредителя. Эти термины предназначены для включения результата обеспечения пестицидно эффективного количества токсичного белка для вредителя, когда воздействие токсичного белка на вредителя приводит к заболеваемости, смертности, снижению плодовитости или задержке роста. Эти термины также включают отталкивание вредителя от растения, ткани растения, части растения, семени, растительных клеток или от конкретного географического места, где растение может расти, в результате обеспечения пестицидно эффективного количества токсичного белка в растении или на нем. В общем, пестицидная активность относится к способности токсичного белка эффективно ингибировать рост, развитие, жизнеспособность, пищевое поведение, поведение при размножении, плодовитость или любое измеримое уменьшение неблагоприятных эффектов, вызываемых насекомыми, питающимися этим белком, фрагментом белка, участком белка или полинуклеотидом конкретного вредителя-мишени, включая, помимо прочего, насекомых отряда Lepidoptera. Токсичный белок может вырабатываться растением или может быть внесен в растение или в окружающую среду в том месте, где находится растение. Термины «биоактивность», «эффективный», «действенный» или их варианты также являются взаимозаменяемыми

терминами, используемыми в данной заявке, для описания эффектов белков по настоящему изобретению на целевых насекомых-вредителей.

[61] Пестицидно эффективное количество токсичного вещества, когда оно содержится в рационе вредителя-мишени, проявляет пестицидную активность, когда токсичное вещество контактирует с вредителем. Токсичным веществом может быть пестицидный белок или один или несколько химических средств, известных в данной области техники. Пестицидные или инсектицидные химические средства и пестицидные или инсектицидные белковые средства можно использовать по отдельности или в комбинации друг с другом. Химические средства включают, помимо прочего, молекулы дцРНК, нацеленные на конкретные гены для подавления у вредителя-мишени, хлорорганические соединения, органофосфаты, карбаматы, пиретроиды, неоникотиноиды и рианоиды. Пестицидные или инсектицидные белковые средства включают белковые токсины, указанные в настоящей заявке, а также другие белковоподобные токсичные вещества, в том числе те, которые нацелены на чешуекрылых, а также белковые токсины, которые используются для борьбы с другими вредителями растений, такими как белки Cru и Cyt, доступные в области техники для использования в борьбе с видами жесткокрылых, полужесткокрылых и равнокрылых.

[62] Подразумевается, что ссылка на вредителя, в частности вредителя сельскохозяйственных культур, означает насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур, в частности, тех насекомых-вредителей Lepidoptera, которые контролируются классом белковых токсинов TIC7941. Однако ссылка на вредителя может также включать насекомых-вредителей растений, жесткокрылых, полужесткокрылых и равнокрылых, а также нематод и грибов, когда токсичные вещества, нацеленные на этих вредителей, локализованы или присутствуют вместе с белком TIC7941 или белком, который имеет от 80 до около 100 процентов идентичности с белком TIC7941.

[63] Белки TIC7941 связаны общей функцией и проявляют инсектицидную активность в отношении насекомых-вредителей из видов насекомых Lepidoptera, включая взрослых особей, куколок, личинок и новорожденных особей.

[64] Насекомые из отряда Lepidoptera включают, но без ограничения, гусениц, совок, пядениц и гелиотиновых в семействе Noctuidae, *например*, совку травяную (*Spodoptera frugiperda*), совку малую (*Spodoptera exigua*), черную совку луговую (*Spodoptera exempta*), южную совку луговую (*Spodoptera eridania*), гусеницу берта (*Mamestra configurata*), совку-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совку капустную (*Trichoplusia ni*), соевую совку (*Pseudoplusia includens*), гусеницу бархатных бобов (*Anticarsia gemmatalis*), совку

клеверную (*Hypena scabra*), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), совку хлопковую (*Agrotis subterranea*), совку луговую (*Pseudaletia unipuncta*), совку прямоугольную (*Agrotis orthogonia*); бурильщиков, чехлоносок, гусениц, выпускающих паутину, конусных червей, гусениц-капустниц и вредителей, скелетирующих листья, из семейства Pyralidae, *например*, мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), червя пупочного апельсина (*Amyelois transitella*), злакового корневого червя, выпускающего паутину (*Crambus caliginosellus*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), огневку подсолнечниковую (*Homoeosoma electellum*), малого кукурузного точильщика (*Elasmopalpus lignosellus*); листоверток, листоверток-почкоедов, плодояжорок и гусениц-вредителей плодов из семейства Tortricidae, *например*, плодояжорку яблочную (*Cydia pomonella*), листовертку виноградную (*Endopiza viteana*), плодояжорку восточную персиковую (*Grapholita molesta*), листовертку почковую подсолнечниковую (*Suleima helianthana*); и много других экономически важных видов Lepidoptera, *например*, моль капустную (*Plutella xylostella*), розового коробочного червя (*Pectinophora gossypiella*) и шелкопряда непарного (*Lymantria dispar*). Другие насекомые-вредители из отряда Lepidoptera включают, *например*, совку хлопковую американскую (*Alabama argillacea*), листовертку плодовых деревьев (*Archips argyrospila*), европейскую листовертку (*Archips rosana*) и другие виды Archips, (*Chilo suppressalis*, огневка азиатская стеблевая или сверлильщик рисовый стеблевой), листовертку рисовую (*Cnaphalocrocis medinalis*), злакового корневого червя, выпускающего паутину (*Crambus caliginosellus*), гусеницу мятлика лугового, выпускающую паутину (*Crambus teterrellus*), огневку кукурузную юго-западную (*Diatraea grandiosella*), точильщика сахарного тростника (*Diatraea saccharalis*), совку хлопковую египетскую (*Earias insulana*), совку пятнистую (*Earias vittella*), совку хлопковую (*Helicoverpa armigera*), совку хлопковую (*Helicoverpa zea*, также известную как соевый коробочный червь и хлопковый коробочный червь), табачную листовертку (*Heliothis virescens*), лугового мотылька (*Herpetogramma licarsisalis*), западную бобовую совку (*Striacosta albicosta*), листовертку гроздевую винного винограда (*Lobesia botrana*), цитрусового листового минера (*Phyllocnistis citrella*), капустницу (*Pieris brassicae*), белянку репную (*Pieris rapae*, также известную как репница), совку малую (*Spodoptera exigua*), азиатскую хлопковую совку (*Spodoptera litura*, также известную как гусеница гроздевая) и томатного минера (*Tuta absoluta*).

[65] Ссылка в настоящей заявке на «выделенную молекулу ДНК» или эквивалентный термин или фразу предназначена для обозначения того, что молекула ДНК представляет собой молекулу, которая присутствует сама по себе или в комбинации с

другими композициями, но не в ее природной среде. Например, элементы нуклеиновой кислоты, такие как кодирующая последовательность, интронная последовательность, нетранслируемая лидерная последовательность, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и т.п., которые в природе обнаруживаются в ДНК генома организма, не считаются «выделенными» до тех пор, пока элемент находится в геноме организма и в том месте внутри генома, в котором он обнаружен в природе. Однако каждый из этих элементов и подчасти этих элементов будут «выделены» в рамках изобретения, пока элемент не находится в геноме организма и в том месте в геноме, в котором он обнаружен в природе. Аналогично нуклеотидная последовательность, кодирующая инсектицидный белок или любой встречающийся в природе инсектицидный вариант этого белка, будет выделенной нуклеотидной последовательностью при условии, что нуклеотидная последовательность не находится в ДНК бактерии, в которой в естественных условиях находится последовательность, кодирующая белок. Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислотную последовательность встречающегося в природе инсектицидного белка, будет считаться выделенной для целей настоящего изобретения. Для целей настоящего изобретения любая трансгенная нуклеотидная последовательность, *т.е.* нуклеотидная последовательность ДНК, вставленная в геном клеток растения или бактерии или присутствующая во внехромосомном векторе, будет считаться выделенной нуклеотидной последовательностью независимо от того, присутствует ли она в плазмиде или аналогичной структуре, используемой для трансформации клеток, в геноме растения или бактерии, или присутствует в обнаруживаемых количествах в тканях, потомстве, биологических образцах или товарных продуктах, полученных из растения или бактерии.

[66] Как используется в данном документе, «молекула рекомбинантной ДНК» представляет собой молекулу ДНК, содержащую комбинацию молекул ДНК, которые не могли бы встречаться вместе в природе без вмешательства человека. Например, молекула рекомбинантной ДНК может представлять собой молекулу ДНК, которая состоит по меньшей мере из двух молекул ДНК, гетерологичных по отношению друг к другу, молекулу ДНК, которая содержит последовательность ДНК, отличающуюся от последовательностей ДНК, существующих в природе, или молекулу ДНК, которая вставлена в ДНК клетки-хозяина путем генетической трансформации или редактирования гена. Аналогично «молекула рекомбинантного белка» представляет

собой молекулу белка, содержащую комбинацию аминокислот, которые не могли бы встречаться вместе в природе без вмешательства человека. Например, молекула рекомбинантного белка может представлять собой молекулу белка, которая состоит из по меньшей мере двух гетерологичных по отношению друг к другу молекула аминокислоты, молекулу белка, которая содержит аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотных последовательностей, существующих в природе, или молекулу белка, которая экспрессируется в клетке-хозяине в результате генетической трансформации клетки-хозяина или путем редактирования гена в геноме клетки-хозяина.

5 [67] Как описано далее в настоящей заявке, открытая рамка считывания (ORF), кодирующая TIC7941 (SEQ ID NO:2), была обнаружена в ДНК, полученной из штамма *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651. Кодирующую последовательность клонировали и экспрессировали в микробных клетках-хозяевах для получения рекомбинантных белков, используемых в биоанализах. Биологический анализ с использованием белков
15 TIC7941, полученных из микробных клеток-хозяев, продемонстрировал активность против видов чешуекрылых, совки-ипсилон (*Agrotis ipsilon*), совки хлопковой (*Helicoverpa zea*), мотылька кукурузного (*Ostrinia nubilalis*), южной совки луговой (*Spodoptera eridania*), соевой совки (*Chrysodeixis includens*) и огневки кукурузной юго-западной (*Diatraea grandiosella*).

20 [68] Синтетические последовательности, кодирующие TIC7941 и варианты TIC7941, были разработаны для экспрессии в растительной клетке. Кодирующая последовательность TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:3) кодирует инсектицидный белок TIC7941PL_1, который идентичен последовательности белка TIC7941, за исключением дополнительной аминокислоты аланина, вставленной после иницилирующего метионина для улучшения экспрессии. При экспрессии в трансгенной кукурузе
25 TIC7941PL_1 продемонстрировал инсектицидную активность против совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совки хлопковой (CEW, *Helicoverpa zea*) и огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*) в анализах листового диска. При экспрессии в трансгенных растениях сои TIC7941PL_1 демонстрирует инсектицидную
30 активность против южной совки луговой (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*) и соевого коробочного червя (SPW, *Helicoverpa zea*) в анализах листового диска. Кодирующая последовательность TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:11) и кодирующая последовательность TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:13) кодируют инсектицидные белки TIC7941PL_2 (SEQ ID NO:12) и TIC7941PL_3 (SEQ ID NO:14)

соответственно. Они содержат дополнительную аминокислоту аланин, вставленную после иницирующего метионина для улучшения экспрессии. И TIC7941PL_2, и TIC7941PL_3 также содержат фрагмент пептида, связывающего белок трансмембранного переносчика ABC (ABCc4) совки травяной, вставленный в петлю домена 2 TIC7941. В TIC7941PL_2 фрагмент, связывающий белок ABCc4, расположен в положениях 796–807 аминокислоты. В TIC7941PL_3 фрагмент, связывающий белок ABCc4, расположен в положениях 795–806 аминокислоты.

[69] Для экспрессии в растительных клетках белок TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 может экспрессироваться, чтобы находиться в цитозоле, или нацеливаться на различные органеллы растительной клетки. Например, нацеливание белка на хлоропласт может привести к повышенным уровням экспрессируемого белка в трансгенном растении, в то же время предотвращая возникновение второстепенных фенотипов. Нацеливание также может привести к повышению эффективности устойчивости к вредителям в трансгенном объекте. Пептид-мишень или транзитный пептид представляет собой короткую (длиной от 3 до 70 аминокислот) пептидную цепь, которая направляет транспортировку белка в конкретную область клетки, включая ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум (ER), хлоропласт, апопласт, пероксисому и плазматическую мембрану. Некоторые пептиды-мишени отщепляются от белка сигнальными пептидазами после транспортировки белков. Для нацеливания на хлоропласт белки содержат транзитные пептиды, состоящие из около 40–50 аминокислот. Описание использования транзитных пептидов хлоропластов см. в патентах США №№ 5188642 и 5728925. Многие локализованные в хлоропласте белки экспрессируются из ядерных генов в качестве предшественников и нацелены на хлоропласт с помощью транзитного пептида хлоропласта (СТР). Примеры таких выделенных белков хлоропластов включают, помимо прочего, белки, связанные с малой субъединицей (SSU) рибулоза-1,5,-бисфосфаткарбоксилазы, ферредоксина, ферредоксина оксидоредуктазы, светособирающего комплекса белка I и белка II, тиоредоксина F, энолпирувилшिकимат-фосфатсинтазы (EPSPS) и транзитных пептидов, описанных в патенте США № 7193133. Было продемонстрировано *in vivo* и *in vitro*, что белки, не относящиеся к хлоропластам, могут быть нацелены на хлоропласт с помощью слияния белков с гетерологичным СТР, и что СТР достаточно для нацеливания белка на хлоропласт. Включение подходящего транзитного пептида хлоропласта, такого как *Arabidopsis thaliana* EPSPS СТР (СТР2) (см. Klee *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) или *Petunia hybrida* EPSPS СТР (СТР4) (см. della-Cioppa *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 83:6873-6877, 1986), продемонстрировало нацеливание гетерологичных белковых последовательностей EPSPS на хлоропласты трансгенных растений (см. патент США №№ 5627061; 5633435 и 5312910; и EP 0218571; EP 189707; EP 508909 и EP 924299). Для нацеливания токсинового белка TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 на хлоропласт последовательность, кодирующая транзитный пептид хлоропласта, помещается в 5'-положении в функциональной связи и в рамке с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует токсинотический белок TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3, разработанный для оптимальной экспрессии в растительных клетках.

10 [70] Предполагается, что дополнительные последовательности токсинотического белка, относящиеся к TIC7941, могут быть созданы с использованием аминокислотной последовательности TIC7941 для создания новых белков с новыми свойствами. Токсинотические белки TIC7941 могут быть выровнены для объединения различий на уровне аминокислотной последовательности в новые варианты аминокислотной последовательности и внесения соответствующих изменений в последовательность рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующую варианты.

15 [71] Настоящее раскрытие дополнительно предполагает, что улучшенные варианты класса белковых токсинов TIC7941 могут быть созданы *in planta* с использованием различных способов редактирования генов, известных в данной области техники. Такие технологии, используемые для редактирования генома, включают, помимо прочего, ZFN (нуклеазу белкового домена «цинковые пальцы»), мегануклеазы, TALEN (эффеторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) / Cas-системы (связанные с CRISPR). Эти методы редактирования генома можно использовать для изменения кодирующей последовательности токсинотического белка, трансформированной в растительной клетке, в другую кодирующую последовательность токсина. В частности, с помощью этих методов один или несколько кодонов в кодирующей последовательности токсина изменяются для создания новой аминокислотной последовательности белка. Альтернативно фрагмент в кодирующей последовательности заменяется или удаляется, или дополнительные фрагменты ДНК вставляются в кодирующую последовательность для создания новой кодирующей последовательности токсина. Новая кодирующая последовательность может кодировать токсинотический белок с новыми свойствами, такими как повышенная активность или спектр против насекомых-вредителей, а также обеспечивать активность

против видов насекомых-вредителей, у которых развилась устойчивость к исходному токсинному белку насекомых. Растительная клетка, содержащая отредактированную геном кодирующую последовательность токсина, может быть использована способами, известными в данной области техники, для создания целых растений, экспрессирующих новый токсинный белок.

[72] Также предполагается, что фрагменты TIC7941 или его вариантов белка могут быть усеченными формами, в которых одна или несколько аминокислот удалены из N-концевой области, C-концевой области, середины белка, или их комбинациями, где фрагменты и варианты сохраняют ингибирующую активность в отношении насекомых.

Эти фрагменты могут быть встречающимися в природе или синтетическими вариантами TIC7941 или производными вариантами белка, но должны сохранять ингибирующую активность в отношении насекомых по меньшей мере TIC7941. Описанный в данном документе фрагмент или вариант может дополнительно содержать идентифицированный в данном документе домен, который отвечает за пестицидную активность белка.

[73] Белки, которые подобны белкам из класса белковых токсинов TIC7941, можно идентифицировать и сравнивать друг с другом с использованием различных компьютерных алгоритмов, известных в данной области техники (см. таблицу 1). Идентичность аминокислотных последовательностей, представленная в настоящей заявке, является результатом выравнивания с помощью Clustal W с использованием следующих параметров по умолчанию: матрица сравнения: blosum, штраф на внесение делеции в выравнивание: 10,0, штраф на продолжение делеции: 0,05, гидрофильные остатки: включены, гидрофильные остатки: GPSNDQERK, штрафы за остаток конкретного гэта: включены (Thompson, *et al* (1994) Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Процент идентичности аминокислот дополнительно рассчитывают как произведение 100%-го умножения на (идентичность аминокислот/длина исследуемого белка). Другие алгоритмы выравнивания также доступны в данной области техники и обеспечивают результаты, аналогичные результатам, полученным с использованием выравнивания Clustal W, и рассматриваются в данном документе.

[74] Предполагается, что белок, проявляющий ингибирующую активность против видов насекомых-чешуекрылых, связан с членом класса белковых токсинов TIC7941, если белок используется в запросе, например, в выравнивании Clustal W, и белки по настоящему изобретению, как указано в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:8 или SEQ ID NO:10, идентифицированы как совпадения в таком выравнивании, в котором

запрашиваемый белок демонстрирует от по меньшей мере 80% до около 100% идентичность аминокислотной последовательности по длине запрашиваемого белка, которая составляет около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% или любой процент в этом диапазоне.

[75] Помимо процента идентичности белки TIC7941 также могут быть связаны по первичной структуре (консервативные аминокислотные мотивы), по длине (около 807 аминокислот) и по другим характеристикам. Характеристики белковых токсинов TIC7941 приведены в таблице 1.

Таблица 1. Выбранные характеристики класса белковых токсинов TIC7941.

<u>Белок</u>	<u>Молекулярная масса (в Дальтонах)</u>	<u>Длина аминокислоты</u>	<u>Изоэлектрическая точка</u>	<u>Заряд при pH 7,0</u>	<u>Количество сильноосновных (-) аминокислот</u>	<u>Количество сильно-кислых аминокислот</u>	<u>Количество гидрофобных аминокислот</u>	<u>Количество полярных аминокислот</u>
TIC7941	91187,48	807	4,4561	-35,5	87	118	394	413
TIC7941P L_1	91258,56	808	4,4561	-35,5	87	118	395	413
TIC7941P L_2	92245,74	817	4,4414	-36,5	87	119	402	415
TIC7941P L_3	92203,70	817	4,4544	-35,5	87	118	402	415

[76] Как описано далее в примерах, последовательности молекул синтетических нуклеиновых кислот, кодирующие варианты TIC7941, были разработаны для использования в растениях. Типичные последовательности молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые были разработаны для использования в растениях, кодирующие белки TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3, представлены SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13 соответственно. Белки TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 имеют дополнительную аминокислоту аланин сразу после иницирующего метионина по сравнению с белком TIC7941. Считается, что этот дополнительный остаток аланин улучшает экспрессию белка *in planta*. Белки TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 также содержат фрагмент, связывающий пептид ABCc4, для повышения эффективности белков против совки травяной (*Spodoptera frugiperda*).

[77] Кассеты экспрессии и векторы, содержащие последовательность молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, могут быть сконструированы и введены в клетки растений кукурузы, сои или хлопка в соответствии со способами и методами трансформации, известными в данной области техники. Например, *Agrobacterium-*

опосредованная трансформация описана в публикациях заявок на патент США 2009/0138985A1 (соя), 2008/0280361A1 (соя), 2009/0142837A1 (кукуруза), 2008/0282432 (хлопок), 2008/0256667 (хлопок), 2003/0110531 (пшеница), 2001/0042257 A1 (сахарная свекла), в патентах США №№ 5750871 (канола), 7026528 (пшеница) и 6365807 (рис), и у Arencibia *et al.* (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (сахарный тростник), все из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки. Трансформированные клетки можно регенерировать в трансформированные растения, которые экспрессируют белок TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 и демонстрируют пестицидную активность с помощью биологических анализов, проводимых в присутствии личинок чешуекрылых вредителей с использованием листовых дисков растений, полученных из трансформированных растений. Растения могут быть получены из растительных клеток методами регенерации, посева, пыльцы или трансформации меристемы. Способы трансформации растений известны в данной области техники.

[78] В качестве альтернативы традиционным методам трансформации последовательность ДНК, такая как трансген, кассета(-ы) экспрессии и т. д., может быть вставлена или интегрирована в конкретный сайт или локус в геноме растения или растительной клетки посредством сайт-направленной интеграции. Конструкция(-и) и молекула(-ы) рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению могут, таким образом, включать донорскую матричную последовательность, содержащую по меньшей мере один трансген, кассету экспрессии или другую последовательность ДНК для вставки в геном растения или растительной клетки. Такая донорная матрица для сайт-направленной интеграции может дополнительно включать одно или два плеча гомологии, фланкирующих последовательность вставки (*m.e.* последовательность, трансген, кассету и т.д., которые должны быть вставлены в геном растения). Конструкция(-и) рекомбинантной ДНК по настоящему изобретению может дополнительно содержать кассету(-ы) экспрессии, кодирующую сайт-специфичную нуклеазу и/или любой связанный(-е) белок(-ки) для осуществления сайт-направленной интеграции. Эти кассеты, экспрессирующие нуклеазу, могут присутствовать в той же молекуле или векторе, что и донорная матрица (в цис), или в отдельной молекуле или векторе (в транс). В данном уровне техники известно несколько способов сайт-направленной интеграции, включающих различные белки (или комплексы белков и/или направляющую РНК), которые разрезают геномную ДНК с образованием двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва в желаемом сайте или

локусе генома. Вкратце, как известно в данной области техники, в процессе репарации DSB или одноцепочечного разрыва, введенного ферментом нуклеазой, донорная матричная ДНК может интегрироваться в геном сайте DSB или одноцепочечного разрыва. Присутствие плечей гомологии в донорной матрице может способствовать усвоению и нацеливанию последовательности вставки в геном растения во время процесса репарации посредством гомологичной рекомбинации, хотя событие вставки может происходить из-за негомологичного соединения концов (NHEJ). Примеры сайт-специфичных нуклеаз, которые можно использовать, включают нуклеазы цинковых пальцев, сконструированные или нативные мегануклеазы, TALE-эндонуклеазы и РНК-направляемые эндонуклеазы (например, Cas9 или Cpf1). Для способов с использованием РНК-направляемых сайт-специфических нуклеаз (например, Cas9 или Cpf1) рекомбинантная ДНК-конструкция(-и) также будет содержать последовательность, кодирующую одну или несколько направляющих РНК, чтобы направлять нуклеазу в необходимый сайт в геноме растения.

[79] Предусмотрены композиции молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, которые кодируют белки TIC7941. Например, белки TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 могут экспрессироваться с помощью конструкций рекомбинантной ДНК, в которых молекула полинуклеотида с ORF, кодирующей белок, функционально связана с элементами экспрессии гена, такими как промотор и любой другой регуляторный элемент, необходимый для экспрессии в системе, для которой предназначена конструкция. Неограничивающие примеры включают функциональный промотор растения, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок TIC7941, для экспрессии белка в растениях, или функциональный промотор *Bt*, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок TIC7941, для экспрессии белка в бактерии *Bt* или другом виде *Bacillus*. Другие элементы могут быть функционально связаны с последовательностью, кодирующей белок TIC7941, включая, но не ограничиваясь ими, энхансеры, интроны, нетранслируемые лидеры, метки иммобилизации кодируемых белков (HIS-метка), транслокационные пептиды (*m.e.* пластидные транзитные пептиды, сигнальные пептиды), полипептидные последовательности для посттрансляционных модифицирующих ферментов, сайтов связывания рибосом и сайтов-мишеней RNAi. Иллюстративные молекулы рекомбинантного полинуклеотида, представленные в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, гетерологичный промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, таким как SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7,

SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13, которые кодируют соответствующие полипептиды или белки, имеющие аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 и SEQ ID NO:14. Гетерологичный промотор также может быть функционально связан с кодирующими последовательностями синтетической ДНК, которые кодируют нацеленный на пластид TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3 или ненацеленный TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3. Кодоны молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей описанные в данном документе белки, могут быть заменены синонимичными кодонами (известными в данной области техники как «скрытая замена»).

[80] Конструкция рекомбинантной ДНК, содержащая последовательность, кодирующую белок TIC7941, может дополнительно содержать область ДНК, которая кодирует один или несколько агентов, ингибирующих активность насекомых, которая может быть приспособлена для одновременной экспрессии или совместной экспрессии с последовательностью ДНК, кодирующей белок TIC7941, белок, отличный от белка TIC7941, молекулу дцРНК, ингибирующую активность насекомых, или вспомогательный белок. Вспомогательные белки включают, но не ограничиваются ими, кофакторы, ферменты, партнеры по связыванию или другие вещества, которые действуют для повышения эффективности вещества, ингибирующего активность насекомых, например, способствуя его экспрессии, влияя на его стабильность в растениях, оптимизируя свободную энергию для олигомеризации, увеличивая его токсичность и увеличивая спектр действия. Вспомогательный белок может облегчить поглощение одного или нескольких веществ, ингибирующих активность насекомых, например, или усилить токсические эффекты токсичного вещества.

[81] Конструкция рекомбинантной ДНК может быть собрана так, чтобы все белки или молекулы дцРНК экспрессировались из одного промотора, или каждая молекула белка или дцРНК находилась под контролем отдельного промотора или некоторой их комбинации. Белки по настоящему изобретению могут экспрессироваться из системы экспрессии большого количества генов, в которой один или несколько белков из класса белковых токсинов TIC7941 экспрессируются из общего нуклеотидного участка, который также содержит другие открытые рамки считывания и промоторы, в зависимости от типа выбранной системы экспрессии. Например, система экспрессии большого количества генов бактерий может использовать один промотор для управления экспрессией многократно-связанных/тандемных открытых рамок

считывания из одного оперона (*т.е.*, полицистронная экспрессия). В другом примере система экспрессии большого количества генов растений может использовать многократно-несвязанные или связанные кассеты экспрессии, причем каждая кассета экспрессирует разный белок или другое вещество, такое как одна или несколько молекул дцРНК.

5 [82] Рекомбинантные полинуклеотиды или конструкции рекомбинантной ДНК, содержащие последовательность, кодирующую белок TIC7941, могут быть доставлены в клетки-хозяева с помощью векторов, *например*, плазмиды, бакуловируса, синтетической хромосомы, вириона, космиды, фагмиды, фага или вирусного вектора. 10 Такие векторы можно использовать для достижения стабильной или временной экспрессии последовательности, кодирующей белок TIC7941, в клетке-хозяине или последующей экспрессии кодируемого полипептида. Экзогенный рекомбинантный полинуклеотид или конструкция рекомбинантной ДНК, которая содержит последовательность, кодирующую белок TIC7941 и введенная в клетку-хозяина, 15 называется в настоящей заявке «трансгеном».

[83] В данном документе представлены трансгенные бактерии, трансгенные растительные клетки, трансгенные растения и части трансгенных растений, которые содержат рекомбинантный полинуклеотид, который экспрессирует последовательность, кодирующую белок TIC7941, TIC7941_His, TIC7941PL_1, 20 TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3. Термин «бактериальная клетка» или «бактерия» может включать, но не ограничивается ими, клетку *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia* или *Rhizobium*. Термин «растительная клетка» или «растение» может включать, но не ограничивается ими, двудольные или однодольные растения. Термин «растительная клетка» или 25 «растение» может также включать, но без ограничения, клетки или растение люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты кочанной, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокоса, кофе, кукурузы, клевера, хлопка, тыквы, огурца, лжетцуги, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, 30 овса, оливки, лука, декоративных растений, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневища, ржи, сафлора, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, тыквы крупноплодной, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса

путьевидного, чая, табака, помидора, тритикале, дернообразующей травы, арбуза и пшеницы. В некоторых вариантах осуществления предусмотрены трансгенные растения и части трансгенных растений, регенерированные из клетки трансгенного растения. В некоторых вариантах осуществления трансгенные растения могут быть

5 получены из трансгенных семян путем разрезания, надрезания, измельчения или иного отделения части от растения. В некоторых вариантах осуществления часть растения может представлять собой семя, семенную коробочку, лист, цветок, стебель, корень или любую их часть, или нерегенерируемую часть данной части трансгенного растения. В данном контексте «нерегенерируемая» часть данной части трансгенного растения

10 представляет собой часть, которая не может быть использована для образования целого растения или которая не может быть использована для образования целого растения, способного к половому и/или бесполому размножению. В некоторых вариантах осуществления нерегенерируемая часть данной части растения представляет собой часть трансгенного семени, семенной коробочки, листа, цветка, стебля или корня.

15 [84] Предусмотрены способы получения трансгенных растений, содержащих количества белка ПС7941, ингибирующие активность чешуекрылых насекомых. Такие растения могут быть получены путем введения рекомбинантного полинуклеотида, который кодирует любой из белков, представленных в настоящей заявке, в растительную клетку и выбора растения, полученного из указанной растительной

20 клетки, которая экспрессирует количество белков, ингибирующих активность насекомых из отряда Lepidoptera. Растения могут быть получены из растительных клеток методами регенерации, посева, пыльцы или трансформации меристемы. Способы трансформации растений известны в данной области техники.

[85] Обработанные растительные продукты, в которых обработанный продукт

25 содержит определяемое количество белка ПС7941, участок или его фрагмент, ингибирующий активность насекомых, или любую их отличную часть, также раскрыты в данном документе. В некоторых вариантах осуществления обработанный продукт выбран из группы, состоящей из частей растений, растительной биомассы, масла, муки крупного помола, сахара, корма для животных, муки, хлопьев, отрубей, ворса, шелухи,

30 обработанных семян и семян. В некоторых вариантах осуществления обработанный продукт не подлежит регенерации. Растительный продукт может включать товар или другие коммерческие продукты, полученные из трансгенного растения или части трансгенного растения, где товар или другие продукты можно отслеживать посредством торговли путем обнаружения нуклеотидных участков или

экспрессированной РНК или белков, которые кодируют или содержат отличающиеся части белка TIC7941.

[86] Растения, экспрессирующие белок TIC7941, можно скрещивать путем скрещивания с трансгенными объектами, экспрессирующими другие токсинные белки и/или экспрессирующими другие трансгенные признаки, такие как гены устойчивости к гербицидам, гены, придающие урожайность, или признаки устойчивости к стрессу и т.п., или такие признаки могут быть объединены в один вектор, чтобы все признаки были связаны.

[87] Как дополнительно описано в примерах, класс белкового токсина TIC7941 и последовательности, имеющие значительную процентную идентичность с членом класса белкового токсина TIC7941, могут быть идентифицированы с использованием методов, известных специалистам в данной области техники, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), термическая амплификация и гибридизация. Например, белки из класса белковых токсинов TIC7941 могут использоваться для получения антител, которые специфически связываются с родственными белками, и могут использоваться для скрининга и поиска других членов белков, которые тесно связаны.

[88] Кроме того, нуклеотидные последовательности, кодирующие токсинные белки TIC7941, можно использовать в качестве зондов и праймеров для скрининга для идентификации других членов этого класса с использованием методов термической или изотермической амплификации и гибридизации. Например, олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13, можно использовать для определения присутствия или отсутствия трансгена TIC7941 в образце дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученном из товарного продукта. Учитывая чувствительность определенных методов обнаружения нуклеиновых кислот, в которых используются олигонуклеотиды, ожидается, что олигонуклеотиды, полученные из последовательностей, указанных в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13, могут быть использованы для обнаружения трансгена TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 в товарных продуктах, полученных из объединенных источников, где только часть товарного продукта получена из трансгенного растения, содержащего любой из трансгенов. Кроме того, известно, что такие олигонуклеотиды можно использовать для введения вариации нуклеотидной последовательности в каждую из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13. Такие олигонуклеотиды «мутагенеза» подходят для идентификации вариантов аминокислотной последовательности класса белковых токсинов TIC7941,

проявляющих диапазон ингибирующей активности в отношении насекомых или различной экспрессии в клетках-хозяевах трансгенных растений.

[89] Гомологи нуклеотидных последовательностей, *например*, инсектицидные белки, кодируемые нуклеотидными последовательностями, которые гибридизуются с каждой или любой из последовательностей, раскрытых в настоящей заявке, в жестких условиях гибридизации, также являются вариантом осуществления настоящего изобретения. Изобретение также обеспечивает способ обнаружения первой нуклеотидной последовательности, которая гибридизуется со второй нуклеотидной последовательностью, где первая нуклеотидная последовательность (или ее обратная последовательность комплемента) кодирует пестицидный белок или его пестицидный фрагмент и гибридизуется со второй нуклеотидной последовательностью. В таком случае вторая нуклеотидная последовательность может быть любой из нуклеотидных последовательностей, представленных как SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:13 в строгих условиях гибридизации. Нуклеотидные кодирующие последовательности гибридизуются друг с другом в соответствующих условиях гибридизации, таких как строгие условия гибридизации, и белки, кодируемые этими нуклеотидными последовательностями, перекрестно реагируют с антисывороткой, полученной в отношении любого из других белков. Строгие условия гибридизации, как определено в данном документе, включают по меньшей мере гибридизацию при 42 °C с последующими двумя промывками по пять минут каждая при комнатной температуре посредством 2X SSC, 0,1% SDS, с последующими двумя промывками по 30 минут каждая при 65 °C в 0,5X SSC, 0,1% SDS. Промывки при еще более высоких температурах представляют собой еще более строгие условия, *например*, условия гибридизации 68°C с последующей промывкой при 68°C в 2xSSC, содержащем 0,1% SDS.

[90] Специалист в данной области техники поймет, что из-за избыточности генетического кода многие другие последовательности способны кодировать такие родственные белки, и эти последовательности в той степени, в которой они функционируют для экспрессии пестицидных белков либо в штаммах *Bacillus*, либо в растительных клетках, являются вариантами осуществления настоящего изобретения, учитывая, конечно, что многие такие избыточные кодирующие последовательности не будут гибридизироваться в этих условиях с нативными последовательностями *Bacillus* или *Paenibacillus*, кодирующими TIC7941. Настоящая заявка предполагает использование этих и других методов идентификации, известных специалистам в

данной области техники, для идентификации последовательностей, кодирующих белок TIC7941, и последовательностей, имеющих существенную процентную идентичность с последовательностями, кодирующими белок TIC7941.

[91] Настоящее изобретение также предполагает использование молекулярных методов, известных в данной области техники, для конструирования и клонирования коммерчески пригодных белков, содержащих химеры белков из пестицидных белков; например, химеры могут быть собраны из участков белков, связанных с TIC7941, для получения дополнительных подходящих вариантов осуществления, включая сборку участков TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 с участками различных белков, отличных от TIC7941, TIC7941PL_1, TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3; и родственных белков. Белки TIC7941 могут быть подвергнуты выравниванию друг с другом и с другими *Bacillus*, *Paenibacillus* или другими пестицидными белками (независимо от того, являются ли они тесно или отдаленно родственными филогенетически), и участки каждого такого белка могут быть идентифицированы как пригодные для замены между выровненными белками, что приводит к созданию химерных белков. Такие химерные белки можно подвергнуть биоанализу в отношении вредителей и охарактеризовать на наличие или отсутствие повышенной биоактивности или расширенного спектра целевых вредителей по сравнению с родительскими белками, из которых был получен каждый такой участок в химере. Пестицидная активность полипептидов может быть дополнительно сконструирована для активности в отношении конкретного вредителя или более широкого спектра вредителей путем замены доменов или участков другими белками или с использованием методов направленной эволюции, известных в данной области техники.

[92] Кроме того, настоящее изобретение предполагает конструирование варианта пестицидного белка путем вставки пептидных последовательностей в нативный пестицидный белок, который может улучшить пестицидную активность в отношении конкретных видов насекомых-вредителей. Вставленный пептид связывается с рецептором в средней кишке насекомого. Специфическое связывание эндотоксина со специфическими рецепторами, расположенными в средней кишке насекомых, является одним из стадий пестицидного действия пестицидного белка. Было описано, что по меньшей мере пять различных рецепторов белка участвуют во взаимодействиях, приводящих к гибели насекомых: кадгерин-подобный белок (CADR), гликозилфосфатидилинозит-(GPI)-заякоренная аминопептидаза-N (APN), GPI-заякоренная щелочная фосфатаза (ALP), трансмембранный переносчик ABC и

«дезинтегрин и металлопротеиназа» или ADAM-металлопротеиназа. Кроме того, предполагается, что гликолипиды также являются важными молекулами Cry-рецепторов у насекомых и нематод (*Pigott et al. (2007) Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 71(2): 255-281; Ochoa-Campuzano et al. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa Bacillus thuringiensis toxin receptor. Biochemical and Biophysical Research Communication, 362(2): 437-442*). Фрагмент пептида FAWPERBIN связывается с трансмембранным переносчиком ABC ABCc4 совки травяной (FAW). Вставка кодирующей последовательности FAWPERBIN_Bac (SEQ ID NO:15), кодирующей пептид FAWPERBIN (SEQ ID NO:17), в петлю домена 2 TIC7941 увеличивала пестицидную активность против FAW в некоторых вариантах. В частности, вставка FAWPERBIN в аминокислотные положения 805-816 в TIC7941_2His привела к незначительной активности против FAW или к ее отсутствию, тогда как вставка FAWPERBIN в аминокислотные положения 804-815 TIC7941_3His продемонстрировала активность против FAW.

[93] Синтетическая последовательность ДНК, кодирующая пептид FAWPERBIN, FAWPERBIN_PL (SEQ ID NO:16), была разработана для экспрессии в растительной клетке. FAWPERBIN_PL находится между положениями нуклеотидов 2386 и 2421 синтетической кодирующей последовательности TIC7941PL_2 и в положениях нуклеотидов 2383-2418 синтетической кодирующей последовательности TIC7941PL_3. Фрагмент пептида FAWPERBIN расположен в аминокислотных положениях 796-807 TIC7941PL_2 и 795-806 TIC7941PL_3. Растения кукурузы трансформировали бинарными векторами, содержащими трансгенные кассеты, используемые для экспрессии TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3. Растения, экспрессирующие TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3, будут использоваться для анализа пестицидной активности сконструированных токсинов против FAW.

[94] В настоящей заявке также раскрыты способы борьбы с насекомыми, в частности с заражениями Lepidoptera сельскохозяйственных растений, с помощью белков TIC7941. Такие способы могут включать выращивание растения, содержащего количество токсинного белка TIC7941, ингибирующего активность насекомых или чешуекрылых. В некоторых вариантах осуществления такие способы могут дополнительно включать любое одно или несколько из: (i) нанесения любой композиции, содержащей или кодирующей токсинный белок TIC7941, на растение или семя, из которого вырастает растение; и (ii) трансформации растения или

растительной клетки, из которых вырастает растение, полинуклеотидом, кодирующим токсинный белок TIC7941. В общем, предполагается, что токсинный белок TIC7941 может быть предоставлен в композиции, предоставлен в микроорганизме или предоставлен в трансгенном растении для придания ингибирующей активности против чешуекрылых насекомых.

5 [95] В некоторых вариантах осуществления молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты токсинного белка TIC7941 представляет собой пестицидно активный ингредиент композиции, ингибирующей активность насекомых, полученной путем культивирования рекомбинантной клетки *Bacillus* или любой другой рекомбинантной

10 бактериальной клетки, трансформированной для экспрессии токсинного белка TIC7941 в условиях, подходящих для экспрессии токсинного белка TIC7941. Такая композиция может быть составлена путем сушки, лиофилизации, гомогенизации, экстракции, фильтрации, центрифугирования, седиментации или концентрирования культуры таких рекомбинантных клеток, экспрессирующих/продуцирующих

15 указанный рекомбинантный полипептид. Такой процесс может привести к получению *Bacillus* или другого экстракта энтомопатогенных бактериальных клеток, клеточной суспензии, клеточного гомогената, клеточного лизата, клеточного супернатанта, клеточного фильтрата или клеточного осадка. Путем получения рекомбинантных полипептидов, полученных таким образом, композиция, которая содержит

20 рекомбинантные полипептиды, может содержать бактериальные клетки, бактериальные споры и параспоральные тельца включения и может быть составлена для различных применений, в том числе в виде продуктов для опрыскивания сельскохозяйственных насекомых или в виде составов, ингибирующих активность насекомых, в биопробах питания.

25 [96] В одном варианте осуществления для снижения вероятности развития устойчивости композиция, ингибирующая активность насекомых, содержащая токсинный белок TIC7941, может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полипептид, который проявляет ингибирующую активность в отношении насекомых в отношении того же вида чешуекрылых насекомых, но который

30 отличается от токсинного белка TIC7941. Возможные дополнительные полипептиды для такой композиции включают любой белок, ингибирующий активность насекомых, или молекулу дцРНК, ингибирующую активность насекомых, известные среднему специалисту в данной области техники. Один пример использования таких рибонуклеотидных последовательностей для борьбы с насекомыми-вредителями

описан в Baum, *et al.* (публикация патента США 2006/0021087 A1). Такой дополнительный полипептид для борьбы с чешуекрылыми вредителями может быть выбран из группы, состоящей из белка, ингибирующего активность насекомых, такого как, но без ограничения, Cry1A (патент США № 5880275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (публикация патента США № 10/525318), Cry1C (патент США № 6033874), Cry1D, Cry1Da и его варианты, Cry1E, Cry1F, и химеры Cry1A/F (патенты США №№ 7070982; 6962705 и 6713063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, химеры Cry1-типа, такие как, но без ограничения, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 и TIC1100 (публикация международной заявки WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (публикация международной заявки WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (патент США № 7064249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035 и AXMI-045 (публикация патента США 2013-0117884 A1), AXMI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (публикация патента США 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (публикация патента США 2013-0104259 A1), AXMI-134 (публикация патента США 2013-0167264 A1), AXMI-150 (публикация патента США 2010-0160231 A1), AXMI-184 (публикация патента США 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (публикация патента США 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (публикация патента США 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (публикация патента США 2014-0196175 A1), AXMI-238 (публикация патента США 2014-0033363 A1), AXMI-270 (публикация патента США 2014-0223598 A1), AXMI-345 (публикация патента США 2014-0373195 A1), AXMI-335 (публикация международной заявки WO2013/134523(A2)), DIG-3 (публикация патента США 2013-0219570 A1), DIG-5 (публикация патента США 2010-0317569 A1), DIG-11 (публикация патента США 2010-0319093 A1), AfIP-1A и его производные (публикация патента США 2014-0033361 A1), AfIP-1B и его производные (публикация патента США 2014-0033361 A1), PIP-1A/PIIP-1B (публикация патента США 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (публикация патента США 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (публикация патента США 2014-0007292 A1), Pput_1063 (публикация патента США 2014-0007292 A1), DIG-657 (публикация международной заявки WO2015/195594 A2), Pput_1064 (публикация патента США 2014-0007292 A1), GS-135 и его производные (публикация патента США 2012-0233726 A1), GS153 и его производные (публикация патента США 2012-0192310 A1), GS154 и его производные (публикация патента США 2012-0192310

A1), GS155 и его производные (публикация патента США 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 и 4 и их производные, как описано в публикации патента США 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в публикации патента США 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 или 4 и их производные, как описано в публикации патента США 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в патенте США № 7772465 (B2), CF161_0085 и его производные, как описано в WO2014/008054 A2, токсиновые белки чешуекрылых и их производные, как описано в публикациях патентов США US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1 и US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в US7510878(B2), SEQ ID NO:2 и ее производные, как описано в патенте США № 7812129(B1), DIG-911 и DIG-180, как описано в публикации патента США № 2015-0264940A1, и т. п.

[97] В других вариантах осуществления такая композиция/состав может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный полипептид, который проявляет ингибирующую активность в отношении насекомых, которые не ингибируются другим белком, ингибирующим активность насекомых, по настоящему изобретению, для расширения спектра полученного ингибирования активности насекомых. Например, для борьбы с полужесткокрылыми вредителями комбинации белков, ингибирующих активность насекомых, по настоящему изобретению могут быть использованы с белками, активными для полужесткокрылых насекомых, такими как TIC1415 (публикация патента США 2013-0097735 A1), TIC807 (патент США № 8609936), TIC834 (публикация патента США 2013-0269060 A1), АХМІ-036 (публикация патента США 2010-0137216 A1) и АХМІ-171 (публикация патента США 2013-0055469 A1). Кроме того, полипептид для борьбы с жесткокрылыми вредителями может быть выбран из группы, состоящей из белка, ингибирующего активность насекомых, такого как, но не ограничиваясь ими, Cгу3Вb (патент США № 6501009), варианты Cгу1С, варианты Cгу3А, Cгу3, Cгу3В, Cгу34/35, 5307, АХМІ134 (публикация патента США 2013-0167264 A1), АХМІ-184 (публикация патента США 2010-0004176 A1), АХМІ-205

(публикация патента США 2014-0298538 A1), АХМІ-207 (публикация патента США 2013-0303440 A1), АХМІ-218, АХМІ-220 (публикация патента США 20140245491A1), АХМІ-221z, АХМІ-223z (публикация патента США 2014-0196175 A1), АХМІ-279 (публикация патента США 2014-0223599 A1), АХМІ-R1 и его варианты (публикация патента США 2010-0197592 A1, ТІС407, ТІС417, ТІС431, ТІС807, ТІС853, ТІС901, ТІС1201, ТІС3131, DIG-10 (публикация патента США 2010-0319092 A1), eНІР (публикация заявки на патент США № 2010/0017914), ІР3 и его варианты (публикация патента США 2012-0210462 A1), варианты РНІ-4 (публикация заявки на патент США 2016-0281105 A1), варианты РІР-72 (WO 2016-144688 A1), варианты РІР-45, варианты РІР-64, варианты РІР-74, варианты РІР-75 и варианты РІР-77 (WO 2016-144686 A1), DIG-305 (WO 2016109214 A1), варианты РІР-47 (публикация патента США 2016-0186204 A1), DIG-17, DIG-90, DIG-79 (WO 2016-057123 A1), DIG-303 (WO 2016-070079 A1) и □-гексатоксин-Нv1a (публикация заявки на патент США US2014-0366227 A1).

[98] Дополнительные полипептиды для борьбы с жесткокрылыми, чешуекрылыми и полужесткокрылыми насекомыми-вредителями можно найти на веб-сайте номенклатуры токсинов *Bacillus thuringiensis*, поддерживаемом Нилом Крикмором (доступен в интернете по ссылке www.btnomenclature.info).

[99] Возможность развития у насекомых устойчивости к определенным инсектицидам документально подтверждена в данной области техники. Одна из стратегий борьбы с устойчивостью насекомых заключается в использовании трансгенных культур, которые экспрессируют два различных вещества, ингибирующих активность насекомых, которые имеют различные способы действия. Следовательно, с любыми насекомыми с устойчивостью к любому из веществ, ингибирующих активность насекомых, можно бороться с помощью другого вещества, ингибирующего активность насекомых. Другая стратегия борьбы с устойчивостью насекомых предполагает использование растений, которые не защищены от целевых видов чешуекрылых, чтобы обеспечить убежище для таких незащищенных растений. Один конкретный пример описан в патенте США № 6551962, который полностью включен посредством ссылки.

[100] Другие варианты осуществления, такие как местно применяемые пестицидные химические вещества, разработанные для борьбы с вредителями, с которыми также борются описанными в данном документе белками, для использования с белками в составах для обработки семян, опрыскивания, капания или протирания, могут быть внесены непосредственно в почву (пропитка почвы), применяемые к растущим

растениям, экспрессирующие описанные в данном документе белки, или составленные для нанесения на семена, содержащие один или несколько трансгенов, кодирующих один или несколько раскрытых белков. Такие составы для использования при обработке семян можно наносить с различными клейкими веществами и веществами для повышения клейкости, известными в данной области техники. Такие составы могут 5 содержать пестициды, которые являются синергетическими по способу действия с раскрытыми белками так, что пестициды в составе действуют посредством другого механизма действия для борьбы с теми же или подобными вредителями, которые могут контролироваться раскрытыми белками, или что такие пестициды действуют для 10 борьбы с вредителями в более широком диапазоне хозяев или видов вредителей растений, с которыми нельзя эффективно бороться с помощью пестицидных белков TIC7941.

[101] Вышеупомянутая композиция/состав может дополнительно содержать приемлемый с точки зрения сельского хозяйства носитель, такой как приманка, порошок, пыль, пеллет, гранула, спрей, эмульсия, коллоидная суспензия, водный 15 раствор, споры *Bacillus*/препарат кристаллов, обработка семян, рекомбинантная растительная клетка/растительная ткань/семя/растение, трансформированные для экспрессии одного или нескольких белков, или бактерия, трансформированная для экспрессии одного или нескольких белков. В зависимости от уровня ингибирования активности насекомых или пестицидного ингибирования, присущего рекомбинантному 20 полипептиду, и уровня состава, применяемого в растительном анализе или анализе рациона, композиция/состав может включать различные по массе количества рекомбинантного полипептида, например, от 0,0001% до 0,001%, до 0,01%, до 1%, до 99% по массе рекомбинантного полипептида.

[102] Настоящее изобретение также рассматривает композиции и способы снижения экспрессии пестицидного белка в тканях органов размножения трансгенного растения посредством использования микроРНК (микроРНК). микроРНК являются важными 25 компонентами механизма сайленсинга генов у растений. У растений выработка микроРНК является тканеспецифическим процессом, тесно связана с транскрипцией и сплайсингом и даже варьируется между предшественниками микроРНК. Кодированные ядерной ДНК в растениях микроРНК функционируют за счет спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекулах мРНК (*Achkar et al. (2016) микроРНК Biogenesis: A Dynamic Pathway, Trends in Plant Science. 21(12): 1034-1044.* микроРНК продуцируются из первичного транскрипта микроРНК (при-микроРНК).

Возникающие ргі-микроРНК кепированы на 5'-конце и полиаденилированы на 3'-конце, а содержащие интрон ргі-микроРНК сплайсируются или альтернативно сплайсируются. ргі-микроРНК обрабатываются комплексом дайсера, который содержит ядерную РНКазу DICER-LIKE 1 (DCL1) и ее вспомогательные белки SERRATE (SE) и HYPONASTIC LEAVES (HYL1) в качестве основных компонентов, с образованием зрелого дуплекса микроРНК/микроРНК* из двадцати одного (21) нуклеотида. Дуплекс микроРНК/микроРНК* стабилизируется посредством 3'-концевого 2'-O-метилирования с помощью HUA ENHANCER 1 (HEN1). HEN1 также вносит вклад в экспорт дуплекса микроРНК/микроРНК* из ядра клетки и в сборку РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). Во время загрузки RICS одна цепь дуплекса малой РНК выбирается в качестве направляющей цепи и включается в ARGONAUTE 1 (AGO1) для образования функционального RISC, тогда как другая цепь (сопровождающая цепь) удаляется и разрушается. На загрузку микроРНК в AGO-белки влияют петли в дуплексах микроРНК/микроРНК*, вызванные несовпадением пар оснований. AGO1 предпочитает дуплексы с центральными несовпадениями (Yu et al. (2017) *The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017*).

[103] микроРНК растений регулируют гены-мишени на посттранскрипционном уровне посредством двух основных механизмов: расщепления транскрипта и репрессии трансляции. У растений репрессия трансляции наблюдается реже, чем расщепление транскрипта. микроРНК-направляемое расщепление РНК происходит в точном положении в целевой мРНК. Расщепление осуществляется доменом PIWI AGO-белков, который образует H-подобную складку РНКазы и проявляет эндонуклеазную активность. Фрагменты расщепления на 5'-конце и 3'-конце впоследствии расщепляются экзонуклеазами. Известные факторы, необходимые для ингибирования трансляции, опосредованной микроРНК, включают фермент, разделяющий микротрубочки KATANIN 1 (KTN1), компонент тела процессинга(Р-тела) VARICOSE (VCS), GW-повторяющийся белок SUO и мембранный белок ER ALTERED MERISTEM PROGRAM 1 (AMP1). Мутации в этих генах селективно препятствуют микроРНК-направляемой репрессии на уровне белка, предполагая, что расщепление транскрипта и репрессия трансляции являются двумя независимыми способами действия. Молекулярный механизм, лежащий в основе микроРНК-опосредованной репрессии трансляции, не достаточно понятен. Анализ *in vitro* предполагает, что микроРНК растений могут ингибировать инициацию трансляции или препятствовать

перемещению рибосом (*Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017*).

[104] Помимо расщепления мРНК и репрессии трансляции, некоторые микроРНК также запускают выработку вторичных коротких интерферирующих РНК (миРНК) из своих транскриптов, и это широко распространенное и консервативное явление у растений (*Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017*). микроРНК, которые обычно запускают выработку этих вторичных миРНК, имеют длину двадцать два (22) нуклеотида, в отличие от микроРНК из двадцати одного (21) нуклеотида, описанных выше. Целевая РНК превращается в двухцепочечную РНК (дцРНК) посредством РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), которая затем расщепляется на миРНК DCL-нуклеазами. Как правило, одна цепь дуплекса предпочтительно связывается с AGO-белком с образованием эффекторного комплекса (РНК-индуцированный комплекс сайленсинга или RISC), который нацелен на транскрипты и подавляет их на основе комплементарности последовательностей. У *Arabidopsis* после AGO1-опосредованного расщепления целевой РНК, направляемой микроРНК, фрагмент расщепления в 5' или 3' положении стабилизируется с помощью супрессора сайленсинга генов 3 (SGS3), который связывается с RISC, распознавая особенности дуплекса микроРНК/мишень из двадцати двух (22) нуклеотидов для защиты расщепления. РНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА 6 (RDR6) привлекается для преобразования расщепленного фрагмента в дцРНК, которая позже расщепляется на миРНК с фрагментом из двадцати одного (21) нуклеотида от момента распада. У растений этот процесс может быть усилен за счет выработки вторичных миРНК после транскрипции РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) на первичной целевой РНК (*Cuperus et al., (2010) Unique Functionality of 22 nt микроРНКs in Triggering RDR6-Dependent miРНК Biogenesis from Target Transcripts in Arabidopsis. Nat Struct Mol Biol, 17(8): 997-1003; Chen et al., (2010) 22-Nucleotide RNAs trigger secondary miРНК biogenesis in Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 15269-15274; Yu et al. (2017) The "how" and "where" of plant microRNAs. New Phytologist, 216: 1002-1017*).

[105] Путем сбора данных о микроРНК в различных тканях сои были идентифицированы две микроРНК, которые были избыточно представлены в тканях органов размножения по сравнению с тканями из растительных волокон; miR395 и miR4392. miR395 процессируется в дуплекс микроРНК/микроРНК* из двадцати одного (21) нуклеотида и экспрессируется в основном в тычинках цветков сои. miR4392

процессируется в дуплекс микроРНК/микроРНК* из двадцати двух (22) нуклеотидов и запускает выработку вторичных миРНК из своих транскриптов, усиливая сигнал подавления. miR4392 высоко обогащена в пыльниках цветков сои. Связанные с белком ARGO с образованием комплекса сайленсинга, микроРНК функционируют как сиквенс-специфичные проводники, направляя комплекс сайленсинга к транскриптам посредством спаривания оснований между микроРНК и комплементарными сайтами, называемыми в данном документе «сайтами связывания мишеней микроРНК», в пределах 3'-нетранслируемой области (3' UTR) целевых РНК. Сайты связывания мишеней микроРНК, соответствующие miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO:18) и Gm.miR395_2 (SEQ ID NO:19)) и miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO:21) и Gm.miR4392_2 (SEQ ID NO:22)), были функционально связаны с использованием ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструирования SUP-miR395 (SEQ ID NO:20) и SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23) соответственно. SUP-miR395 и SUP-miR4392, в свою очередь, функционально связаны с 3'-кодирующей последовательностью TIC7941PL_1 после стоп-кодона, продуцирующего трансгены, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) и TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26) соответственно. Экспрессия TIC7941PL_1-miR395 и TIC7941PL_1-miR4392 не влияла на пестицидную активность TIC7941PL_1. И TIC7941PL_1-miR395, и TIC7941PL_1-miR4392 продемонстрировали аналогичную пестицидную активность против южной совки луговой (*SAW, Spodoptera eridania*), соевой совки (*SBL, Chrysodeixis includens*) и соевого коробочного червя (*SPW, Helicoverpa zea*) по сравнению с TIC7941PL_1 в анализе листового диска. Функциональное связывание сайтов-мишеней miR395 и miR4392 с кодирующей последовательностью TIC7941PL_1 предназначено для снижения экспрессии пестицидного белка TIC7941PL_1 в тканях органов размножения трансгенной сои, экспрессирующей TIC7941PL_1-miR395 или TIC7941PL_1-miR4392.

[106] Принимая во внимание вышеизложенное, специалисты в данной области техники должны понимать, что изменения могут быть внесены в конкретные раскрытые аспекты, и все же получить подобный или аналогичный результат без отклонения от сущности и объема изобретения. Таким образом, конкретные структурные и функциональные подробности, раскрытые в данном документе, не следует интерпретировать как ограничивающие. Следует понимать, что полное раскрытие каждой ссылки, цитируемой в данном документе, включено в раскрытие настоящей заявки.

ПРИМЕРЫ**Пример 1****Открытие, клонирование и экспрессия TIC7941**

5 [107] Последовательность, кодирующую новый пестицидный белок *Paenibacillus lentimorbus*, идентифицировали, клонировали, подтверждали последовательность и тестировали в биоанализе насекомых. Пестицидный белок TIC7941, выделенный из вида *Paenibacillus lentimorbus* DSC020651, представляет собой новый Vip3C-подобный белок. Отдаленно связанные последовательности с TIC7941 представляют собой
10 Vip3Ca1 (идентичность 72,43%, ближайшая известная родственная последовательность), Vip3Aa1 (идентичность 64,45%) и Vip3B-подобный белок (идентичность 59%).

[108] Полноразмерная копия кодирующей области для TIC7941 и версия TIC7941 (TIC7941_His) с His-меткой были синтезированы способами, известными в данной области техники, и содержат кодоны инициации и терминации трансляции каждой
15 кодирующей последовательности. Кодирующую последовательность TIC7941 клонировали с использованием способов, известных в данной области техники, в вектор экспрессии *Bt* в функциональном связывании с промотором, экспрессируемым *Bt*. Вектор экспрессии *Bt* содержал промотор, действующий на стадии споруляции
20 bacillus. Кроме того, кодирующая последовательность TIC7941_His была клонирована в вектор, используемый для экспрессии белка в *Escherichia coli* (*E. coli*). Для выделения экспрессируемых белков *E. coli* гистидиновую метку функционально связывали с экспрессируемыми кодирующими последовательностями для облегчения очистки белка на колонке. Кодирующие последовательности и соответствующие им
25 белковые последовательности, используемые для бактериальной экспрессии, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Кодирующие последовательности токсина и соответствующие последовательности белков, используемые для экспрессии в *Bt* и *E. coli*

Токсин	Кодирующая последовательность ДНК SEQ ID NO:	Белок SEQ ID NO:	Бактерия-хозяин для экспрессии
TIC7941	1	2	<i>Bt</i>
TIC7941_His	5	6	<i>E. coli</i>

Пример 2

5 TIC7941 демонстрирует активность против чешуекрылых в биоанализе насекомых

[109] Пестицидный белок TIC7941 был экспрессирован в *Bt* и *E. coli* и проанализирован на токсичность для различных видов Lepidoptera, Coleoptera, Hemiptera и Diptera. Получения TIC7941 и TIC7941_His из *Bt* и *E. coli* оценивали в отношении видов чешуекрылых, совки-ипсилон (BCW, *Agrotis ipsilon*), совки хлопковой (CEW, также известной как соевый коробочный червь (SPW), *Helicoverpa zea*), мотылька кукурузного (ECB, *Ostrinia nubilalis*), совки травяной (FAW, *Spodoptera frugiperda*), южной совки луговой (SAW, *Spodoptera eridania*), соевой совки (SBL, *Chrysodeixis includens*), огневки кукурузной юго-западной (SWCB, *Diatraea grandiosella*), табачной листовертки (TBW, *Heliothis virescens*) и гусеницы бархатных бобов (VBW, *Anticarsia gemmatilis*); видов жесткокрылых, колорадского жука (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*) и западного кукурузного жука (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); и видов полужесткокрылых, клопа травяного (TPB, *Lygus lineolaris*) и западного клопа травяного (WTP, *Lygus hesperus*); и видов двукрылых, желтолихорадочного комара (YFM, *Aedes aegypti*).

[110] Для продуцирования TIC7941 в *Bt*-хозяевах штамм *Bt*, экспрессирующий TIC7941, выращивали в течение двадцати четырех (24) часов, а затем эту культуру добавляли в рацион насекомых. Смертность и задержку роста оценивали путем сравнения роста и развития насекомых с рационом, включающим культуру из штамма *Bt*, экспрессирующего TIC7941, с насекомыми с рационом, включающим необработанную контрольную культуру.

[111] Штамм *E. coli*, экспрессирующий TIC7941_His, обрабатывали аналогично штамму *Bt* и вводили в рацион насекомых после очистки белка и сравнивали с ростом и развитием насекомых с рационом с необработанной контрольной культурой. TIC7941 продемонстрировал пестицидную активность против видов чешуекрылых насекомых-вредителей: совки-ипсилон, совки хлопковой, мотылька кукурузного, южной совки луговой, соевой совки и огневки кукурузной юго-западной. В частности, активность была высокой против соевой совки.

Пример 3

10 **Анализ активности TIC7941PL_1 против чешуекрылых вредителей в стабильно трансформированных растениях кукурузы**

[112] Бинарный вектор трансформации растений, содержащий трансгенную кассету, предназначенную для экспрессии ненацеленного пестицидного белка TIC7941PL_1, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученный вектор использовали для стабильной трансформации растений кукурузы. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биоанализе насекомых против различных чешуекрылых насекомых-вредителей.

[113] Синтетическая кодирующая последовательность была сконструирована для использования в экспрессии TIC7941 в растениях, клонирована в бинарный вектор трансформации растений и использована для трансформации клеток растений кукурузы. Синтетическая последовательность была синтезирована в соответствии с методами, схематично описанными в патенте США 5500365, чтобы избежать некоторых неподходящих проблемных последовательностей, таких как последовательности полиаденилирования растений, обогащенных АТТТА и А/Т, при сохранении аминокислотной последовательности нативного белка *Paenibacillus*. Синтетическая кодирующая последовательность (SEQ ID NO: 3) кодирует белок TIC7941PL_1 (SEQ ID NO: 4), который содержит дополнительный остаток аланина сразу после иницирующего метионина относительно белка TIC7941. Полученный вектор трансформации растений содержал первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC7941PL_1, которая содержала конститутивный промотор, функционально связанный на 5'-конце с лидером, функционально связанный на 5'-конце с интроном, функционально связанный на 5'-конце с синтетической кодирующей последовательностью, кодирующей ненацеленный белок TIC7941PL_1 (SEQ ID NO:4),

которая, в свою очередь, функционально связана на 5'-конце с 3'-UTR; и вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием отбора глифосатом.

[114] Клетки растений кукурузы трансформировали бинарным вектором трансформации, как описано выше, с использованием метода трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. Трансформированные клетки индуцировали с образованием растений способами, известными в данной области техники. Биологические анализы с использованием листовых дисков растений были проведены аналогично тем, которые описаны в патенте США № 8344207. Одну только что вылупившуюся новорожденную личинку моложе одного дня помещали на каждый образец листового диска и давали питаться в течение приблизительно четырех дней. Нетрансформированное растение кукурузы использовали для получения ткани, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Объекты вставки одной копии R₀ с множественной трансформацией из каждого бинарного вектора оценивали в отношении BCW, CEW, FAW и SWCB.

[115] Двенадцать трансформированных объектов R₀ оценивали с использованием листовых дисков растения. Оценка повреждения листьев (LDR), равная одному, трем или четырем, была присвоена каждому объекту для каждого исследуемого вида насекомых-вредителей. LDR, равная 1 (единице), эквивалентна повреждению, которое меньше или равно тридцати процентам. LDR, равная 3 (трем), эквивалентна повреждению, которое меньше или равно пятидесяти процентам. LDR, равная 4 (четырем), эквивалентна повреждению, которое больше пятидесяти процентов. Баллы LDR для каждого объекта и каждого вида насекомых-вредителей представлены в таблице 3.

25 **Таблица 3. Оценки повреждения листьев (LDR) для трансформированных объектов R₀ кукурузы, экспрессирующих TIC7941PL_1.**

Объект	Оценки повреждения листьев R ₀			
	BCW	CEW	FAW	SWCB
Объект 1	1	1	4	3
Объект 2	1	1	4	1
Объект 3	4	4	4	4
Объект 4	4	4	4	4
Объект 5	1	1	4	3

Оценки повреждения листьев R₀				
Объект	BCW	CEW	FAW	SWCB
Объект 6	1	1	4	1
Объект 7	4	4	4	4
Объект 8	4	4	4	4
Объект 9	1	1	4	4
Объект 10	4	4	4	4
Объект 11	1	1	4	3
Объект 12	1	1	4	1

[116] Как видно из таблицы 3, семь из двенадцати проанализированных трансформированных объектов R₀ продемонстрировали устойчивость к BCW и CEW. Три из семи объектов также продемонстрировали устойчивость к SWCB.

- 5 [117] Объекты с первого по шестой были выбраны для анализа в поколении F₁. В таблице 4 показаны оценки LDR для каждого из шести объектов, проанализированных против четырех видов насекомых-вредителей.

10 **Таблица 4. Оценки повреждения листьев (LDR) для трансформированных объектов F₁ кукурузы, экспрессирующих TIC7941PL_1.**

Оценки повреждения листьев F₁				
Объект	BCW	CEW	FAW	SWCB
Объект 1	1	1	4	1
Объект 2	1	3	4	1
Объект 3	1	1	4	3
Объект 4	1	1	4	3
Объект 5	1	1	4	3
Объект 6	1	1	4	3

[118] Как видно из таблицы 4, все шесть объектов продемонстрировали устойчивость к BCW, пять из шести объектов продемонстрировали устойчивость к CEW, а два из шести объектов продемонстрировали устойчивость к SWCB. Растения кукурузы,

стабильно трансформированные трансгенной кассетой для экспрессии TIC7941, демонстрируют устойчивость к видам чешуекрылых вредителей, таким как BCW, CEW и SWCB.

5

Пример 4

Анализ активности TIC7941PL_1 против чешуекрылых вредителей в стабильно трансформированных растениях сои

10 [119] Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, предназначенные для экспрессии нецелевого пестицидного белка TIC7941PL_1, клонировали с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы использовали для стабильной трансформации растений сои. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биоанализе насекомых против различных чешуекрылых насекомых-вредителей.

15 [120] Синтетическая кодирующая последовательность TIC7941PL_1, предназначенная для экспрессии растений, как описано в примере 3, была клонирована в бинарные векторы трансформации растений и использована для трансформации клеток растений сои. Бинарные векторы, содержащие нецелевую кодирующую последовательность TIC7941PL_1, были сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные в результате векторы трансформации растений
20 содержали первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC7941PL_1, которая содержала экспрессируемый растением промотор, функционально связанный на 5'-конце с лидером, функционально связанный на 5'-конце с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует
25 ненацеленный белок TIC7941PL_1 (SEQ ID NO: 4), который, в свою очередь, функционально связан на 5'-конце с 3'-UTR, и вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием селекции спектиномицином. Четыре (4) бинарных вектора трансформации были сконструированы, как описано выше. Каждая конструкция содержала кассету
30 экспрессии TIC7941PL_1, содержащую разные промоторы и 3'-UTR.

[121] Трансформированные клетки сои индуцировали с образованием растений способами, известными в данной области техники. Биоанализы с использованием листовых дисков растений были выполнены аналогично описанным в патенте

США № 8344207. Нетрансформированное растение сои использовали для получения ткани, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Объекты с множественной трансформацией из каждого бинарного вектора оценивали в отношении SAW, SBL, SPW и VBW.

5 [122] Объекты R₀, полученные в результате трансформаций с использованием четырех различных бинарных конструкций, оценивали с использованием листовых дисков растения. Оценка повреждения листьев (LDR) от одного до четырех была присвоена каждому объекту для каждого анализируемого вида насекомых-вредителей. LDR, равная 1 (единице), эквивалентна повреждению, которое меньше или равно двадцати

10 процентам. LDR, равная двум (2), эквивалентна двадцати процентам и меньше или равна тридцати пяти процентам повреждения. LDR, равная 3 (трем), эквивалентна тридцати пяти процентам повреждения, которое меньше или равно семидесяти процентам. LDR, равная четырем (4), эквивалентна повреждению более семидесяти процентов. Оценки LDR для каждой конструкции и каждого вида насекомых-

15 вредителей представлены в таблице 5. Также представлено количество объектов, демонстрирующих оценку LDR (наблюдаемую) по отношению к количеству проанализированных объектов. Высокий уровень проявления гена признака устойчивости определяется как оценка LDR, равная единице (1), где более пятидесяти процентов (50%) объектов демонстрируют LDR, равную единице (1).

20

Таблица 5. Оценки повреждения листьев (LDR) и проявление гена для трансформированных объектов R₀ сои, экспрессирующих TIC7941PL_1.

Конструкция	LDR (наблюдаемая/анализируемая)			
	SAW	SBL	SPW	VBC
Конструкция 1	1 (12/14)	1 (13/14)	1 (12/14)	2 (1/13)
Конструкция 2	1 (14/14)	1 (14/14)	1 (13/14)	3 (9/14)
Конструкция 3	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Конструкция 4	1 (12/15)	1 (15/15)	1 (12/15)	3 (10/15)

[123] Как видно из таблицы 5, объекты сои R₀, экспрессирующие TIC7941PL_1,

25 трансформированные каждой из четырех (4) конструкций, продемонстрировали высокую устойчивость с высоким проявлением гена к SAW, SBL и SPW. Стабильно

трансформированные растения сои, экспрессирующие TIC7941PL_1, демонстрируют устойчивость к видам чешуекрылых вредителей и высокоэффективны против SAW, SBL и SPW.

5

Пример 5

Анализ активности TIC7941PL_1 против чешуекрылых вредителей в стабильно трансформированных растениях хлопчатника

10 [124] Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, предназначенные для экспрессии как нацеленного на пластиды, так и нецелевого пестицидного белка TIC7941PL_1, клонируют с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы используют для стабильной трансформации растений хлопчатника. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биоанализе насекомых против различных чешуекрылых насекомых-
15 вредителей.

[125] Синтетическая кодирующая последовательность, предназначенная для экспрессии растений, как описано в примере 3, клонирована в бинарные векторы трансформации растений и использована для трансформации клеток растений хлопчатника. Бинарные векторы, содержащие нацеленную на пластид и ненацеленную
20 кодирующие последовательности TIC7941PL_1, были сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные в результате векторы трансформации растений содержат первую трансгенную кассету для экспрессии пестицидного белка TIC7941PL_1, которая содержит конститутивный промотор, функционально связанный на 5'-конце с лидером, функционально связанный
25 на 5'-конце с синтетической кодирующей последовательностью, которая кодирует нацеленный на пластид или ненацеленный белок TIC7941PL_1, который, в свою очередь, функционально связан на 5'-конце с 3'-UTR, и вторую трансгенную кассету для отбора трансформированных растительных клеток с использованием селекции спектиномицина.

30 [126] Трансформированные клетки хлопчатника индуцировали с образованием растений способами, известными в данной области техники. Биоанализы с использованием листовых дисков растений были выполнены аналогично описанным в патенте США № 8344207. Нетрансформированное растение хлопчатника используют

для получения ткани, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Объекты с множественной трансформацией из каждого бинарного вектора оцениваются в отношении CBW, FAW, SBL и TBW, а также любых других видов чешуекрылых насекомых-вредителей, которые, как известно, причиняют агрономический ущерб урожаю хлопка.

[127] Помимо листовых дисков, другие ткани также могут быть использованы для оценки устойчивости, обусловленной экспрессией токсинового белка TIC7941PL_1 в трансгенных растениях хлопчатника, таких как клетки и семенные коробочки. Оценки повреждения применяются к каждому образцу, соответствующему каждому насекомому-вредителю, и сравниваются с отрицательными контролями, чтобы определить, обеспечивает ли экспрессия TIC7941PL_1 устойчивость к конкретным видам насекомых-вредителей.

Пример 6

15 Улучшение пестицидной активности TIC7941 против совки травяной

[128] Этот пример иллюстрирует улучшение пестицидной активности TIC7941 против совки травяной за счет вставки пептида, связывающего трансмембранный переносчик ABC (ABCc4) FAW в последовательность белка TIC7941.

20 [129] Фрагмент пептида FAWPEPBIN (представленный как SEQ ID NO:17) связывается с трансмембранным переносчиком ABC FAW ABCc4. FAWPEPBIN_Vac (SEQ ID NO:15) представляет собой синтетическую кодирующую последовательность, которая кодирует FAWPEPBIN (SEQ ID NO:17) для экспрессии пептида FAWPEPBIN в бактериях.

25 [130] Сконструированные His-меченые белки TIC7941 с пептидом FAWPEPBIN, вставленным в разные положения в петле домена 2 белка, сравнивали в биоанализе насекомых. Кодирующая последовательность TIC7941_2His (SEQ ID NO:7) кодирует пестицидный белок TIC7941_2His (SEQ ID NO:8). Кодирующая последовательность TIC7941_3His (SEQ ID NO:9) кодирует пестицидный белок TIC7941_3His (SEQ ID NO:10). Синтетическая кодирующая последовательность FAWPEPBIN_Vac находится в положениях нуклеотидов 2413-2448 TIC7941_2His и в положениях 2410-2445 TIC7941_3His. Пептидная последовательность FAWPEPBIN расположена в положениях аминокислот с 805 по 816 TIC7941_2His и в положениях аминокислот с 804 по 815 TIC7941_3His.

[131] Пестицидную активность пестицидных белков TIC7941_His, TIC7941_2His и TIC7941_3His анализировали в отношении FAW. И TIC7941_His, и TIC7941_2His продемонстрировали незначительную активность в отношении FAW или ее отсутствие. Однако TIC7941_3His продемонстрировал улучшенную пестицидную активность в отношении FAW. Таким образом, вставка синтетической кодирующей последовательности FAWPEPBIN_Vac в аминокислотные положения 804-815 TIC7941_3His улучшала пестицидную активность белка TIC7941 в отношении FAW.

Пример 7

10 Анализ активности TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 против совки травяной в стабильно трансформированных растениях кукурузы

[132] Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, предназначенные для экспрессии пестицидных белков TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3, клонируют с использованием способов, известных в данной области техники. Полученные векторы используют для стабильной трансформации растений кукурузы. Ткани собирали из трансформантов и использовали в биоанализе насекомых против FAW и других чешуекрылых насекомых-вредителей.

[133] Бинарные векторы трансформации растений конструируют, как описано ранее в примере 3. Бинарные векторы содержат трансгенную кассету, используемую для экспрессии TIC7941PL_2 или TIC7941PL_3. TIC7941PL_2 и TIC7941PL_3 содержат пептид, связывающий рецептор ABCc4, FAWPEPBIN. Синтетическая последовательность ДНК (FAWPEPBIN_PL, SEQ ID NO:16), используемая для экспрессии в растительной клетке и кодирующая совку травяную, трансмембранный переносчик ABC ABCc4, связывающий пептид FAWPEPBIN, вставляется в токсинный белок TIC7941PL_1. Фрагмент ДНК, кодирующий FAWPEPBIN_PL, находится в положениях нуклеотидов 2386-2421 TIC7941PL_2 и в пределах 2383-2418 TIC7941PL_3. Фрагмент пептида FAWPEPBIN расположен в аминокислотных положениях 796-807 TIC7941PL_2 и 795-806 TIC7941PL_3.

[134] Клетки растений кукурузы трансформируют бинарными векторами трансформации, как описано выше, с использованием метода трансформации, опосредованной *Agrobacterium*. Трансформированные клетки индуцировали с образованием растений способами, известными в данной области техники. Биоанализы

с использованием листовых дисков растений были выполнены аналогично описанным в патенте США № 8344207. Нетрансформированное растение кукурузы использовали для получения ткани, которая будет использоваться в качестве отрицательного контроля. Объекты вставки одной копии R₀ с множественной трансформацией из каждого бинарного вектора оценивают в отношении FAW и сравнивают с TIC7941PL_1, чтобы определить, увеличивает ли вставка пептида FAWPEPBIN инсектицидную активность TIC7941PL_1 в отношении FAW.

Пример 8

10 **Снижение экспрессии TIC7941PL_1 в ткани органов размножения стабильно трансформированных растений сои за счет использования сайтов-мишеней микроРНК**

[135] Этот пример иллюстрирует снижение экспрессии TIC7941PL_1 в тканях органов размножения стабильно трансформированных растений сои за счет использования функционально связанных сайтов распознавания микроРНК.

[136] микроРНК растений регулируют гены-мишени на посттранскрипционном уровне посредством двух основных механизмов: расщепления транскрипта и репрессии трансляции. Кроме того, некоторые микроРНК также запускают выработку вторичных малых интерферирующих РНК (миРНК) из своих транскриптов, усиливая влияние микроРНК на экспрессию. микроРНК обычно имеют длину двадцать один (21) нуклеотид, но те, которые запускают выработку вторичных миРНК, имеют длину двадцать два (22) нуклеотида. Путем сбора данных о микроРНК в различных тканях сои были идентифицированы две микроРНК, которые были избыточно представлены в тканях органов размножения по сравнению с тканями из растительных волокон; miR395 и miR4392. miR395 процессируется в дуплекс микроРНК/микроРНК* из двадцати одного (21) нуклеотида и экспрессируется в основном в тычинках цветков сои. miR4392 процессируется в дуплекс микроРНК/микроРНК* из двадцати двух (22) нуклеотидов и запускает выработку вторичных миРНК из своих транскриптов, усиливая сигнал подавления. miR4392 высоко обогащена в пыльниках цветков сои. Связанные с белком ARGONAUTE с образованием комплекса сайленсинга, микроРНК функционируют как сиквенс-специфичные проводники, направляя комплекс сайленсинга к транскриптам посредством спаривания оснований между микроРНК и

сайтами связывания мишеней микроРНК в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) целевых РНК.

[137] Сайты-мишени, соответствующие miR395 (Gm.miR395_1 (SEQ ID NO: 18) и Gm.miR395_2 (SEQ ID NO: 19)), были функционально связаны с использованием ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструирования SUP-miR395 (SEQ ID NO:20). Сайты-мишени, соответствующие miR4392 (Gm.miR4392_1 (SEQ ID NO: 21) и Gm.miR4392_2 (SEQ ID NO: 22)), были функционально связаны с использованием ДНК-спейсера (SP-ART.8a-1, SEQ ID NO:24) для конструирования SUP-miR4392 (SEQ ID NO:23). SUP-miR395 и SUP-miR4392 были функционально связаны с 3'-кодирующей последовательностью TIC7941PL_1 после стоп-кодона, продуцирующего трансгена, TIC7941PL_1-miR395 (SEQ ID NO:25) и TIC7941PL_1-miR4392 (SEQ ID NO:26) соответственно.

[138] Бинарные векторы трансформации растений, содержащие трансгенные кассеты, разработанные для экспрессии нецелевых TIC7941PL_1-miR395 и TIC7941PL_1-miR4392, были сконструированы с использованием способов, известных в данной области техники, и были аналогичны тем, которые описаны в примере 4. Две конструкции были сконструированы с использованием одного и того же промотора, лидера и 3'-UTR элементов в качестве конструкции 3 в примере 4 и содержали последовательности ДНК TIC7941PL_1-miR395 и TIC7941PL_1-miR4392. Множество событий трансформации из каждого бинарного вектора оценивали с использованием листовых дисков против SAW, SBL, SPW и VBW, как описано в примере 4. Конструкция 3, TIC7941PL_1, служила контролем для сравнения инсектицидной активности конструкций, содержащих нецелевые TIC7941PL_1-miR395 и TIC7941PL_1-miR4392.

Таблица 6. Оценки повреждения листьев (LDR) и проявление гена для трансформированных объектов R₀ сои, экспрессирующих TIC7941PL_1.

Конструкция	Композиция TIC7941	LDR (наблюдаемая/анализируемая)			
		SAW	SBL	SPW	VBC
Конструкция 3	TIC7941PL_1	1 (12/12)	1 (12/12)	1 (12/12)	3 (5/12)
Конструкция 5	TIC7941PL_1-mi395	1 (20/20)	1 (20/20)	1 (20/20)	3 (9/20)
Конструкция 6	TIC7941PL_1-mi4392	1 (17/19)	1 (17/19)	1 (16/19)	3 (3/19)

[139] Как видно из таблицы 6, функциональное связывание сайтов связывания мишеней микроРНК с кодирующей последовательностью TIC7941PL_1 не влияет на инсектицидную активность TIC7941PL_1. Две конструкции сайта связывания мишени микроРНК продемонстрировали одинаковый уровень инсектицидной активности в отношении SAW, SBL, SPW и VBC. Как ранее наблюдалось в примере 4, TIC7941PL_1 продемонстрировал высокую устойчивость с высокой проникающей способностью в отношении SAW, SBL и SPW.

[140] Все композиции, раскрытые и заявленные в данном документе, могут быть изготовлены и выполнены без излишних экспериментов в свете настоящего изобретения. Хотя композиции по настоящему изобретению были описаны в отношении вышеупомянутых иллюстративных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что к описанной в данном документе композиции могут применяться вариации, изменения, модификации и исправления без отступления от истинной идеи, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что определенные вещества, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены веществами, описанными в данном документе, при этом могут быть достигнуты такие же или аналогичные результаты. Считается, что все такие аналогичные замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и идеи изобретения, определенных прилагаемой формулой изобретения.

[141] Все публикации и опубликованные патентные документы, цитируемые в описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая гетерологичный промотор, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его пестицидный фрагмент, причем:
- 5
- a. указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или
 - b. указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или
 - 10
 - c. указанный участок полинуклеотида гибридизуется в строгих условиях гибридизации с полинуклеотидом, имеющим нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13.
 - 15
2. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что:
- a. указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая функционирует для экспрессии пестицидного белка в растении; или
 - 25
 - b. указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты экспрессируется в растительной клетке с получением пестицидно эффективного количества пестицидного белка или пестицидного фрагмента; или
 - c. указанная молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с вектором, и указанный вектор выбран из группы, состоящей из плазмиды, фагмиды, бакмиды, космиды и бактериальной или дрожжевой искусственной хромосомы.
 - 30

3. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, определенная как присутствующая в клетке-хозяине, причем указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из бактериальной клетки и растительной клетки.
- 5 4. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 3, причем указанная бактериальная клетка-хозяин принадлежит к роду бактерий, выбранных из группы, состоящей из: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* и *Erwinia*.
- 10 5. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 4, причем указанный вид *Bacillus* представляет собой *Bacillus cereus* или *Bacillus thuringiensis*, указанный вид *Brevibacillus* представляет собой *Brevibacillus laterosperous* и указанный вид *Escherichia* представляет собой *Escherichia coli*.
- 15 6. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 2, причем указанная растительная клетка представляет собой двудольную или однодольную растительную клетку.
- 20 7. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 6, причем указанная растительная клетка выбрана из группы, состоящей из клеток люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты кочанной, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокоса, кофе, кукурузы, клевера, хлопка, тыквы, огурца, лжетцуги, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порая, салата, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливки, лука, декоративных растений, пальмы, пастбищной
- 25 травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневища, ржи, сафлора, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, тыквы крупноплодной, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая,
- 30 табака, помидора, тритикале, дернообразующей травы, арбуза и пшеницы.
8. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, причем указанный белок проявляет активность в отношении чешуекрылых насекомых.

9. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 8, причем указанное чешуекрылое насекомое выбрано из группы, состоящей из: гусеницы бархатных бобов, точильщика сахарного тростника, малого кукурузного точильщика, совки хлопковой, табачной листовертки, соевой совки, черной совки луговой, южной совки луговой, совки травяной, совки малой, совки хлопковой, восточной гусеницы, розового коробочного червя, совки-ипсилон, огневки кукурузной юго-западной, совки хлопковой американской, моли капустной, совки пятнистой, азиатской хлопковой совки, западной бобовой совки и мотылька кукурузного.
10. Растение или его часть, содержащие молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1.
11. Растение или его часть по п. 10, причем указанное растение представляет собой однодольное растение или двудольное растение.
12. Растение по п. 10, причем указанное растение выбрано из группы, состоящей из люцерны, банана, ячменя, фасоли, брокколи, капусты кочанной, капусты, моркови, маниока, клещевины, цветной капусты, сельдерея, нута, китайской капусты, цитрусовых, кокоса, кофе, кукурузы, клевера, хлопка, тыквы, огурца, лжетцуги, баклажана, эвкалипта, льна, чеснока, винограда, хмеля, лука-порея, салата, сосны ладанной, проса, дыни, ореха, овса, оливки, лука, декоративных растений, пальмы, пастбищной травы, гороха, арахиса, перца, голубинового гороха, сосны, картофеля, тополя, тыквы, сосны лучистой, редиса, рапса, риса, корневища, ржи, сафлора, кустарника, сорго, южной сосны, сои, шпината, тыквы крупноплодной, клубники, сахарной свеклы, сахарного тростника, подсолнечника, сладкой кукурузы, амбрового дерева, сладкого картофеля, проса прутьевидного, чая, табака, помидора, тритикале, дернообразующей травы, арбуза и пшеницы.

13. Семя растения по п. 10, причем указанное семя содержит указанную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты.
- 5 14. Композиция, ингибирующая активность насекомых, содержащая молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1.
- 10 15. Композиция, ингибирующая активность насекомых, по п. 14, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере одно другое пестицидное вещество, которое отличается от указанного пестицидного белка.
- 15 16. Композиция, ингибирующая активность насекомых, по п. 15, причем указанное по меньшей мере одно другое пестицидное вещество выбрано из группы, состоящей из белка, ингибирующего активность насекомых, молекулы дцРНК, ингибирующей активность насекомых, и вспомогательного белка.
- 20 17. Композиция, ингибирующая активность насекомых, по п. 15, причем указанное по меньшей мере одно другое пестицидное вещество проявляет активность против одного или нескольких видов вредителей из отрядов Lepidoptera, Coleoptera или Hemiptera.
- 25 18. Композиция, ингибирующая активность насекомых, по п. 15, причем указанный по меньшей мере один другой пестицидный белок выбран из группы, состоящей из Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, вариантов Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, химер Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, вариантов Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC3131, TIC2160, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, 30 AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, AXMI-036, AXMI-045, Axmi52, Axmi58, Axmi88, Axmi97, Axmi102, Axmi112, Axmi117, Axmi100, AXMI-115,

AXMI-113 и AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, Axmi171, AXMI-184, axmi196, axmi204, axmi207, axmi209, Axmi205, AXMI218, AXMI220, AXMI221z, AXMI222z, AXMI223z, AXMI224z и AXMI225z, AXMI238, AXMI270, AXMI279, AXMI335, AXMI345, AXMI-R1 и его вариантов, IP3 и его вариантов, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-11, белка DIG-657, вариантов PHI-4, вариантов PIP-72, вариантов PIP-45, вариантов PIP-64, вариантов PIP-74, вариантов PIP-77, DIG-305, вариантов PIP-47, DIG-17, DIG-90, DIG-79 и DIG-303.

- 5
19. Композиция, ингибирующая активность насекомых, по п. 14, определяемая как содержащая растительную клетку, которая экспрессирует указанную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1.
- 10
20. Товарный продукт, полученный из растения или его части, по п. 10, причем указанный товарный продукт содержит определяемое количество указанной молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты или пестицидного белка.
- 15
21. Товарный продукт по п. 20, выбранный из группы, состоящей из товарной кукурузы, упакованной в мешки зернопереработчиком, кукурузных хлопьев, кукурузных блинчиков, кукурузной муки, кукурузной муки непросеянной, кукурузного сиропа, кукурузного масла, кукурузного силоса, кукурузного крахмала, кукурузной крупы и т.п., а также соответствующие товарные продукты, полученные из соевых бобов, риса, пшеницы, сорго, голубинового гороха, арахиса, фруктов, дыни и овощей, включая, где это применимо, соки, концентраты, джемы, желе, мармелады и другие пищевые формы таких товарных продуктов, содержащие определяемое количество таких полинуклеотидов и/или полипептидов по настоящей заявке, целых или переработанных семян хлопка, хлопкового масла, пуха, семян и частей растений, переработанных для корма или пищи, волокон, бумаги, биомассы и топливных продуктов, таких как топливо, полученное из хлопкового масла, или гранулы, полученные из отходов хлопкоочистки, целых или переработанных семян сои, соевого масла, соевого белка, соевого шрота, соевой муки, соевых хлопьев, соевых отрубей, соевого молока, соевого сыра, соевого вина, корма для
- 20
- 25
- 30

животных, содержащего сою, бумаги, содержащей сою, сливок, содержащих сою, биомассы сои и топливных продуктов, полученных с использованием растений сои и частей растений сои.

- 5 22. Способ получения семени, включающий:
- a. посадку первого семени по п. 13;
 - b. выращивание растения или растений из указанного семени; и
 - c. сбор семян указанного растения или растений, причем указанные собранные семена содержат указанную молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты.
- 10
23. Растение, устойчивое к заражению насекомыми, причем клетки указанного растения содержат молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1.
- 15 24. Способ борьбы с вредителями видов чешуекрылых или заражением вредителями, при этом указанный способ включает:
- a. приведение в контакт вредителя с пестицидно эффективным количеством пестицидного белка, указанного в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14;
- 20 или
- b. приведение в контакт вредителя с пестицидно эффективным количеством одного или нескольких пестицидных белков, содержащих аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно
- 25 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14.
- 30 25. Способ обнаружения присутствия молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1 в образце, содержащем геномную ДНК растения, включающий:
- a. приведение в контакт указанного образца с зондом нуклеиновой кислоты, который гибридизуется в строгих условиях гибридизации с геномной

ДНК растения, содержащего молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, и не гибридизуется в таких условиях гибридизации с геномной ДНК другого изогенного растения, которое не содержит молекулу рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 1, причем
5 указанный зонд гомологичен или комплементарен SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:11 или SEQ ID NO:13, или последовательности, которая кодирует пестицидный белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной
10 последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14;

- b. подвергание указанного образца и указанного зонда жестким условиям гибридизации; и
- c. обнаружение гибридизации указанного зонда нуклеиновой кислоты с
15 указанной геномной ДНК растения указанного образца.

26. Способ обнаружения присутствия пестицидного белка или его фрагмента в образце, содержащем белок, причем указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6;
20 SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12 или SEQ ID NO:14; или указанный пестицидный белок содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, или 85%, или 90%, или 95%, или 98%, или 99%, или приблизительно 100% идентичность аминокислотной последовательности с SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID
25 NO:12 или SEQ ID NO:14, включающий:

- a. приведение в контакт указанного образца с иммунореактивным антителом; и
- b. обнаружение присутствия указанного пестицидного белка или его
фрагмента.

30

27. Способ по п. 26, где стадия обнаружения включает ИФА или вестерн-блоттинг.

28. Способ повышения пестицидной активности нативного пестицидного белка в отношении видов насекомых-вредителей, включающий: конструирование варианта пестицидного белка путем вставки фрагмента ДНК, кодирующего пептид, связывающий рецептор в средней кишке насекомого, в кодирующую последовательность, которая кодирует пестицидный белок; при этом пестицидная активность сконструированного пестицидного белка выше, чем пестицидная активность нативного пестицидного белка по отношению к указанным видам насекомых-вредителей.
29. Способ по п. 28, причем рецептор в кишечнике насекомых выбран из группы, состоящей из кадгерин-подобного белка (CADR), GPI-заякоренной аминопептидазы-N (APN), GPI-заякоренной щелочной фосфатазы, трансмембранного переносчика ABC и ADAM-металлопротеиназы.
30. Способ по п. 28, причем фрагмент ДНК, кодирующий пептид, связывающий рецептор в кишечнике насекомых, выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO:15 и SEQ ID NO:16.
31. Способ по п. 28, причем пептид, связывающий рецептор в кишечнике, представляет собой SEQ ID NO:17.
32. Молекула рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащая гетерологичный промотор, функционально связанный с участком полинуклеотида, кодирующим пестицидный белок или его пестицидный фрагмент, функционально связанный с последовательностью ДНК, содержащей элемент сайта связывания мишени микроРНК, специфичной для ткани органов размножения, причем указанный элемент сайта связывания мишени микроРНК является гетерологичным по отношению к указанному участку полинуклеотида, кодирующему пестицидный белок или его пестицидный фрагмент.

33. Элемент сайта связывания мишени микроРНК по п. 32, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 и SEQ ID NO:23.
- 5 34. Молекула рекомбинантной ДНК, выбранная из группы, состоящей из SEQ ID NO:25 и SEQ ID NO:26.
- 10 35. Способ снижения экспрессии пестицидного белка в ткани органов размножения трансгенного растения, включающий экспрессию в указанном трансгенном растении молекулы рекомбинантной нуклеиновой кислоты по п. 32.