

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393065 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.12.26

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.05.03

(54) МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПРИДАНИЯ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЯМ

(31) 63/183,672

(72) Изобретатель:

(32) 2021.05.04

Чжоу Айлин, Азхаканандам

(33) US

Касималай, Конвил Джаред, Чжан

(86) PCT/US2022/027372

Янь, Чхэ Хёнсук С., Чэнь Чжуньин

(87) WO 2022/235606 2022.11.10

(US)

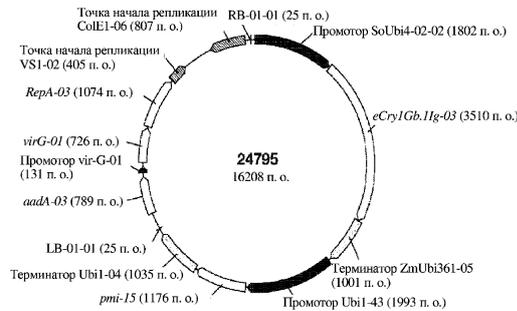
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

СИНГЕНТА КРОП ПРОТЕКШН АГ  
(CH)

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

(57) Настоящее изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает экспрессию инсектицидных белков при введении в клетку, а также к композициям на ее основе и связанным способам их применения. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено растение, содержащее последовательность нуклеиновой кислоты.



A1

202393065

202393065

A1

## МОЛЕКУЛЫ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ПРИДАНИЯ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СВОЙСТВ РАСТЕНИЯМ

5

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/183672, поданной 4 мая 2021 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

10

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают экспрессию инсектицидных белков при введении в клетку или растение, а также к композициям на их основе и связанным с ними способам.

15

### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка сопровождается перечнем последовательностей в текстовом формате с кодировкой ASCII под названием "82347-PCT\_ST25.txt", созданным 14 апреля 2022 г., размером примерно 395 килобайт. Этот перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Этот перечень последовательностей подается вместе с данной заявкой через EFS-Web и отвечает §1.824(a) (2) – (6) и (b) раздела 37 C.F.R.

20

### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вредители растений являются главным фактором потери урожая важных мировых сельскохозяйственных культур, в том числе маиса. Вредителей растений контролируют в основном путем интенсивного применения химических пестицидов. Таким путем может достигаться надлежащий контроль над вредителем, однако иногда эти химические вещества также могут поражать полезные организмы. Другой проблемой, возникающей в результате широкого применения химических пестицидов, является возникновение устойчивых рас насекомых. Это частично ослаблялось с помощью различных практик управления устойчивостью, но существует возрастающая потребность в альтернативных стратегиях контроля вредителей. Одна из таких альтернатив включает экспрессию чужеродных генов, кодирующих инсектицидные белки, в трансгенных растениях. Этот подход обеспечил эффективные средства защиты от выбранных насекомых-вредителей, а трансгенные растения, экспрессирующие

25

30

инсектицидные токсины, были введены в коммерческое обращение, что позволило фермерам сократить применение химических инсектицидов.

Сгу-белки *Bacillus thuringiensis* (Bt) (также называемые дельта-эндотоксины) представляют собой белки, образующие кристаллический матрикс в *Bacillus*, которые, как известно, обладают инсектицидной активностью при поглощении определенными насекомыми. Были выделены гены, кодирующие Сгу-белки, и их экспрессия в сельскохозяйственных культурах, как было показано, обеспечивает другой инструмент для контроля важных с экономической точки зрения насекомых-вредителей.

Хотя применение трансгенных растений, экспрессирующих Сгу-белки, является другим инструментом в комплексе мер по контролю насекомых, оно все еще подвержено нарушению устойчивости. Известны насекомые-вредители, которые в настоящее время характеризуются устойчивостью к Сгу-белкам, экспрессируемым в определенных трансгенных растениях. Например, у кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*) в определенных странах зарегистрирована развившаяся в полевых условиях устойчивость к Сгу1F, Сгу1А.105 и Сгу2Ab2. Как следствие, существует потребность в дополнительных инсектицидных белках для решения связанных с устойчивостью проблем.

Создание новых кассет экспрессии инсектицидного белка для применения в трансгенных растениях является сложной задачей, поскольку кассета экспрессии должна обеспечивать экспрессию достаточного количества белка(-ов) в пределах трансгенного растения для придания требуемой активности (например, инсектицидной активности), не оказывая отрицательных эффектов на растение само по себе (например, снижение урожайности, стерильность, задержка роста и т. д.).

В данном документе предусмотрены последовательности нуклеиновой кислоты и композиции на их основе, а также способы применения для решения вышеупомянутых потребностей.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает экспрессию одного или нескольких инсектицидных белков. Как описано в данном документе, была создана кассета экспрессии (SEQ ID NO: 1), которая кодирует белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4). Эта кассета экспрессии при введении путем трансформации в растения придает инсектицидную активность в отношении видов *Lepidoptera*, например, *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки).

Соответственно, в некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 (например, по меньшей мере 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 91% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 92% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 93% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 94% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 96% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 97% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 98% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере 99,5% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1) или комплементарной ей последовательности.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует тот же белок(белки), который(-е) кодируется(-ются) последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок(белки), который(-ые) обладает/обладают инсектицидным действием в отношении одного или нескольких вредителей, относящихся к чешуекрылым, например, инсектицидным по меньшей мере в отношении *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует белок(белки), который(-ые) является/являются инсектицидным в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты является выделенной.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 (например, по меньшей мере 95% идентична последовательности под

SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 96% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 97% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 98% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере 99,5% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1) или комплементарной ей последовательности, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 4, или кодирует полипептиды, содержащие последовательности под SEQ ID NO: 4 и 6. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под SEQ ID NO: 3, или последовательность под SEQ ID NO: 3 и 5, или вариант любого из вышеуказанного, содержащий одну или несколько “молчащих” мутаций. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31, или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3, или вариант любого из вышеуказанного, содержащий одну или несколько “молчащих” мутаций или других мутаций, которые по сути не влияют на функцию последовательности под SEQ ID NO: 1.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен вектор на основе рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащий последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой бинарный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду. В некоторых вариантах осуществления вектор присутствует в клетке-хозяине.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена трансгенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащая последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой растительную клетку, дрожжевую клетку, бактериальную клетку или клетку насекомого. В некоторых вариантах осуществления

клетка представляет собой бактериальную клетку или растительную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой бактериальную клетку, и бактериальная клетка представляет собой клетку *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium ssp.* или *Pseudomonas ssp.* В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой растительную клетку, и растительная клетка представляет собой клетку маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя или масличного рапса. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка представляет собой клетку маиса. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка присутствует в растении. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка является выделенной. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка способна регенерировать в растении. В некоторых вариантах осуществления растительная клетка не способна регенерировать в целое растение.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено трансгенное растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащему последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3). В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой однодольное растение. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой двудольное растение. В некоторых вариантах осуществления растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя и масличного рапса. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение маиса. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой целое растение. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой трансгенное целое растение маиса, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления растение является инсектицидным в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых

вариантах осуществления растение является инсектицидным в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления растение характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами, например в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), по сравнению с контрольным растением, например, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен потомок любого поколения растения, где потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена часть для вегетативного размножения из растения, где часть для вегетативного размножения содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена часть растения из растения, где часть растения содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления часть растения представляет собой зародыш, пыльцу, семязачаток, семя, лист, цветок, ветку, плод, зерно, початок, стержень початка, листовую обертку, стебель, корень, корневой кончик, пыльник, клубень или корневище. В некоторых вариантах осуществления часть растения представляет собой семя.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий введение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащей последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), в растение с получением тем самым трансгенного растения, где молекула нуклеиновой кислоты обеспечивает экспрессию белка в эффективных для контроля насекомых количествах. В некоторых вариантах осуществления эффективные для контроля насекомых количества белка являются эффективными для контроля по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления эффективные для контроля насекомых количества белка являются эффективными для контроля по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura*

(озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька).

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии: (а) обеспечения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащему последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3); (б) введения в растение, культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты из стадии (а) с получением трансформированного растения, трансформированной культуры тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и (с) выращивания трансформированного растения или регенерации трансформированного растения из трансформированной культуры тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами. В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение представляет собой трансгенное растение маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения трансгенного семени, предусматривающий стадии: (а) получения фертильного трансгенного растения по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащего последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3); и (б) выращивание растения в соответствующих условиях для получения трансгенного семени. В некоторых вариантах осуществления трансгенное семя представляет собой семя трансгенного маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения потомка любого поколения фертильного трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии: (a) получения фертильного трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3); (b) сбора трансгенного семени от трансгенного растения; (c) посева собранного трансгенного семени и (d) выращивания трансгенных растений-потомков из семени, где потомок характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами по сравнению с нетрансформированным растением. В некоторых вариантах осуществления растений-потомок представляет собой растения маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где первое или второе родительское растение представляет собой растение по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащее последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), с получением растения-потомка первого поколения, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления растение-потомок первого поколения представляет собой растение маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии: (а) полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где первое или второе родительское растение представляет собой растение по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащее последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3); и (b) отбора растения-потомка первого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами, где выбранное растение-потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления улучшенные инсектицидные свойства представляют собой улучшенные инсектицидные свойства в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления растение-потомок первого поколения представляет собой растение маиса. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает стадии: (а) обеспечения самоопыления растения-потомка первого поколения с получением тем самым совокупности растений-потомков второго поколения; и (b) отбора из растений-потомков второго поколения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, где отобранные растения-потомки второго поколения содержат молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым, предусматривающий питание вредителя растением или частью растения, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3). В некоторых вариантах осуществления вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой *Spodoptera frugiperda* (кукурузную листовую совку). В некоторых вариантах

осуществления вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой по меньшей мере два (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления растение или часть растения представляют собой растение маиса или часть растения маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения товарного растительного продукта, при этом способ предусматривает применение растения по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащего последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3) с получением из него указанного товарного растительного продукта. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой растение маиса. В некоторых вариантах осуществления товарный растительный продукт представляет собой зерно, крахмал, масло из семян, патоку, муку тонкого помола, муку крупного помола, крахмал, крупу или белок.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает: (а) приведение образца в контакт с парой праймеров, которые при применении в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), образуют ампликон, который является диагностическим в отношении молекулы нуклеиновой кислоты; (b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с получением тем самым ампликона; и (c) обнаружение ампликона. В некоторых вариантах осуществления пара праймеров представляет собой первый праймер и второй праймер, где первый праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны обратной комплементарной последовательности для последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или

нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса.

5 В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает: (a) приведение образца в контакт с зондом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту  
10 осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), и не гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК контрольного растения маиса, не содержащего молекулу нуклеиновой кислоты; (b) воздействие на образец и зонда условий гибридизации  
15 высокой жесткости; и (c) обнаружение гибридизации зонда с молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления зонд содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, или ее обратно комплементарной последовательности. В  
20 некоторых вариантах осуществления длина зонда составляет 10-50 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена пара  
25 полинуклеотидных праймеров, содержащая первый полинуклеотидный праймер и второй полинуклеотидный праймер, которые действуют совместно в присутствии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащей последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), в  
30 образце с образованием ампликона, диагностического в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса. В некоторых вариантах осуществления первый полипептидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности

под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны обратно комплементарной последовательности для последовательности под любым из

5 SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-30 нуклеотидов.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен набор для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых

10 вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащей последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в

15 таблице 3), при этом набор содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты из смежных нуклеотидов с достаточной длиной, чтобы она действовала в качестве праймера или зонда в способе обнаружения нуклеиновой кислоты, и которая после амплификации или гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновой

20 кислоты в образце с последующим обнаружением ампликона или гибридизации с целевой последовательностью является диагностической в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 10 смежных

25 нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или

30 последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит зонд, который содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов,

которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, или ее обратно комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления длина зонда составляет 10-50 нуклеотидов.

5 В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ, предусматривающий введение модификации в молекулу нуклеиновой кислоты, трансгенную клетку-хозяина или трансгенное растение по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления с получением тем самым модифицированной молекулы нуклеиновой кислоты, трансгенной клетки-хозяина или модифицированного  
10 трансгенного растения. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой делецию, вставку, замену, дупликацию или инверсию или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модификация предусматривает делецию части или всей кодирующей последовательности селективируемого маркера, присутствующей в молекуле нуклеиновой кислоты (например, PMI). В некоторых  
15 вариантах осуществления модификацию вводят с применением нуклеазы или гомологичной рекомбинации или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR-Cas. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает получение растения из модифицированной трансгенной клетки-хозяина и обеспечение самоопыления или  
20 скрещивание растения с другим растением с получением тем самым модифицированного трансгенного растения-потомка. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает обеспечение самоопыления или скрещивание модифицированного трансгенного растения с другим растением с получением тем самым модифицированного трансгенного растения-потомка. В  
25 некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает обеспечение самоопыления или ауткроссинг модифицированного трансгенного растения-потомка в течение по меньшей мере одного дополнительного поколения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

30 На фиг. 1 представлена диаграмма бинарного вектора 24795, последовательность нуклеиновой кислоты которого представляет собой последовательность под SEQ ID NO:2.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ПЕРЕЧНЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера.

5 SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты бинарного вектора 24795, которая включает кассету экспрессии с последовательностью под SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кодирующей последовательности, которая кодирует eCry1Gb.1Ig.

10 SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность eCry1Gb.1Ig.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кодирующей последовательности, которая кодирует PMI.

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность PMI.

15 SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кодирующей последовательности, которая кодирует PMI, имеющую “молчащую” мутацию в одном нуклеотидном положении по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 5.

20 SEQ ID NO: 8 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей “молчащую” мутацию в последовательности под SEQ ID NO: 7.

25 SEQ ID NO: 9 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительную мутацию относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.

30 SEQ ID NO: 10 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительные мутации относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.

30 SEQ ID NO: 11 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительные мутации относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.





SEQ ID NO: 29 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительную мутацию относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.

5 SEQ ID NO: 30 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительные мутации относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.

10 SEQ ID NO: 31 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты кассеты экспрессии, кодирующей белок eCry1Gb.1Ig (SEQ ID NO: 4), а также PMI (SEQ ID NO: 6) в качестве селективируемого маркера и содержащей дополнительные мутации относительно последовательности под SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 32-75 представлены в таблице 3.

## 15 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Подразумевается, что настоящее описание не представляет собой подробный перечень всех различных способов, с помощью которых может быть реализовано настоящее изобретение, или всех признаков, которые можно добавить к настоящему изобретению. Например, признаки, проиллюстрированные в отношении одного

20 варианта осуществления, могут быть включены в другие варианты осуществления, а признаки, проиллюстрированные в отношении конкретного варианта осуществления, могут быть удалены из такого варианта осуществления. Таким образом, в настоящем изобретении предполагается, что в некоторых вариантах осуществления можно

25 исключить или опустить любой признак или комбинацию признаков, изложенных в данном документе. Кроме того, в свете настоящего изобретения для специалистов в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты и дополнения к различным вариантам осуществления, предлагаемым в данном документе, которые не

30 отступают от сути настоящего изобретения. Следовательно, следующие описания предназначены для иллюстрации некоторых конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, а не для исчерпывающего определения всех их преобразований, комбинаций и вариантов.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понятно специалисту средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Терминология, используемая в данном документе в описании настоящего изобретения, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предполагает ограничение настоящего изобретения.

5 Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, цитируемые в данном документе, включены с помощью ссылки во всей своей полноте для объяснения идей, относящихся к предложению и/или абзацу, в котором приведена данная ссылка.

10 Нуклеотидные последовательности, предусмотренные в данном документе, представлены в направлении от 5' - к 3'-концу слева направо и представлены с применением стандартного кода для представления нуклеиновых оснований, как изложено в §§1.821-1.825 в 37 CFR, и в стандарте ST.25 Всемирной организации интеллектуальной собственности (WIPO), например: аденин (A), цитозин (C), тимин (T) и гуанин (G).

15 Аналогичным образом аминокислоты обозначены с применением стандарта ST.25 WIPO, например: аланин (Ala; A), аргинин (Arg; R), аспарагин (Asn; N), аспарагиновая кислота (Asp; D), цистеин (Cys; C), глутамин (Gln; Q), глутаминовая кислота (Glu; E), глицин (Gly; G), гистидин (His; H), изолейцин (Ile; I), лейцин (Leu; L), лизин (Lys; K), метионин (Met; M), фенилаланин (Phe; F), пролин (Pro; P), серин (Ser; S), треонин (Thr; T), триптофан (Trp; W), тирозин (Tyr; Y) и валин (Val; V).

20 Если контекст не указывает иное, то, в частности, предполагается, что различные признаки настоящего изобретения, описанного в данном документе, можно применять в любой комбинации. Более того, в настоящем изобретении также предполагается, что в некоторых вариантах осуществления можно исключить или опустить любой признак или комбинацию признаков, изложенных в данном документе. С целью иллюстрации, если в данном описании утверждается, что композиция 25 содержит компоненты A, B и C, то это, в частности, предполагает, что любой из A, B или C или их комбинацию можно опустить и отклонить по отдельности или в любой комбинации.

### **Определения**

30 Для ясности определенные термины, используемые в данном описании, определены и представлены, как указано далее.

Формы единственного числа, используемые в данном документе и прилагаемой формуле изобретения, включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на “растение” является

ссылкой на одно или несколько растений и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и т. д.

Применяемое в данном документе слово “или” также охватывает “и/или”, если контекст явно не указывает на иное.

5 Термин “приблизительно”, используемый в данном документе, означает примерно, приближенно, около или в области. Если термин “приблизительно” используется в сочетании с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы в большую и меньшую стороны от изложенных числовых значений. В целом термин “приблизительно”, используемый в данном документе, 10 модифицирует числовое значение в большую и меньшую стороны от указанного значения путем отклонения на 20 процентов, предпочтительно на 10 процентов вверх или вниз (больше или меньше). Что касается температуры, термин “приблизительно” означает  $\pm 1^\circ\text{C}$ , предпочтительно  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Если термин “приблизительно” используется в контексте настоящего изобретения (например, в комбинациях с температурой или 15 значениями молекулярной массы), предпочтительным является точное значение (т. е. без “приблизительно”).

Используемые в данном документе фразы, такие как “между приблизительно X и Y”, “между приблизительно X и приблизительно Y”, “от X до Y” и “от 20 приблизительно X до приблизительно Y” (и подобные фразы), следует интерпретировать как включающие X и Y, если в контексте не указано иное.

Термины “содержит”, “содержащий”, “включает”, “включающий”, “имеющий” и близкие к ним по значению означают “включающий без ограничений”. Термин “состоящий из” означает “включающий и ограничивающийся следующим”. Термин “состоящий фактически из” означает, что композиция, способ или структура могут 25 включать дополнительные ингредиенты, стадии и/или части, однако только если дополнительные ингредиенты, стадии и/или части не изменяют существенным образом основные и новые характеристики заявленной композиции, способа или структуры.

Единицы, префиксы и символы могут обозначаться в их форме, принятой в SI. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записаны слева направо в ориентации 5'- 30 3'; аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от N-конца к C-концу соответственно. Аминокислоты в данном документе могут быть обозначены либо их общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической

номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогичным образом, нуклеотиды могут быть обозначены по их общепринятым однобуквенным кодам.

“Активность” инсектицидных белков по настоящему изобретению означает, что инсектицидные белки действуют как активные при пероральном поглощении средства для контроля вредителей (например, насекомых), характеризуются токсическим действием (например, подавляют способность насекомых-вредителей выживать, расти и/или размножаться) и/или способны нарушать или сдерживать питание вредителей, что может привести или не привести к гибели насекомого. Когда инсектицидный белок по настоящему изобретению доставляется в организм вредителя, то результатом, как правило, является гибель вредителя, или вредитель не кормится на источнике, который делает инсектицидный белок доступным для вредителя.

Термин “химерный полинуклеотид” или “химерный белок” (или аналогичные термины), используемый в данном документе, относится к молекуле, содержащей два или более полинуклеотидов или белков или их фрагментов различного происхождения, собранных в единую молекулу. Термины “химерная конструкция”, “химерный ген”, “химерный полинуклеотид” или “химерная нуклеиновая кислота” относятся к любой конструкции или молекуле, которые содержат без ограничения (1) полинуклеотиды (например, ДНК), в том числе регуляторные и кодирующие полинуклеотиды, которые вместе не встречаются в природе (т. е. по меньшей мере один из полинуклеотидов в конструкции является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее других полинуклеотидов), или (2) полинуклеотиды, кодирующие части белков, не связанные в естественных условиях, или (3) части промоторов, которые не связаны в естественных условиях. Кроме того, химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из разных источников, или могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из того же источника, но расположенные иным способом, чем встречающийся в природе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота содержат кассету экспрессии, содержащую полинуклеотид по настоящему изобретению под контролем регуляторных полинуклеотидов, в частности, под контролем регуляторных полинуклеотидов, функциональных у растений или бактерий. Слова “химерный” и “гибрид” по

отношению к полинуклеотиду или белку используются в данном документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего изобретения “химерный” белок представляет собой белок, созданный путем слияния всех или части по меньшей мере двух разных белков.

5 Химерный белок также может быть дополнительно модифицирован, чтобы он включал добавления, замены и/или делеции из одной или нескольких аминокислот. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения химерный белок представляет собой химерный белок C<sub>1</sub>u, содержащий все или часть двух разных белков C<sub>1</sub>u, слитых вместе в единый полипептид. В некоторых вариантах осуществления химерный белок C<sub>1</sub>u

10 дополнительно содержит дополнительные модификации, такие как добавления, замены и/или делеции одной или нескольких аминокислот. “Химерный инсектицидный белок” представляет собой химерный белок, который характеризуется инсектицидной активностью.

Термин “кодон-оптимизированная последовательность”, используемый в

15 данном документе, означает нуклеотидную последовательность, в которой кодоны выбраны так, чтобы отражать склонность к определенным кодонам, которой может характеризоваться клетка- или организм-хозяин. Как правило, это осуществляется таким образом, чтобы сохранить аминокислотную последовательность полипептида, кодируемого нуклеотидной последовательностью, которая подлежит оптимизации. В

20 определенных вариантах осуществления последовательность ДНК рекомбинантной ДНК-конструкции включает последовательность, которая была подвергнута кодон-оптимизации для клетки (например, клетки животного, растения или гриба), в которой конструкция будет экспрессироваться. Например, в конструкции, которая будет экспрессироваться в растительной клетке, могут быть подвергнуты кодон-оптимизации

25 вся последовательность или ее части (например, первый элемент для супрессии гена или элемент для экспрессии гена) для экспрессии в растении. См., например, патент США № 6121014, который включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению являются кодон-оптимизированными для экспрессии в растительной клетке (например,

30 клетке двудольного растения или клетке однодольного растения) или бактериальной клетке.

“Контроль” насекомых означает подавление посредством токсического действия способности насекомых-вредителей к выживанию, росту, питанию и/или размножению, и/или ограничение повреждения или гибели культурных растений, вызванных

насекомыми, и/или защиту максимального потенциального урожая сельскохозяйственной культуры при выращивании в присутствии насекомых-вредителей. “Контроль” насекомых может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения “контроль” насекомого означает уничтожение насекомых.

5 Термин “контрольное растение” или “контроль”, используемый в данном документе, может обозначать в данном документе нетрансгенное растение родительской линии, применяемое для получения трансгенного растения. В некоторых случаях контрольное растение может представлять собой линию трансгенных растений, 10 содержащих пустой вектор или маркерный ген, но не содержащих рекомбинантный полинуклеотид по настоящему изобретению, который экспрессируется в трансгенном растении, подлежащем оценке. Обычно контрольное растение представляет собой растение той же линии или сорта, что и трансгенное растение, подлежащее 15 тестированию, но не содержащее обеспечивающей специфический признак рекомбинантной ДНК, который характеризует трансгенное растение. Такое исходное растение, не содержащее такой обеспечивающей специфический признак рекомбинантной ДНК, может представлять собой встречающееся в природе растение, растение дикого типа, элитное, нетрансгенное растение или трансгенное растение без 20 обеспечивающей специфический признак рекомбинантной ДНК, который характеризует трансгенное растение. Исходное растение, не содержащее обеспечивающей специфический признак рекомбинантной ДНК, может представлять собой сибс трансгенного растения, имеющего обеспечивающую специфический признак рекомбинантную ДНК. Такой сибс исходного растения может содержать 25 другую рекомбинантную ДНК.

В контексте настоящего изобретения термин “соответствующий” или “соответствует” означает, что когда аминокислотные последовательности эталонной последовательности выровнены со второй аминокислотной последовательностью (например, вариантом или гомологичными последовательностями), отличной от эталонной последовательности, аминокислоты, которые “соответствуют” 30 определенным пронумерованным положениям во второй аминокислотной последовательности, представляют собой аминокислоты, которые выравниваются с этими положениями в эталонной аминокислотной последовательности, но не обязательно находятся в точных числовых положениях относительно конкретной эталонной аминокислотной последовательности по настоящему изобретению.

Используемый в данном документе термин “белок C<sub>ry</sub>” означает инсектицидный белок типа кристаллического дельта-эндотоксина из *Bacillus thuringiensis*. Термин “белок C<sub>ry</sub>” может относиться к форме протоксина или любому его инсектицидно активному фрагменту или токсину, включая форму, подвергнутую частичному процессингу, и форму зрелого токсина (например, без N-концевого пептидильного фрагмента и/или C-концевого хвоста протоксина).

“Доставлять” или “доставка” композиции или токсина означает, что композиция или токсин вступают в контакт с насекомым, что приводит к токсическому действию и контролю насекомого. Композиция или токсин могут доставляться с помощью многих общепризнанных способов, например, перорально путем поглощения насекомым при экспрессии в трансгенном растении.

Термин “домен” относится к набору аминокислот, консервативных в специфических положениях вдоль выравнивания последовательностей эволюционно родственных белков. В то время как аминокислоты в других положениях гомологов могут отличаться, аминокислоты, которые являются высококонсервативными в специфических положениях, указывают на аминокислоты, которые, вероятно, являются необходимыми для структуры, стабильности или функции белка. Идентифицированные по их высокой степени консервативности в выровненных последовательностях семейства гомологов белков, они могут применяться в качестве идентификаторов для определения того, принадлежит ли любой рассматриваемый полипептид к ранее идентифицированной группе полипептидов.

“Сконструированный” белок по настоящему изобретению относится к белку, последовательность которого отличается по меньшей мере одним аминокислотным положением от последовательности по меньшей мере одного соответствующего исходного белка. Сконструированный белок может представлять собой мутантный белок, который содержит, например, одну или несколько модификаций, таких как делеции, добавления и/или замены по одному или нескольким аминокислотным положениям по сравнению с исходным белком. Сконструированный белок может быть химерным белком и содержать, например, один или несколько обменных или перетасованных доменов или фрагментов из по меньшей мере двух исходных белков.

“Эффективное количество для контроля насекомых” означает такую концентрацию токсина или токсинов, которая подавляет посредством токсического действия способность насекомых к выживанию, росту, питанию и/или размножению, или ограничивает связанное с насекомыми повреждение или потерю культурных

растений. “Эффективное количество для контроля насекомых” может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя оно предпочтительно означает уничтожение насекомых. “Инсектицидной” называется токсическая биологическая активность, способная осуществлять контроль насекомых, предпочтительно путем их

5 уничтожения. Трансгенное растение с “улучшенными инсектицидными свойствами” представляет собой растение, которое экспрессирует белок или белки в эффективных для контроля насекомых количествах, при этом в некоторых вариантах осуществления растение является инсектицидным для более широкого спектра видов насекомых по сравнению с растением того же вида, которое является нетрансформированным. Такой

10 более широкий спектр видов насекомых включает насекомых-вредителей растений, таких как насекомые-вредители, относящиеся к чешуекрылым, например, *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка).

Термин “объект” относится к исходному трансформанту и/или потомку трансформанта, которые содержат гетерологичную ДНК. Термин “объект” также

15 относится к потомку, полученному путем полового ауткроссинга между трансформантом и другой линией маиса. Даже после повторного возвратного скрещивания с рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя присутствует у потомка, полученного в результате скрещивания, в том же местоположении в хромосоме. Термин “объект” также

20 относится к ДНК из исходного трансформанта, содержащего вставленную последовательность ДНК и фланкирующую геномную последовательность, непосредственно примыкающую к вставленной ДНК, которые, как ожидается, будут передаваться потомку в результате полового скрещивания одной родительской линии, которая содержит вставленную ДНК (например, исходный трансформант и потомок,

25 полученный в результате самоопыления), и родительской линии, не содержащей вставленную ДНК. Как правило, трансформация растительной ткани приводит к получению нескольких объектов, каждый из которых представляет вставку конструкции ДНК в отличающееся местоположение в геноме растительной клетки.

Термин “кассета экспрессии”, используемый в данном документе, означает

30 последовательность нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией конкретной(-ых) нуклеотидной(-ых) последовательности(-ей) в соответствующей клетке-хозяине, содержащую один или несколько трансгенов, при этом каждый трансген содержит промотор, функционально связанный с представляющей интерес нуклеотидной последовательностью, которая функционально связана с сигналами

терминации. Каждый трансген также, как правило, содержит последовательности, необходимые для правильной трансляции нуклеотидной последовательности. По меньшей мере один из компонентов кассеты экспрессии, содержащей представляющую(-ие) интерес нуклеотидную(-ые) последовательность(-и), может быть гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее других компонентов. Кассета экспрессии может также представлять собой последовательность, которая встречается в природе, но была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Однако, как правило, кассета экспрессии является гетерологичной по отношению к хозяину, т. е. конкретная последовательность нуклеиновой кислоты в кассете экспрессии не встречается в клетке-хозяине в естественных условиях, а должна быть введена в клетку-хозяина или предка клетки-хозяина с помощью события трансформации. Экспрессия нуклеотидной последовательности в кассете экспрессии может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцируемого промотора, который инициирует транскрипцию только тогда, когда на клетку-хозяина воздействует некоторый конкретный внешний стимул. В случае многоклеточного организма, такого как растение, промотор также может быть специфичным по отношению к конкретной ткани, или органу, или стадии развития.

Кассета экспрессии, содержащая представляющую(-ие) интерес нуклеотидную(-ые) последовательность(-и) может быть химерной, что означает, что по меньшей мере один из ее компонентов является гетерологичным по отношению к по меньшей мере одному из ее остальных компонентов. Кассета экспрессии также может представлять собой последовательность, которая содержит нативный промотор, управляющий ее нативным геном, однако она была получена в рекомбинантной форме, применимой для гетерологичной экспрессии. Такое использование кассеты экспрессии обеспечивает то, что она является не встречающейся в природе в клетке, в которую она была введена.

Кассета экспрессии также необязательно может содержать одну или несколько областей терминации транскрипции и/или трансляции, которые функциональны в растениях. Разнообразные терминаторы транскрипции доступны для применения в кассетах экспрессии, и они отвечают за терминацию транскрипции за пределами представляющей интерес гетерологичной нуклеотидной последовательности и правильное полиаденилирование мРНК. Область терминации может быть нативной по отношению к области инициации транскрипции, может быть нативной по отношению к функционально связанной представляющей интерес нуклеотидной последовательности,

может быть нативной по отношению к растению-хозяину или может быть получена из другого источника (т. е. быть чужеродной или гетерологичной по отношению к промотору, представляющей интерес нуклеотидной последовательности, растению-хозяину или любой их комбинации).

- 5 “Ген” содержит кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты и, как правило, также содержит другие, преимущественно регуляторные, нуклеиновые кислоты, отвечающие за контроль экспрессии, иными словами транскрипцию и трансляцию кодирующей части. Ген также может содержать другие 5'- и 3'-нетранслируемые последовательности и последовательности терминации.
- 10 Дополнительными элементами, которые могут присутствовать, являются, например, интроны. Регуляторная последовательность нуклеиновой кислоты гена в норме может не быть функционально связанной с ассоциированной последовательностью нуклеиновой кислоты, как это встречается в природе, и в таком случае ген будет химерным геном.
- 15 Термин “идиоплазма” относится к генетическому материалу особи (например, растения), группы особей (например, линии, сорта или семейства растений) или клона, происходящего из линии, сорта, вида или культуры, или от них. Идиоплазма может представлять собой часть организма или клетки или может быть отделена от организма или клетки. В общем случае идиоплазма обеспечивает генетический материал со
- 20 специфической молекулярной организацией, который обеспечивает физическую основу для некоторых или всех наследственных качеств организма или культуры клеток. Используемый в данном документе термин “идиоплазма” включает клетки, семя или ткани, из которых могут быть выращены новые растения, или части растений, такие как листья, стебли, пыльца или клетки, которые можно культивировать в целое растение.
- 25 При использовании в отношении гена, или полинуклеотида, или полипептида термин “гетерологичный” относится к гену, или полинуклеотиду, или полипептиду, или их части, которые находятся не в своем естественном окружении (т. е. были изменены вследствие вмешательства человека). Например, гетерологичный ген может предусматривать полинуклеотид одного вида, введенный в организм другого вида.
- 30 Гетерологичный ген также может предусматривать полинуклеотид, нативный по отношению к организму, но который был изменен определенным образом (например, подвергнут мутации, добавлен в виде множественных копий, связан с ненативным промоторным или энхансерным полинуклеотидом и т. д.). Гетерологичные гены дополнительно могут предусматривать полинуклеотиды генов растения, которые

включают кДНК-формы гена растения; при этом кДНК могут экспрессироваться либо в смысловой (с образованием мРНК), либо антисмысловой ориентации (с образованием антисмыслового РНК-транскрипта, комплементарного мРНК-транскрипту). В одном аспекте настоящего изобретения гетерологичные гены отличаются от эндогенных генов растения тем, что полинуклеотиды гетерологичного гена, как правило, присоединены к полинуклеотидам, содержащим регуляторные элементы, такие как промоторы, которые в естественном состоянии не встречаются ассоциированными с геном белка, кодируемого гетерологичным геном, или с полинуклеотидами гена растения в хромосоме, или ассоциированы с частями хромосомы, в которых они не встречаются в природе (например, гены, экспрессируемые в локусах, в которых ген в норме не экспрессируется). Кроме того, “гетерологичный” полинуклеотид относится к полинуклеотиду, не ассоциированному в естественном состоянии с клеткой-хозяином, в которую его вводят, включая не встречающиеся в природе множественные копии встречающегося в природе полинуклеотида.

Термины “увеличивать”, “увеличение”, “увеличенный”, “повышать”, “повышенный”, “повышение” и “улучшение” и аналогичные термины, используемые в данном документе, описывают повышение контроля вредителя растения, например, путем приведения вредителя в контакт с растением по настоящему изобретению (как, например, путем трансгенной экспрессии или с помощью способов местного применения). Увеличение контроля можно определять относительно уровня контроля вредителя растения в отсутствие молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (например, у растения, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты). Таким образом, в вариантах осуществления термины “увеличивать”, “увеличение”, “увеличенный”, “повышать”, “повышенный”, “повышение” и “улучшение” и аналогичные термины могут указывать на повышение на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или больше по сравнению с подходящим контролем (например, растением, частью растения, растительной клеткой, которые не содержат молекулу нуклеиновой кислоты).

Термины “идентичность” или “идентичный” в контексте двух последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей относятся к процентной доле идентичных нуклеотидов или аминокислот в линейной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности у эталонной (“запрашиваемой”) последовательности (или ее комплементарной нити) при сравнении

с тестируемой (“рассматриваемой”) последовательностью, когда две последовательности подвергнуты глобальному выравниванию. Если не указано иное, то термин “идентичность последовательности”, используемый в данном документе, относится к значению, полученному с применением алгоритма Нидлмана и Вунша ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453), реализованного в инструменте выравнивания EMBOSS Needle с применением файлов по умолчанию с матрицей EBLOSUM62 для белка с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение концевого гэпа = 0,5) или DNAMfull для нуклеиновых кислот с параметрами по умолчанию (открытие гэпа = 10, продолжение гэпа = 0,5, штраф за внесение концевого гэпа = ложно, открытие концевого гэпа = 10, продолжение концевого гэпа = 0,5), или любой эквивалентной ему программы. EMBOSS Needle является доступным, например, от EMBL-EBI, как, например, на следующем веб-сайте: [ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) и как описано в следующей публикации: “The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019.” Madeira et al. *Nucleic Acids Research*, June 2019, 47(W1):W636-W641. Термин “эквивалентная программа”, используемый в данном документе, относится к любой программе сравнения последовательностей, которая для любых двух исследуемых последовательностей создает выравнивание, характеризующееся идентичными совпадениями нуклеотидных или аминокислотных остатков и идентичным процентом идентичности последовательностей при сравнении с соответствующим выравниванием, созданным с помощью EMBOSS Needle. В некоторых вариантах осуществления по сути идентичные последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотные последовательности могут выполнять по сути одинаковую функцию.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды или полипептиды по настоящему изобретению являются “выделенными”. Термин “выделенный” полинуклеотид или полипептид означает полинуклеотид или полипептид, которые больше не находятся в своей естественной среде. Выделенные полинуклеотиды или полипептиды по настоящему изобретению могут находиться в очищенной форме или могут находиться в рекомбинантном хозяине, в таком как трансгенная бактерия или трансгенное растение. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления термин “выделенная” молекула нуклеиновой кислоты охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, когда молекула нуклеиновой кислоты содержится внутри генома трансгенного растения.

При применении в контексте молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов по настоящему изобретению термин “выделенный” относится к полинуклеотиду, который идентифицирован внутри своего хромосомного полинуклеотидного окружения в пределах соответствующего организма-источника и выделен/отделен от него. Выделенная нуклеиновая кислота или полинуклеотид не является нуклеиновой кислотой, которая встречается в своем естественном окружении, если она действительно имеет встречающийся в природе аналог. В отличие от этого, нуклеиновые кислоты, не являющиеся выделенными, представляют собой нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и РНК, которые встречаются в состоянии, в котором они находятся в природе. Например, определенный полинуклеотид (например, ген) встречается в хромосоме клетки-хозяина в непосредственной близости от соседних генов. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может присутствовать в одонитевой или двухнитевой форме. В качестве альтернативы она может содержать как смысловую, так и антисмысловую нити (т. е. молекула нуклеиновой кислоты может быть двухнитевой). В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению являются выделенными.

Используемый в данном документе термин “маис” включает *Zea mays* и все сорта растения, которые можно скрещивать с *Zea mays*, включая виды дикого маиса. Термины “маис” и “кукуруза” используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин “мотив”, или “консенсусная последовательность”, или “сигнатура” относится к короткой консервативной области в последовательности эволюционно родственных белков. Мотивы зачастую являются высококонсервативными частями доменов, но могут также включать только часть домена или располагаться вне консервативного домена (если все аминокислоты мотива оказываются за пределами определенного домена).

“Нативная” или “дикого типа” нуклеиновая кислота, полинуклеотид, нуклеотидная последовательность, полипептид или аминокислотная последовательность относится к встречающимся в природе или эндогенным нуклеиновой кислоте, полинуклеотиду, нуклеотидной последовательности, полипептиду или аминокислотной последовательности.

“Молекула нуклеиновой кислоты”, или “нуклеиновая кислота”, или “полинуклеотид” (которые используются в данном документе взаимозаменяемо) представляет собой сегмент одонитевой, двухнитевой или частично двухнитевой ДНК или РНК или их гибрид, который может быть выделен или синтезирован из любого

источника. В контексте настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, как правило, представляет собой сегмент ДНК. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению представляют собой выделенные молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержатся внутри вектора, растения, растительной клетки или бактериальной клетки. Термины также включают ссылку на дезоксирибополинуклеотид, рибополинуклеотид или их аналоги, характеризующиеся основным свойством природного рибонуклеотида, заключающимся в том, что они гибридизируются, при жестких условиях гибридизации, по сути с такой же нуклеотидной последовательностью, что и встречающиеся в природе нуклеотиды и/или обеспечивают трансляцию с получением такой(-их) же аминокислоты(аминокислот), что и встречающийся(-щиеся) в природе нуклеотид(-ы). Молекула нуклеиновой кислоты может быть полноразмерной или представлять собой подпоследовательность нативного или гетерологичного структурного или регуляторного гена. Если не указано иное, термин включает ссылку на точно определенную последовательность, а также ее комплементарную последовательность. Таким образом, молекулы ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам, представляют собой “полинуклеотиды” в том смысле, как данный термин подразумевается в данном документе. Более того, молекулы ДНК или РНК, содержащие нетипичные основания, такие как инозин, или модифицированные основания, такие как тритилированные основания, названные в качестве лишь двух примеров, представляют собой “полинуклеотиды” в том смысле, как этот термин используется в данном документе. Следует понимать, что большое разнообразие модификаций было произведено в отношении ДНК и РНК, которые служат для многих полезных целей, известных специалистам в данной области техники. Термин “полинуклеотид”, как он используется в данном документе, охватывает такие химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, а также химически синтезированные формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, включая, среди прочего, простые и сложные клетки.

“Функционально связанный” относится к ассоциации полинуклеотидов на одной молекуле нуклеиновой кислоты, вследствие чего функция одного влияет на функцию другого. Например, промотор функционально связан с кодирующим полинуклеотидом, если он способен влиять на экспрессию такого кодирующего полинуклеотида (т. е. такой кодирующий полинуклеотид находится под транскрипционным контролем

промотора). Кодирующий полинуклеотид в смысловой или антисмысловой ориентации может быть функционально связан с регуляторными полинуклеотидами.

Термин “растение” включает ссылку на целые растения, органы растения, растительные ткани (например, листья, стебли, корни и т. д.), семена и растительные клетки, а также их потомка. Растительная клетка, как используется в данном документе, предусматривает без ограничения семена, суспензионные культуры, зародышей, области меристемы, каллюсную ткань, листья, корни, побеги, гаметофиты, спорофиты, пыльцу и микроспоры. Класс растений, которые можно применять в способах по настоящему изобретению, в целом настолько же широк, как класс высших растений, поддающихся методикам трансформации, включая как однодольные, так и двудольные растения, в том числе виды из родов: Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Avena, Hordeum, Secale, Allium и Triticum. Особенно предпочтительным растением является маис.

“Растительная клетка” представляет собой структурную и физиологическую единицу растения, содержащую протопласт и клеточную стенку. Растительная клетка может находиться в форме выделенной отдельной клетки, или культивированной клетки, или в виде части более высокоорганизованной единицы, такой как, например, растительная ткань, орган растения или целое растение.

“Культура растительных клеток” означает культуры растительных единиц, таких как, например, протопласты, клетки в культуре клеток, клетки в растительных тканях, пыльца, пыльцевые трубки, семяпочки, зародышевые мешки, зиготы и зародыши на различных стадиях развития.

“Растительный материал” относится к листьям, стеблям, корням, цветкам или частям цветков, плодам, пыльце, яйцеклеткам, зиготам, семенам, черенкам, культурам клеток или тканей или любой другой части или продукту растения.

“Орган растения” представляет собой отдельную и визуально структурированную и дифференцированную часть растения, такую как корень, стебель, лист, цветковая почка или зародыш.

Используемые в данном документе термины “растительный материал”, “часть растения” или “растительная ткань” означают растительные клетки, протопласты растений, тканевые культуры растительных клеток, из которых растения могут быть регенерированы, каллюсы растений, скопления растительного материала и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, таких как зародыши, пыльца, семечки, семена, листья, цветки, ветви, плоды, зерна, колосья, початки, листовые обертки, цветоножки, корни, кончики корней, пыльники, клубни, корневища и т. п. В термин “растительная ткань” включена любая ткань растения в полевых условиях или в культуре.

Используемый в данном документе термин “образец растения” или “биологический образец” относится либо к интактной, либо к неинтактной (например, молотому семени или растительной ткани, порубленной растительной ткани, лиофилизированной ткани) растительной ткани. Это также может быть экстракт, содержащий интактные или неинтактные семя или растительную ткань. Биологический образец или экстракт может быть выбран из группы, состоящей из кукурузной муки, кукурузной муки грубого помола, кукурузной патоки, кукурузного масла, кукурузного крахмала и круп, изготовленных цельными или частями с содержанием вторичных продуктов кукурузы.

“Представляющий интерес полинуклеотид” или “представляющая интерес нуклеиновая кислота” относится к любому полинуклеотиду, который при переносе в организм, например растение, придает организму требуемую характеристику, такую как устойчивость к насекомым, устойчивость к заболеваниям, толерантность к гербицидам, устойчивость к антибиотикам, улучшенная питательная ценность, улучшенные показатели в производственном процессе, выработка коммерчески ценных фермента или метаболита, измененная репродуктивная способность и т. п.

Следует понимать, что “часть” или “фрагмент” полипептида по настоящему изобретению означает аминокислотную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты уменьшенной длины по сравнению с эталонной аминокислотной последовательностью или последовательностью нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В соответствующих случаях такая часть или фрагмент согласно настоящему изобретению могут быть включены в более длинный полипептид или нуклеиновую кислоту, частью которого/которой они являются (например, меченый или слитый белок или кассету экспрессии). В вариантах осуществления “часть” или “фрагмент” по сути сохраняют активность, такую как инсектицидная активность

(например, по меньшей мере 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или даже 100% активности) полноразмерного белка или нуклеиновой кислоты, или даже имеют большую активность, например, инсектицидную активность, чем полноразмерный белок).

5           Используемый в данном документе термин “часть для вегетативного размножения” относится к любому материалу, который используется для размножения растения, предпочтительно трансгенного растения. Часть для вегетативного размножения может представлять собой семя, черенок или совокупность клеток из трансгенного растения, которые можно применять для получения

10 сельскохозяйственной культуры трансгенных растений.

Термины “белок”, “пептид” и “полипептид” используются в данном документе взаимозаменяемо.

Термин “промотор”, используемый в данном документе, относится к полинуклеотиду, обычно расположенному выше (5') сайта начала трансляции

15 кодирующей последовательности, который контролирует экспрессию кодирующей последовательности, путем обеспечения распознавания для РНК-полимеразы и других факторов, необходимых для надлежащей транскрипции. Например, промотор может содержать область, содержащую базальные промоторные элементы, распознаваемые РНК-полимеразой, область, содержащую 5'-нетранслируемую область (UTR)

20 кодирующей последовательности, и необязательно интрон.

“Не активный в пыльце промотор” представляет собой промотор, который управляет экспрессией генов в пыльце целевых видов растений на низком или не поддающемся выявлению уровне. Количественную оценку мРНК-транскриптов представляющего интерес белка в пыльце можно произвести различными способами,

25 включая qRT-PCR/RNA-Seq; уровень белка можно измерить с помощью широко применяемых методик ELISA и вестерн-блоттинга. В настоящем изобретении промотор считается не активным в пыльце, если он управляет экспрессией белка по настоящему изобретению на уровне <10 нг/мг TSP (общего растворимого белка) в пыльце.

Используемый в данном документе термин “рекомбинантный” относится к

30 форме нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК), белка, клетки, ткани, организма и т. д., которая в норме не будет встречаться в природе и которая, соответственно, была создана при вмешательстве человека. Используемый в данном документе термин “рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты” означает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую комбинацию полинуклеотидов, которые

в естественном состоянии не встречаются совместно и являются результатом вмешательства человека, например, молекулу нуклеиновой кислоты, которая состоит из комбинации по меньшей мере двух полинуклеотидов, гетерологичных по отношению друг к другу, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая синтезирована искусственно, например, полинуклеотид, синтезированный с применением собранной нуклеотидной последовательности, и содержит полинуклеотид, отличающийся от полинуклеотида, который будет в норме существовать в природе, или молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит трансген, искусственно введенный в геномную ДНК клетки-хозяина, и ассоциированную фланкирующую ДНК генома клетки-хозяина. Другим примером рекомбинантной молекулы нуклеиновой кислоты является молекула ДНК, полученная в результате вставки трансгена в геномную ДНК растения, что в конечном итоге может приводить к экспрессии молекулы рекомбинантной РНК или белка в данном организме. Используемый в данном документе термин “рекомбинантное растение” означает растение, которое в норме не будет существовать в природе, и оно является результатом вмешательства человека и содержит трансгенную молекулу или гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, которую можно встроить в его геном. В результате такого изменения генома рекомбинантное растение явно отличается от родственного растения дикого типа. “Рекомбинантные” бактерии представляют собой не встречающиеся в природе бактерии, которые содержат гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Такие бактерии могут быть созданы путем трансформации бактерий с помощью молекулы нуклеиновой кислоты или путем конъюгационного переноса плазмиды из одного бактериального штамма в другой, при этом плазида содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

Термины “снижать”, “сниженный”, “снижение”, “сокращение”, “уменьшать” и “подавлять” (и их грамматические варианты) и аналогичные термины, используемые в данном документе, относятся к уменьшению выживаемости, роста и/или размножения вредителя растений, например, путем приведения вредителя в контакт с растением по настоящему изобретению. Это уменьшение выживаемости, роста и/или размножения может определяться относительно уровня, наблюдаемого в отсутствие молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (например, у растения, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты). Таким образом, в вариантах осуществления термины “снижать”, “сниженный”, “снижающий”, “снижение”, “уменьшать” и “подавлять” (и их грамматические варианты) и аналогичные термины означают

уменьшение на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или больше по сравнению с растением, которое не приведено в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (например, растением, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты). В иллюстративных вариантах осуществления 5 снижение приводит к отсутствию или фактически отсутствию (т. е. незначительному количеству, например, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или даже менее чем приблизительно 1%) выявляемой выживаемости, роста и/или размножения вредителя растений.

10 “Регуляторные элементы” относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, и влияющим на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности 15 включают энхансеры, промоторы, трансляционные энхансерные последовательности, интроны и сигнальные последовательности полиаденилирования. Они включают природные и синтетические последовательности, а также последовательности, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и природных последовательностей. Регуляторные последовательности могут определять уровень 20 экспрессии, пространственный и временной паттерн экспрессии и для подгруппы промоторов экспрессию в индуктивных условиях (регуляция внешними факторами, такими как свет, температура, химические вещества и гормоны).

Используемый в данном документе термин “селектируемый маркер” означает нуклеотидную последовательность, которая при экспрессии придает отличительный 25 фенотип растению, части растения и/или растительной клетке, экспрессирующим маркер, и, таким образом, дает возможность отличать такие трансформированные растения, части растений и/или растительные клетки от тех, которые не имеют маркера. Такая нуклеотидная последовательность может кодировать либо селектируемый, либо подвергаемый скринингу маркер в зависимости от того, придает ли маркер признак, по 30 которому можно провести отбор с помощью химических средств, например путем применения селективного средства (например, антибиотика, гербицида и т. п.), или от того, является ли маркер просто признаком, который можно идентифицировать за счет наблюдения или тестирования, например путем скрининга (например, признаком, определяемым в R-локусе).

Термины “жесткие условия” или “жесткие условия гибридизации” включают ссылку на условия, при которых нуклеиновая кислота будет избирательно гибридизироваться с целевой последовательностью в определяемо более высокой степени, чем с другими последовательностями (например, в по меньшей мере 2-кратной по сравнению с нецелевой последовательностью), и необязательно могут по сути исключать связывание с нецелевыми последовательностями. Жесткие условия зависят от последовательности, и будут варьироваться при разных обстоятельствах. Посредством контроля жесткости условий гибридизации и/или отмывки можно идентифицировать целевые последовательности, которые могут быть комплементарны эталонной нуклеотидной последовательности на уровне вплоть до 100%. В качестве альтернативы можно применять условия умеренной или даже низкой жесткости для обеспечения некоторого несовпадения последовательностей, чтобы таким образом выявить меньшие степени сходства последовательностей. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что для функционирования в качестве праймера или зонда последовательность нуклеиновой кислоты должна быть лишь в достаточной степени комплементарной целевой последовательности для существенного связывания с ней с образованием, таким образом, стабильной двухнитевой структуры при используемых условиях. Таким образом, праймеры или зонды можно применять в условиях высокой, умеренной или даже низкой жесткости. Подобным образом условия низкой или умеренной жесткости могут быть предпочтительными для выявления гомологичных, ортологичных и/или паралогичных последовательностей, характеризующихся более низкими степенями идентичности последовательностей, чем те, которые идентифицировались бы в очень жестких условиях. Как правило, жесткие условия представляют собой условия, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, как правило, концентрация ионов Na (или других солей) составляет приблизительно 0,01-1,0 М при приблизительно pH 7,0 - pH 8,3, и температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для более длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Жестких условий также можно достичь с помощью добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид или раствор Денхардта (5 г фикола, 5 г поливинилпирролидона, 5 г бычьего сывороточного альбумина в 500 мл воды). Иллюстративные условия низкой жесткости включают гибридизацию с использованием буферного раствора с 30%-35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS

(додецилсульфата натрия) при 37°C и отмывку в 1X-2X SSC (20X SSC = 3,0 M NaCl/0,3 M цитрата тринатрия) при 50°C-55°C. Иллюстративные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C и отмывку в 0,5X-1X SSC при 55°C-60°C. Иллюстративные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C и отмывку в 0,1X SSC при 60°C-65°C. Дополнительный неограничивающий пример условий высокой жесткости включает гибридизацию в 4X SSC, 5X растворе Денхардта, 0,1 мг/мл денатурированной ДНК из молок лососевых, 25 mM фосфата Na при 65°C и отмывку в 0,1X SSC, 0,1% SDS при 65°C. Другой иллюстративный пример условий гибридизации высокой жесткости включает гибридизацию в 7% SDS, 0,5 M NaPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA при 50°C с отмывкой в 2X SSC, 0,1% SDS при 50°C, в качестве альтернативы с отмывкой в 1X SSC, 0,1% SDS при 50°C, в качестве альтернативы с отмывкой в 0,5X SSC, 0,1% SDS при 50°C, или в качестве альтернативы с отмывкой в 0,1X SSC, 0,1% SDS при 50°C, или даже с отмывкой в 0,1X SSC, 0,1% SDS при 65°C.

15 Специалистам в данной области техники будет понятно, что специфичность, как правило, зависит от отмывок после гибридизации, при этом важными факторами являются ионная сила и температура конечного раствора для отмывки.

Термин “стабильная трансформация” или “стабильно трансформированный”, используемый в данном документе, означает, что нуклеиновая кислота введена в клетку и интегрирована в геном клетки. Соответственно, интегрированная нуклеиновая кислота способна наследоваться ее потомком, более конкретно, потомком в нескольких последовательных поколениях. Используемый в данном документе “геном” также включает ядерный и пластидный геном, и, следовательно, предусматривается интеграция нуклеиновой кислоты, например, в геном хлоропласта. Используемый в данном документе термин “стабильная трансформация” также может относиться к трансгену, который поддерживается внехромосомно, например, в виде минихромосомы.

Используемый в данном документе термин “пакетирование” генов или признаков представляет собой комбинирование требуемых генов или признаков в одной линии трансгенных растений. В качестве одного подхода растениеводы осуществляют “пакетирование” трансгенных признаков с помощью скрещиваний между родителями, каждый из которых имеет необходимый признак, а затем идентификации потомства, которое имеет оба из этих требуемых признаков (так называемые “селекционные гибриды”). Другим способом “пакетирования” генов

является перенос двух или более генов в ядро клетки растения одновременно во время трансформации. Еще одним способом “пакетирования” генов является повторная трансформация трансгенного растения с помощью другого представляющего интерес гена. Например, “пакетирование” генов можно применять для комбинирования двух различных признаков устойчивости к насекомым, признака устойчивости к насекомым и признака устойчивости к заболеванию или признака устойчивости к гербициду (такого как, например, Bt11). Применение селективируемого маркера, в дополнение к представляющему интерес гену, также следует рассматривать как “пакетирование” генов.

10 “Синтетическая” относится к нуклеотидной последовательности, содержащей основания или структурный(-е) признак(-и), отсутствующие в природной последовательности. Например, синтетической считается искусственная последовательность, кодирующая белок по настоящему изобретению, которая по содержанию G+C и нормальному распределению кодонов больше похожа на гены двудольных или однодольных растений.

Для используемого в данном документе белка по настоящему изобретению, который является “токсичным” для насекомого-вредителя, подразумевается, что белок действует в качестве активного при пероральном поглощении средства для контроля насекомых для уничтожения насекомого-вредителя, или белок способен нарушать или ограничивать питание насекомых, или вызывать подавление роста насекомого-вредителя, причем каждое из них может вызвать или не вызвать гибель насекомого. Когда токсичный белок по настоящему изобретению доставляется в организм насекомого или насекомое приводится в контакт с токсичным белком при пероральном поглощении, как правило, результатом является гибель насекомого, или замедление роста насекомого, или насекомое прекращает питаться на источнике, который делает токсичный белок доступным для насекомого.

30 Термины “токсиновый фрагмент” и “токсиновая часть” используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения фрагмента или части более длинного (например, полноразмерного) инсектицидного белка по настоящему изобретению, при этом “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” сохраняет инсектицидную активность. Например, в данной области техники известно, что нативные белки Cту экспрессируются в виде протоксинов, которые подвергаются процессингу на N-терминальном и C-терминальном концах с образованием зрелого токсина. В вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” химерного

инсектицидного белка по настоящему изобретению усечены на N-конце и/или С-конце. В вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” усечены на N-конце с удалением части или всего N-концевого пептидильного фрагмента и необязательно содержат по меньшей мере приблизительно 400, 425, 450, 475, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580 или 590 смежных аминокислот инсектицидного белка, конкретно описанного в данном документе, или аминокислотной последовательности, которая по сути идентична ему. Таким образом, в вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” инсектицидного белка усечена на N-конце (например, для исключения части или всего пептидильного фрагмента), например, N-концевое усечение одной аминокислоты или более одной аминокислоты, например, вплоть до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или более аминокислот. В вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” инсектицидного белка усечена на С-конце (например, для исключения части или всего протоксинового хвоста), например, С-концевое усечение одной аминокислоты или более одной аминокислоты, например, вплоть до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 560 или более аминокислот. В вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” включают домены 1 и 2 и коровый домен 3. В вариантах осуществления “токсиновый фрагмент” или “токсиновая часть” представляют собой зрелый (т. е. подвергнутый процессингу) токсин (например, токсин Сгу).

“Трансформация” представляет собой процесс введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина или организм-хозяина. В конкретных вариантах осуществления “трансформация” означает стабильную интеграцию молекулы ДНК в геном (ядерный или пластидный) представляющего интерес организма. В некоторых конкретных вариантах осуществления введение в растение, часть растения и/или растительную клетку осуществляется путем трансформации, опосредованной бактериями, трансформации путем бомбардировки частицами, трансформации, опосредованной фосфатом кальция, трансформации, опосредованной циклодекстринами, электропорации, трансформации, опосредованной липосомами, трансформации, опосредованной наночастицами, трансформации, опосредованной

полимерами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вискерами, микроинъекции, обработки ультразвуком, инфильтрации, трансформации, опосредованной полиэтиленгликолем, трансформации протопласта или любого другого электрического, химического, физического и/или биологического механизма, который приводит к введению нуклеиновой кислоты в растение, часть растения и/или его клетку, или их комбинации. Процедуры для трансформирования растений хорошо известны и общеприняты в данной области техники и подробно описаны в литературе. Неограничивающие примеры способов трансформации растений включают трансформацию с помощью доставки нуклеиновых кислот, опосредованной бактериями (например, с помощью бактерий из рода *Agrobacterium*), доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной карбидом кремния или вискерами с нуклеиновыми кислотами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной липосомами, микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную циклодекстринами, электропорацию, трансформацию, опосредованную наночастицами, обработку ультразвуком, инфильтрацию, поглощение нуклеиновых кислот, опосредованное PEG, а также любой другой электрический, химический, физический (механический) и/или биологический механизм, который приводит к введению нуклеиновой кислоты в растительную клетку, включая любую их комбинацию. Общие руководства по разнообразным способам трансформации растений, известным в данной области техники, включают Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 67-88) и Rakowoczy-Trojanowska (2002, *Cell Mol Biol Lett* 7:849-858 (2002)).

"Трансформированный" и "трансгенный" относится к организму-хозяину, такому как бактерия или растение, в который была введена гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты. Молекула нуклеиновой кислоты может быть стабильно интегрирована в геном хозяина, или же молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в виде внехромосомной молекулы. Такая внехромосомная молекула может быть автореплицирующейся. Подразумевается, что трансформированные клетки, ткани или растения охватывают не только конечный продукт процесса трансформации, но также и его трансгенного потомка. Термины "нетрансформированный", "нетрансгенный" или "нерекомбинантный" хозяин

относятся к организму дикого типа, например, бактерии или растению, не содержащим гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты.

5 Термин “трансгенное растение” включает ссылку на растение, в которое была введена гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты. В основном гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты является стабильно интегрированной в геном, так что последовательность нуклеиновой кислоты передается последующим поколениям. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может быть интегрирована в геном отдельно или как часть рекомбинантной кассеты экспрессии. Термин “трансгенный”, используемый в данном документе, включает любую клетку, 10 линию клеток, каллусную ткань, часть растения или растение, генотип которого был изменен за счет присутствия гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, включая такие трансгенные объекты, которые исходно изменены таким образом, а также такие, которые созданы путем половых скрещиваний или бесполого размножения из исходного трансгенного объекта.

15 Термин “вектор” относится к композиции для переноса, доставки или введения нуклеиновой кислоты (или нуклеиновых кислот) в клетку. Вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную(-ые) последовательность(-и), подлежащую(-ие) переносу, доставке или введению. Примеры векторов включают плазмидный, космидный, фагмидный вектор, вектор на основе искусственной 20 хромосомы, фаговый или вирусный вектор.

Термин “урожайность” может включать ссылку на количество бушелей на акр зерновой культуры при уборке урожая с поправкой на влажность зерна (например, для кукурузы, как правило, 15%) и объем образованной биомассы (для кормовых культур, таких как люцерна, и размер корней растения для культур, дающих несколько урожаев 25 в год). Влажность зерна измеряют у зерновой культуры при уборке.

Скорректированный натуральный вес зерна определяют как вес в фунтах на бушель с поправкой на уровень влажности зерна при уборке урожая. Биомассу измеряют как вес полученного растительного материала, который можно собрать. На урожайность могут 30 влиять многие свойства, включая без ограничения высоту растения, число стручков, положение стручка на растении, число междоузлий, частоту растрескивания стручков, размер зерна, эффективность образования клубеньков и фиксации азота, эффективность ассимиляции питательных веществ, ассимиляции углерода, трехмерную структуру растения, процент прорастания семян, мощность проростков и ювенильные признаки. На урожайность также может влиять эффективность прорастания (включая

прорастание в стрессовых условиях), скорость роста (включая скорость роста в стрессовых условиях), число початков, число семян на початок, размер семени, состав семени (крахмал, масло, белок) и характеристики налива зерна. Урожайность растения может быть измерена с помощью ряда способов, включая определение натурального веса, числа семян на растение, веса семян, числа семян на единицу площади (т. е. семена, или вес семян, на акр), бушелей на акр, тонн на акр или килограмм на гектар. Например, урожайность кукурузы может быть измерена как продукция обмолоченных кукурузных зерен на единицу производственной площади, например, в бушелях на акр или метрических тоннах на гектар, часто указываемая с поправкой на влажность, например, при 15,5 процента влажности. Более того, бушель кукурузы определяется по закону штата Айова как 56 фунтов по весу, при этом приемлемый коэффициент перевода для урожая кукурузы такой: 100 бушелей на акр эквивалентно 6,272 метрическим тоннам на гектар. В данной области техники широко применяются другие измерения урожайности. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения урожайность можно повышать в условиях стресса и/или в условиях отсутствия стресса.

#### Молекулы нуклеиновой кислоты

В настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для контроля опасных вредителей растений. В частности, настоящим изобретением предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, которая при экспрессии в клетке придает клетке инсектицидные свойства, например, инсектицидную активность в отношении вредителей, относящихся к чешуекрылым, таким как *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка).

Для определения эффективности и агрономического воздействия экспрессированного(-ых) белка(-ов) в контексте различных кассет экспрессии получали несколько различных конструкций. Удивительно, что один вектор с последовательностью под SEQ ID NO: 2 при введении путем трансформации в растения маиса обеспечивал превосходные инсектицидные свойства без каких-либо отрицательных эффектов на вегетативное развитие или фертильность трансгенного растения или с минимальными эффектами. Последовательность кассеты экспрессии из вектора представлена под SEQ ID NO: 1.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что во время вставки молекулы нуклеиновой кислоты, такой как последовательность под SEQ ID NO: 1, в

клетку 5'- и/или 3'-концы вставленной молекулы могут удаляться или перестраиваться. Такие делеции или перестройки могут не влиять на функцию вставленной молекулы, и эти относительно небольшие изменения приводят к тому, что вставленная молекула может считаться по сути идентичной последовательности под SEQ ID NO: 1.

- 5 Специалисту в данной области техники также будет понятно, что молекула нуклеиновой кислоты, например, содержащая последовательность под SEQ ID NO: 1, может подвергаться полной или частичной перестройке или дупликации во время события вставки, так что вставленная молекула представляет собой полную или частичную перестройку или дупликацию исходной молекулы нуклеиновой кислоты.
- 10 Специалисту в данной области техники будет понятно, что эта вставленная молекула может по-прежнему обладать теми же характеристиками и/или признаками, что и исходная молекула, так что вставленная молекула по сути идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, и трансформированная клетка или полученное трансформированное растение все еще может оставаться желательным.

- 15 Специалисту в данной области техники будет понятно, что в случае трансгена для коммерческого применения, такого как молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность под SEQ ID NO: 1, для соответствия требованиям государственных регулятивных норм могут допускаться относительно незначительные модификации в последовательности нуклеиновой кислоты. Такие модификации не
- 20 должны влиять на функцию полученной молекулы, которая будет по сути идентичной последовательности под SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что молекула модифицированной нуклеиновой кислоты будет фактически такой же, как и исходная молекула.

- Следовательно, настоящее изобретение также охватывает молекулу
- 25 нуклеиновой кислоты, по сути идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1, где определенные нуклеотиды из последовательности под SEQ ID NO: 1 удалены, заменены или перестроены с получением мутантной последовательности под SEQ ID NO:1, и где функциональность мутантной последовательности под SEQ ID NO:1 является такой же, как и у исходной молекулы. Соответственно, в
- 30 некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 (например, по меньшей мере 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 91% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 92%

идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 93% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 94% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 96% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 97% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 98% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1, по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере 99,5% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1) или комплементарной ей последовательности.

5 В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты кодирует тот же белок(белки), который(-е) кодируется(-ются) последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты приводит к получению белка(-ов), который(-ые) обладает/обладают инсектицидным действием в отношении одного или нескольких вредителей, относящихся к чешуекрылым, например, инсектицидным по меньшей мере в отношении *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты приводит к получению белка(-ов), который(-ые) является/являются инсектицидным в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты является выделенной. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты присутствует в растении.

10 15 20 25

30 Раскрытый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(-и), кодируемый(-ые) молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (например, последовательностью под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любым одним или несколькими из вариантов, представленных в таблице 3), характеризуются инсектицидной активностью в отношении вредителей, относящихся к чешуекрылым. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) характеризуется/характеризуются активностью в отношении одного или нескольких из следующих неограничивающих примеров вредителя, относящегося к чешуекрылым: *Spodoptera* spp., таких как

*S. frugiperda* (кукурузная листовая совка), *S. littoralis* (египетская хлопковая совка),  
*S. ornithogalli* (желто-полосатая совка), *S. praeifica* (западная желто-полосатая совка),  
*S. eridania* (южная совка), *S. litura* (табачная совка/азиатская хлопковая совка),  
*S. cosmioides* (черная совка), *S. exempta* (африканская совка), *S. mauritia* (луговая совка)  
5 и/или *S. exigua* (свекольная совка); *Ostrinia* spp., таких как *O. nubilalis* (огневка  
кукурузная) и/или *O. furnacalis* (азиатский кукурузный мотылек); *Plutella* spp., таких  
как *P. xylostella* (капустная моль); *Agrotis* spp., таких как *A. ipsilon* (совка-ипсилон),  
*A. segetum* (совка озимая), *A. gladiaria* (глиняная совка) и/или *A. orthogonia* (совка  
прямоугольная); *Striacosta* spp., таких как *S. albicosta* (западная бобовая совка);  
10 *Helicoverpa* spp., таких как *H. zea* (совка кукурузная/американская кукурузная совка),  
*H. punctigera* (австралийская совка) и/или *H. armigera* (совка хлопковая); *Heliothis* spp.,  
таких как *H. virescens* (табачная листовертка); *Diatraea* spp., таких как *D. grandiosella*  
(огневка кукурузная юго-западная) и/или *D. saccharalis* (тростниковая огневка);  
*Trichoplusia* spp., таких как *T. ni* (совка ни); *Sesamia* spp., таких как *S. nonagroides*  
15 (мотылек кукурузный средиземноморский), *S. inferens* (розовая стеблевая совка) и/или  
*S. calamistis* (розовая стеблевая совка); *Pectinophora* spp., таких как *P. gossypiella*  
(хлопковая моль); *Cochylis* spp., таких как *C. hospes* (полосатая подсолнечная моль);  
*Manduca* spp., таких как *M. sexta* (табачный бражник) и/или *M. quinquemaculata*  
(томатный бражник); *Elasmopalpus* spp., таких как *E. lignosellus* (огневка кукурузная  
20 стеблевая малая); *Pseudoplusia* spp., таких как *P. includens* (соевая совка); *Anticarsia*  
spp., таких как *A. gemmatalis* (совка бархатных бобов); *Plathypena* spp., таких как  
*P. scabra* (совка клеверная); *Pieris* spp., таких как *P. brassicae* (белянка капустная),  
*Paraipeta* spp., таких как *P. nebris* (стеблевой мотылек обыкновенный); *Pseudaletia*  
spp., таких как *P. unipuncta* (луговая совка); *Peridroma* spp., таких как *P. saucia* (пестрая  
25 совка); *Keiferia* spp., таких как *K. lycopersicella* (томатная острица); *Artogeia* spp., таких  
как *A. rapae* (белянка репная); *Phthorimaea* spp., таких как *P. operculella* (картофельная  
моль); *Chrysodeixis* spp., таких как *C. includens* (золотистая двупятнистая совка); *Feltia*  
spp., таких как *F. ducens* (тусклая совка); *Chilo* spp., таких как *C. suppressalis* (огневка  
желтая рисовая), *C. agamemnon* (восточная кукурузная огневка) и *C. partellus*  
30 (крапчатая стеблевая моль), *Snaphalocrocis* spp., таких как *C. medinalis* (огневка  
рисовая), *Conogethes* spp., таких как *C. punctiferalis* (желтая персиковая моль), *Mythimna*  
spp., таких как *M. separata* (совка восточная луговая), *Athetis* spp., таких как *A. lepigone*  
(чайная совка), *Busseola* spp., таких как *B. fusca* (африканский кукурузный стеблевой  
сверлильщик), *Etiella* spp., таких как *E. zinckenella* (огневка акациевая), *Leguminivora*

*spp.*, таких как *L. glycinivorella* (плодожорка соевая), *Matsumuraeses spp.*, таких как *M. phaseoli* (плодожорка адзуки), *Omiodes spp.*, таких как *O. indicata* (соевый мотылек/паутинная гусеница бобовых листьев), *Rachiplusia spp.*, таких как *R. ni* (подсолнечниковая совка), или любой комбинации вышеуказанного. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из инсектицидных белков, кодируемых молекулой нуклеиновой кислоты, характеризуется инсектицидной активностью в отношении кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из инсектицидных белков, кодируемых молекулой нуклеиновой кислоты, характеризуется инсектицидной активностью в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) может необязательно характеризоваться инсектицидной активностью в отношении насекомого-вредителя или колонии кукурузной листовой совки, которая характеризуется устойчивостью к другому инсектицидному средству, в том числе другому инсектицидному белку (такому как, например, белок *Bt*). В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) характеризуется/характеризуются инсектицидной активностью в отношении колонии кукурузной листовой совки, которая устойчива к белку *Vip3A* (например, *Vip3Aa*, включая без ограничения объект маиса MIR162), белку *Cry1F* (например, *Cry1Fa*, включая без ограничения объект маиса TC1507 или DP-4114), белку *Cry1A* (например, *Cry1A.105*, включая без ограничения объект маиса MON89034) или белку *Cry2* (например, *Cry2Ab*, включая без ограничения объект маиса MON89034).

25           Раскрытый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(белки) может также характеризоваться инсектицидной активностью в отношении жесткокрылых, полужесткокрылых, двукрылых, *Lygus spp.* и/или других колющих и сосущих насекомых, например, из отряда Orthoptera или Thysanoptera. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые) белок(белки) характеризуется/характеризуются активностью в отношении одного или нескольких из следующих неограничивающих примеров вредителя, относящегося к жесткокрылым: *Diabrotica spp.*, таких как *D. barberi* (северный кукурузный жук), *D. virgifera virgifera* (западный кукурузный жук), *D. undecimpunctata howardii* (южный кукурузный жук), *D. balteata* (жук огуречный полосатый), *D. undecimpunctata undecimpunctata* (западный пятнистый

огуречный жук), *D. significata* (3-точечный листоед), *D. speciosa* (жук тыквенный),  
*D. virgifera zeaе* (мексиканский кукурузный жук), *D. beniensis*, *D. cristata*,  
*D. curviplustalata*, *D. dissimilis*, *D. elegantula*, *D. emorsitans*, *D. graminea*, *D. hispanloe*,  
*D. lemniscata*, *D. linsleyi*, *D. milleri*, *D. nummularis*, *D. occlusal*, *D. porrecea*, *D. scutellata*,  
5 *D. tibialis*, *D. trifasciata* и/или *D. viridula*; *Leptinotarsa* spp., таких как *L. decemlineata*  
(колорадский жук); *Chrysomela* spp., таких как *C. scripta* (листоед тополевый);  
*Hypothenemus* spp., таких как *H. hampei* (жук кофейный); *Sitophilus* spp., таких как  
*S. zeamais* (кукурузный долгоносик); *Epitrix* spp., таких как *E. hirtipennis* (табачный  
жук-блошка) и/или *E. cucumeris* (картофельный жук-блошка); *Phyllotreta* spp., таких как  
10 *P. cruciferae* (блошка крестоцветная) и/или *P. pusilla* (западная черная блошка);  
*Anthonomus* spp., таких как *A. eugeniі* (перечный долгоносик); *Hemicrepidus* spp., таких  
как *H. memnonius* (проволочники); *Melanotus* spp., таких как *M. communis*  
(американский многоядный щелкун); *Ceutorhynchus* spp., таких как *C. assimilis*  
(рапсовый семенной скрытнохоботник); *Phyllotreta* spp., таких как *P. cruciferae* (блошка  
15 крестоцветная); *Aeolus* spp., таких как *A. mellillus* (проволочник); *Aeolus* spp., таких как  
*A. manicus* (пшеничный проволочник); *Horistonotus* spp., таких как *H. uhlerii* (песчаный  
проволочник); *Sphenophorus* spp., таких как *S. maidis* (долгоносик кукурузный), *S. zeaе*  
(долгоносик тимофеечный), *S. parvulus* (мятликовый долгоносик) и *S. callosus*  
(долгоносик клубеньковый эспарцетовый); *Phyllophaga* spp. (личинки хрущей);  
20 *Chaetocnema* spp., таких как *C. pulicaria* (земляная кукурузная блошка); *Popillia* spp.,  
таких как *P. japonica* (японский жук); *Epilachna* spp., таких как *E. varivestis*  
(мексиканский бобовый жук); *Cerotoma* spp., таких как *C. trifurcate* (бобовый листоед);  
*Epicauta* spp., таких как *E. pestifera* и *E. lemniscata* (нарывники); или любой комбинации  
вышеуказанного. К насекомым отряда Hemiptera относятся без ограничения *Chinavia*  
25 *hilaris* (щитник зеленый древесный); *Anasa tristis* De Geer (кабачковый клоп); *Blissus*  
*leucopterus* (пшеничный клоп); *Corythuca gossypii* Fabricius (хлопковый клоп);  
*Cyrtopeltis modesta* Distant (клоп томатный); *Dysdercus suturellus* Hernch-Schaffer  
(хлопковый красноклоп); *Euschistus servus* Say (коричневый клоп-щитник);  
*E. variolarius* Palisot de Beauvois (коричнево-мраморный клоп); *Graptostethus* spp.  
30 (группа земляных клопов); *Leptoglossus corculus* Say (сосновый семенной клоп-  
краевик); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клоп-слепняк полевой); *L. hesperus* Knight  
(западный клоп-слепняк травяной); *L. pratensis* Linnaeus (клопик луговой);  
*L. rugulipennis* Poppius (клопик опушенный); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зеленый  
яблонный клоп); *Nezara viridula* Linnaeus (незара зеленая); *Oebalus pugnax* Fabricius

(клоп-щитник рисовый); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (молочайный клоп); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый), *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблочный северный); *Cyrtopeltis modestus* Distant (клоп томатный); *Cyrtopeltis notatus* Distant (слепняк); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (слепняк белоточечный); *Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп-слепняк гледичии); *Labopidicola allii* Knight (слепняк луковый); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп быстрый); *Poecilocapsus lineatus* Fabricius (клоп-слепняк четырехполосный); *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (ложная черепашка); *Nezara viridula* Linnaeus (незара зеленая); *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blostomatidae* spp.; *Reduviidae* spp. и *Cimicidae* spp. К насекомым отряда Diptera относятся без ограничения *Liriomyza* spp. такие как *L. trifolii* (клеверный минер) и *L. sativae* (овощной листовой минер); *Scrobipalpula* spp. такие как *S. absoluta* (томатная минирующая моль); *Delia* spp. такие как *D. platura* (ростковая муха), *D. brassicae* (муха малая весенняя) и *D. radicum* (муха капустная весенняя); *Psilia* spp. такие как *P. rosae* (морковная муха); *Tetanops* spp. такие как *T. myopaeformis* (Корневая свекловичная муха); и любая комбинация вышеуказанного. Насекомые в отряде Orthoptera включают без ограничения *Melanoplus* spp., такие как *M. differentialis* (кобылка отличительная), *M. femurrubrum* (кобылка красноногая), *M. bivittatus* (кобылка двухполосая); и любую их комбинацию. Насекомые в отряде Thysanoptera включают без ограничения *Frankliniella* spp., такие как *F. occidentalis* (западный цветочный трипс) и *F. fusca* (американский табачный трипс); и *Thrips* spp., такие как *T. tabaci* (табачный трипс), *T. palmi* (трипс Пальми); и любую комбинацию вышеуказанного.

Раскрытый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(белки) также может(-гут) характеризоваться инсектицидной активностью в отношении любого одного или нескольких из следующего: *Phyllophaga* spp., *Rhopalosiphum maidis*, *Pratylenchus penetrans*, *Melanotus cribulosus*, *Cyclocephala lurida*, *Limonius californicus*, *Tetranychus urticae*, *Haplothrips aculeatus*, *Tetranychus truncates*, *Anomala corpulenta*, *Oedaleus infernalis*, *Frankliniella tenuicornis*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Aiolopus thalassinus tamulus*, *Trachea tokionis*, *Laodelphax striatellus*, *Holotrichia oblita*, *Dichelops furcatus*, *Diloboderus abderu*, *Dalbulus maidis*, *Astylus variegathus*, *Scaptocoris castanea*, *Locusta migratoria manilensis*, *Agriotes lineatus*, *Peregrinus maidis*, *Oscinella frit*, *Frankliniella williamsi*, *Zyginidia manaliensis*, *Atherigona soccata*, *Nicentrites testaceipes*, *Myllocerus undecimpustulatus*, *Atherigona naquii*, *Amsecta albistriga*, *Plodia interpuctella*, *Melanotus*

*caudex*, *Microtermes* spp., *Atherigona oryzae*, *Tanymecus dilaticollis*, *Delphacodes kuschelli*, *Lepidiota stigma*, *Phyllophaga hellery*, *Tribolium castaneum*, *Pelopidas mathias*, *Oxya chinensis* (Thunberg), *Stenocranus pacificus*, *Scutigerella immaculata*, *Chrysodeixis chalcites*, *Euproctis* sp. (*Lymantriidae*), *Phyllotreta* spp. (*undulata*), *Reptalus panzer*,  
 5 *Cyrtacanthacris tartarica* Linnaeus, *Orgyia postica*, *Dactylispa lameyi*, *Patanga succincta* Johanson, *Tetranychus* spp., *Calomycterus* sp., *Adoretus compressus* Weber, и *Paratetranychus stickney*.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены векторы, которые содержат молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.  
 10 Примеры вектора включает плазмидный, космидный, фагмидный вектор, вектор на основе искусственной хромосомы, фаговый или вирусный вектор. В вариантах осуществления вектор представляет собой растительный вектор, например, для применения при трансформации растений. В вариантах осуществления вектор представляет собой бактериальный вектор, например, для применения при  
 15 трансформации бактерий. Подходящие векторы для растений, бактерий и других организмов известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению также может включать последовательности, которые кодируют другие требуемые признаки в дополнение к инсектицидному(-ым)  
 20 белку(-ам). Такие кассеты экспрессии, содержащие пакетированные признаки, можно применять для создания растений, частей растений или растительных клеток, характеризующихся требуемым фенотипом с пакетированными признаками (т. е. молекулярное пакетирование). Такие пакетированные комбинации в растениях также можно создавать с помощью других способов, включая без ограничения кроссбридинг  
 25 растений с помощью любой традиционной методики. При "пакетировании" путем генетической трансформации растений представляющие интерес нуклеотидные последовательности можно комбинировать в любой момент времени и в любом порядке. Например, трансгенное растение, характеризующееся одним или несколькими требуемыми признаками, можно применять в качестве мишени для введения  
 30 дополнительных признаков посредством последующей трансформации. Дополнительные нуклеотидные последовательности могут быть введены одновременно в протоколе совместной трансформации с молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по настоящему изобретению. Например, если будут вводить две нуклеотидные последовательности, то их можно встроить в отдельные кассеты (транс-

положение), или их можно встроить в одну кассету (цис-положение). Экспрессия полинуклеотидов может управляться одним и тем же промотором или различными промоторами. Кроме того, общеизвестно, что полинуклеотиды можно “пакетировать” в требуемом местоположении генома с применением сайт-специфической нуклеазы или системы рекомбинации (например, FRT/Flp, Cre/Lox, TALE-эндонуклеаз, нуклеаз с цинковыми пальцами, CRISPR/Cas и родственных технологий). См., патенты США №№ US7214536, US8921332, US8765448, US5527695, US5744336, US5910415, US6110736, US6175058, US6720475, US6455315, US6458594 и публикации заявок на патент США №№ US2019093090, US2019264218, US2018327785, US2017240911, US2016208272, US2019062765.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению могут включать дополнительную кодирующую последовательность для одного или нескольких полипептидов или молекул двухнитевой РНК (dsRNA), представляющих интерес в отношении агрономических признаков, которые преимущественно приносят пользу производителю семян, сельхозпроизводителю или переработчику зерна. Представляющий интерес полипептид может быть любым полипептидом, кодируемым представляющей интерес нуклеотидной последовательностью. Неограничивающие примеры представляющих интерес полипептидов, которые подходят для продуцирования в растениях, включают полипептиды, приводящие к важным с агрономической точки зрения признакам, таким как устойчивость к гербицидам (также иногда называется “толерантностью к гербицидам”), устойчивость к вирусам, устойчивость к патогенным бактериям, устойчивость к насекомым, устойчивость к нематодам или устойчивость к грибам. См., например, патенты США №№ 5569823; 5304730; 5495071; 6329504 и 6337431.

Полипептид также может представлять собой полипептид, который увеличивает мощность или урожайность растения (включая признаки, которые дают возможность растению произрастать при различных температурах, почвенных условиях и уровнях солнечного света и атмосферных осадков), или полипептид, который дает возможность идентифицировать растение, проявляющее представляющий интерес признак (например, селектируемый маркер, цвет семенной оболочки и т. д.). Разнообразные представляющие интерес полипептиды, а также способы введения этих полипептидов в растение описаны, например, в патентах США №№ 4761373; 4769061; 4810648; 4940835; 4975374; 5013659; 5162602; 5276268; 5304730; 5495071; 5554798; 5561236;

5569823; 5767366; 5879903, 5928937; 6084155; 6329504 и 6337431; а также в публикации заявки на патент США № 2001/0016956.

В некоторых вариантах осуществления также можно применять полинуклеотиды, придающие устойчивость/толерантность к гербициду, ингибирующему конус нарастания или меристему, такому как имидазолинон или сульфонилмочевина. Иллюстративные полинуклеотиды из этой категории кодируют мутантные ферменты ALS и AHAS, которые описаны, например, в патентах США №№ 5767366 и 5928937. Патенты США №№ 4761373 и 5013659 относятся к растениям, устойчивым к различным имидазолиноновым или сульфонамидным гербицидам. Патент США № 4975374 относится к растительным клеткам и растениям, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантную глутаминсинтетазу (GS), устойчивую к ингибированию гербицидами, которые, как известно, ингибируют GS, например, фосфинотрицин и метионинсульфоксимин. В патенте США № 5162602 раскрыты растения, устойчивые к ингибированию гербицидами на основе циклогександиона и арилоксифеноксипропановой кислоты. Устойчивость придает измененная ацетил-коэнзим А-карбоксилаза (АССаза).

Полипептиды, кодируемые нуклеотидными последовательностями, придающими устойчивость к глифосату, также подходят для настоящего изобретения. См., например, патент США № 4940835 и патент США № 4769061. В патенте США № 5554798 раскрыты трансгенные растения маиса, устойчивые к глифосату, устойчивость которым придает ген измененной 5-енолпирувил-3-фосфошикиматсинтазы (EPSP).

Также подходят полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к фосфоновым соединениям, таким как глюфосинат аммония или фосфинотрицин, а также пиридинокси- или феноксипропионовым кислотам и циклогексанонам. См. европейскую патентную заявку № 0242246. См. также патенты США №№ 5879903, 5276268 и 5561236.

Другие подходящие полинуклеотиды включают полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к гербицидам, ингибирующим фотосинтез, таким как триазин и бензонитрил (ген нитрилазы). См. патент США № 4810648. Дополнительные подходящие полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к гербицидам, включают полинуклеотиды, кодирующие устойчивость к 2,2-дихлорпропионовой кислоте, сетоксидиму, галоксифопу, имидазолиноновым гербицидам, сульфонилмочевинным гербицидам, триазолопиримидиновым гербицидам, s-триазиновым гербицидам и

бромоксилилу. Также подходят полинуклеотиды, придающие устойчивость к ингибиторам фермента *protox*, или которые обеспечивают повышенную устойчивость к заболеваниям растений; повышенную толерантность к неблагоприятным условиям окружающей среды (видам абиотического стресса), в том числе без ограничения к засухе, чрезмерному охлаждению, чрезмерному нагреву, или чрезмерной засоленности почвы, или экстремальной кислотности или щелочности; и изменения строения или развития растений, в том числе изменения сроков развития. См., например, публикацию заявки на патент США № 2001/0016956 и патент США № 6084155.

Дополнительные подходящие полинуклеотиды включают полинуклеотиды, кодирующие инсектицидные полипептиды. Эти полипептиды могут быть получены в количествах, достаточных для контроля, например, насекомых-вредителей (т. е. в количествах, обеспечивающих контроль насекомых). Считается, что количество продуцируемого в растении инсектицидного полипептида, необходимое для контроля насекомых или других вредителей, может варьироваться в зависимости от сорта, типа вредителя, факторов окружающей среды и т. п. Полинуклеотиды, применимые для придания дополнительной устойчивости к насекомым или вредителям, включают, например, полинуклеотиды, кодирующие токсины, идентифицированные в организмах *Bacillus*. Были клонированы полинуклеотиды, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие белки *Cry Bacillus thuringiensis* (*Bt*) из нескольких подвидов, и было обнаружено, что рекомбинантные клоны токсичны для личинок насекомых, относящихся к чешуекрылым, двукрылым и/или жесткокрылым. Примеры таких инсектицидных белков *Bt* включают белки *Cry*, такие как *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D*, *Cry1Ea*, *Cry1Fa*, *Cry3A*, *Cry9A*, *Cry9B*, *Cry9C* и т. п., а также вегетативные инсектицидные белки, такие как *Vip1*, *Vip2*, *Vip3* и т. п. Полный перечень белков *Bt* можно найти во всемирной сети Интернет в базе данных номенклатуры токсинов *Bacillus thuringiensis*, поддерживаемой университетом Сассекса (см. также *Strickmore et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:807-813*).

В вариантах осуществления дополнительный полипептид представляет собой инсектицидный полипептид, полученный из источника, отличного от *Bt*, включая без ограничения альфа-амилазу, пероксидазу, холестериноксидазу, пататин, протеазу, ингибитор протеазы, уреазу, ингибитор альфа-амилазы, порообразующий белок, хитиназу, лектин, сконструированное антитело или фрагмент антитела, инсектицидный белок *Bacillus cereus*, инсектицидный белок *Xenorhabdus* spp. (такого как *X. nematophila* или *X. bovienii*), инсектицидный белок *Photorhabdus* spp. (такого как *P. luminescens* или

*P. asymbiotica*), инсектицидный белок *Brevibacillus* spp. (такого как *B. laterosporous*), инсектицидный белок *Lysinibacillus* spp. (такого как *L. sphaericus*), инсектицидный белок *Chromobacterium* spp. (такого как *C. subtsugae* или *C. piscinae*), инсектицидный белок *Yersinia* spp. (такого как *Y. entomophaga*), инсектицидный белок *Paenibacillus* spp. (такого как *P. propylaea*), инсектицидный белок *Clostridium* spp. (такого как *C. bifermentans*), *Pseudomonas* spp. (такого как *P. fluorescens*) и лигнин.

Полипептиды, подходящие для продуцирования в растениях, дополнительно включают такие полипептиды, которые улучшают превращение собранных растений или частей растений в коммерчески применимый продукт или иным образом содействуют ему, включая, например, увеличенное или измененное содержание или распределение углеводов, улучшенные свойства сбраживаемости, повышенное содержание масла, повышенное содержание белка, улучшенную усвояемость или повышенное содержание нутрицевтиков, например, повышенное содержание фитостерола, повышенное содержание токоферола, повышенное содержание станола или повышенное содержание витаминов. Представляющие интерес полипептиды также включают, например, полипептиды, приводящие к снижению содержания нежелательного компонента в собранном урожае, например, фитиновой кислоты или расщепляющих сахара ферментов, или способствующие этому. Под “приводящим” или “способствующим” подразумевается, что представляющий интерес полипептид может прямо или опосредованно способствовать присутствию представляющего интерес признака (например, увеличение расщепления целлюлозы при применении гетерологичного фермента целлюлазы).

В некоторых вариантах осуществления полипептид способствует улучшению усвояемости еды или корма. Ксиланазы представляют собой ферменты, расщепляющие гемицеллюлозу, которые усиливают разрушение клеточных стенок растений, что приводит к улучшенному использованию питательных веществ растения животным. Это приводит к увеличению темпов роста и конверсии корма. Также может снижаться вязкость кормов, содержащих ксилан. Гетерологичное продуцирование ксиланаз в растительных клетках также может облегчать превращение лигноцеллюлозы в сбраживаемые сахара при промышленной переработке.

Многочисленные ксиланазы из грибных и бактериальных микроорганизмов были идентифицированы и охарактеризованы (см., например, патент США № 5437992; Coughlin et al. (1993) “Proceedings of the Second TRICEL Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases” Espoo; Souminen and Reinikainen, eds. (1993)

Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 8:125-135; публикацию патента США № 2005/0208178 и публикацию согласно PCT WO 03/16654). В частности, три специфичные ксиланазы (XYL-I, XYL-II и XYL-III) были идентифицированы у *T. reesei* (Tenkanen et al. (1992) Enzyme Microb. Technol. 14:566; 5 Torrönen et al. (1992) Bio/Technology 10:1461; и Xu et al. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:718).

В других вариантах осуществления полипептид, применимый в случае настоящего изобретения, может представлять собой расщепляющий полисахариды фермент. Растения по настоящему изобретению, продуцирующие такой фермент, могут 10 быть применимы для получения, например, сбраживаемого сырья для биологической переработки. В некоторых вариантах осуществления ферменты, применимые для процесса сбраживания, включают альфа-амилазы, протеазы, пуллулазы, изоамилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, ксиланазы, циклодекстрингликозилтрансферазы, липазы, фитазы, лакказы, оксидазы, эстеразы, кутиназы, фермент, гидролизующий 15 гранулированный крахмал, и другие глюкоамилазы.

Расщепляющие полисахариды ферменты включают расщепляющие крахмал ферменты такие как  $\alpha$ -амилазы (ЕС 3.2.1.1), глюкуронидазы (Е.С. 3.2.1.131); экзо-1,4- $\alpha$ -D-глюканазы, такие как амилоглюкозидазы и глюкоамилаза (ЕС 3.2.1.3),  $\beta$ -амилазы (ЕС 3.2.1.2),  $\alpha$ -глюкозидазы (ЕС 3.2.1.20) и другие экзоамилазы; крахмал-деветвящие 20 ферменты, такие как а) изоамилаза (ЕС 3.2.1.68), пуллулаза (ЕС 3.2.1.41) и т. п.; б) целлюлазы, такие как экзо-1,4-3-целлобиогидролаза (ЕС 3.2.1.91), экзо-1,3- $\beta$ -D-глюканаза (ЕС 3.2.1.39),  $\beta$ -глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21); в) L-арабиназы, такие как эндо-1,5- $\alpha$ -L-арабиназа (ЕС 3.2.1.99),  $\alpha$ -арабинозидазы (ЕС 3.2.1.55) и т. п.; d) галактаназы, такие как эндо-1,4- $\beta$ -D-галактаназа (ЕС 3.2.1.89), эндо-1,3- $\beta$ -D-галактаназа (ЕС 25 3.2.1.90),  $\alpha$ -галактозидаза (ЕС 3.2.1.22),  $\beta$ -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) и т. п.; е) маннаназы, такие как эндо-1,4- $\beta$ -D-маннаназа (ЕС 3.2.1.78),  $\beta$ -маннозидаза (ЕС 3.2.1.25),  $\alpha$ -маннозидаза (ЕС 3.2.1.24) и т. п.; f) ксиланазы, такие как эндо-1,4- $\beta$ -ксиланаза (ЕС 3.2.1.8),  $\beta$ -D-ксилозидаза (ЕС 3.2.1.37), 1,3- $\beta$ -D-ксиланаза и т. п.; и g) другие ферменты, такие как  $\alpha$ -L-фукозидаза (ЕС 3.2.1.51),  $\alpha$ -L-рамнозидаза (ЕС 30 3.2.1.40), леваназа (ЕС 3.2.1.65), инулиназа (ЕС 3.2.1.7) и т. п. В одном варианте осуществления  $\alpha$ -амилаза представляет собой синтетическую  $\alpha$ -амилазу Amy797E, описанную в патенте США № 8093453, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Дополнительные ферменты, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, включают протеазы, такие как протеазы грибов и бактерий. Протеазы грибов включают без ограничений протеазы, полученные из *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mucor* и *Rhizopus*, как, например, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae* и *M. miehei*. В некоторых вариантах осуществления полипептиды по настоящему изобретению могут представлять собой ферменты целлобиогидролазы (СВН) (ЕС 3.2.1.91). В одном варианте осуществления фермент целлобиогидролаза может представлять собой СВН1 или СВН2.

Другие ферменты, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения гемицеллюлазы, такие как манназы и арабинофуранозидазы (ЕС 3.2.1.55); лигниназы; липазы (например, Е.С. 3.1.1.3), глюкозооксидазы, пектиназы, ксиланазы, трансглюкозидазы, альфа-1,6-глюкозидазы (например, Е.С. 3.2.1.20); эстеразы, такие как эстераза феруловой кислоты (ЕС 3.1.1.73) и ацетилксиланэстеразы (ЕС 3.1.1.72) и кутиназы (например, Е.С. 3.1.1.74).

Молекулы двухнитевой РНК, применимые в соответствии с настоящим изобретением, включают без ограничения молекулы, которые супрессируют целевые гены у насекомых. Предполагается, что используемое в данном документе словосочетание "супрессия гена" в совокупности относится к любому из хорошо известных способов снижения уровней белка, продуцируемого в результате транскрипции гена в мРНК и последующей трансляции мРНК. Также подразумевается, что супрессия гена означает снижение экспрессии белка с гена или кодирующей последовательности, в том числе посттранскрипционную супрессию гена и транскрипционную супрессию. Посттранскрипционная супрессия гена обусловлена гомологией между всей или частью мРНК, транскрибированной с гена или кодирующей последовательности, являющихся мишенями для супрессии, и соответствующей двухнитевой РНК, используемой для супрессии, и означает значимое и измеряемое снижение количества доступной мРНК, имеющейся в клетке для связывания рибосомами. Транскрибированная РНК может находиться в смысловой ориентации для осуществления так называемой косупрессии, в антисмысловой ориентации для осуществления так называемой антисмысловой супрессии, или в обеих ориентациях с образованием dsRNA для осуществления так называемой РНК-интерференции (RNAi). Транскрипционная супрессия обусловлена присутствием в клетке dsRNA, обеспечивающего супрессию гена средства, характеризующегося значительной идентичностью последовательности с промоторной последовательностью

ДНК или комплементарной ей нитью, для осуществления так называемой супрессии промотора в транс-положении. Супрессия гена может быть эффективной в отношении нативного гена растения, ассоциированного с признаком, например, для обеспечения в растениях сниженных уровней белка, кодируемого нативным геном, или повышенными или сниженными уровнями измененного метаболита. Супрессия гена также может быть эффективной в отношении целевых генов во вредителях растений, которые могут поглощать или контактировать с растительным материалом, содержащим средства для обеспечения супрессии гена, специально сконструированные для подавления или супрессии экспрессии одной или нескольких гомологичных или комплементарных последовательностей в клетках вредителя. Такие гены-мишени для супрессии могут кодировать жизненно важный белок, предполагаемая функция которого выбрана из группы, состоящей из формирования мышц, образования ювенильного гормона, регуляции ювенильного гормона, регуляции и транспорта ионов, синтеза пищеварительных ферментов, поддержания мембранного потенциала клетки, биосинтеза аминокислот, расщепления аминокислот, сперматогенеза, синтеза феромонов, восприятия феромонов, формирования антенн, формирования крыльев, формирования конечностей, развития и дифференцировки, формирования яиц, созревания личинок, образования пищеварительных ферментов, синтеза гемолимфы, поддержания постоянства состава гемолимфы, передачи нервных импульсов, клеточного деления, энергетического метаболизма, дыхания и апоптоза.

#### Трансгенные клетки, растения, части растений

В некоторых аспектах в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены трансгенные клетки, растения, части растений и т. п., содержащие молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению (например, содержащие последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3). В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены клетка-хозяин, отличная от клетки человека, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению. Трансгенная клетка-хозяин, отличная от клетки человека, может включать без ограничения растительную клетку (в том числе клетку однодольного растения и/или клетку двудольного растения), дрожжевую клетку, бактериальную клетку или клетку насекомого. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предусмотрена бактериальная клетка, выбранная из родов *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, *Pasteuria*, *Escherichia*,

*Pseudomonas, Erwinia, Serratia, Klebsiella, Salmonella, Pasteurella, Xanthomonas, Streptomyces, Rhizobium, Rhodopseudomonas, Methylophilus, Agrobacterium, Acetobacter, Lactobacillus, Arthrobacter, Azotobacter, Leuconostoc*, или *Alcaligenes*.

В некоторых вариантах осуществления трансгенная растительная клетка  
5 представляет собой клетку двудольного растения или клетку однодольного растения. В  
дополнительных вариантах осуществления клетка двудольного растения представляет  
собой клетку сои, клетку подсолнечника, клетку томата, клетку культурной  
разновидности капусты, клетку хлопчатника, клетку сахарной свеклы и клетку табака.  
В дополнительных вариантах осуществления клетка однодольного растения  
10 представляет собой клетку ячменя, клетку маиса, клетку овса, клетку риса, клетку  
сорго, клетку сахарного тростника и клетку пшеницы. В предпочтительных вариантах  
осуществления клетка однодольного растения представляет собой клетку маиса. В  
некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена  
совокупность клеток двудольного растения или клеток однодольного растения,  
15 содержащих молекулу нуклеиновой кислоты или вектор по настоящему изобретению  
(например, совокупность клеток маиса, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты  
или вектор по настоящему изобретению). В вариантах осуществления клетки в  
совокупности расположены рядом с образованием апопласта, и их выращивают при  
естественном солнечном свете. В вариантах осуществления трансгенная растительная  
20 клетка не может регенерировать в целое растение.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения молекула  
нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению экспрессируется в высшем  
организме, например, в растении. Такие трансгенные растения экспрессируют  
эффективные количества инсектицидного(-ых) белка(-ов), кодируемого(-ых) молекулой  
25 нуклеиновой кислоты, для контроля вредителей растений, таких как насекомые-  
вредители. Когда насекомое начинает питаться на таком трансгенном растении, оно  
поглощает экспрессируемый(-ые) инсектицидный(-ые) белок(белки). Это может  
сдерживать насекомое от дальнейшего вгрызания в растительную ткань или даже  
может причинять вред насекомому или уничтожать его. В некоторых вариантах  
30 осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению стабильно  
интегрирована в геном растения. В других вариантах осуществления молекула  
нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению включена в непатогенный  
самореплицирующийся вирус.

В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение является инсектицидным в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение является инсектицидным в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) вида из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька). В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами, например в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), по сравнению с контрольным растением, например, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения трансгенная растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, представляет собой клетку части растения, органа растения или растительной культуры (в каждом случае как описано в данном документе), включая без ограничения корень, лист, семя, цветок, плод, клетку пыльцы, орган или растительную культуру и т. п., или каллюсную клетку или культуру.

Трансгенные растение или растительная клетка, трансформированные в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой однодольное или двудольное растение или клетку однодольного или двудольного растения и включают без ограничения кукурузу (маис), сою, рис, пшеницу, ячмень, рожь, овес, сорго, просо, подсолнечник, сафлор, сахарную свеклу, хлопчатник, сахарный тростник, масличный рапс, люцерну, табак, разновидности арахиса, овощные культуры, в том числе батат, фасоль, горох, цикорий, латук, кочанную капусту, цветную капусту, брокколи, репу, морковь, баклажан, огурец, редьку, шпинат, картофель, томат, спаржу, лук, чеснок, разновидности дыни, перец, сельдерей, тыкву крупноплодную, тыкву обыкновенную, цуккини, плодовые культуры, включая яблоню, грушу, айву, сливу, вишню, персик, нектарин, абрикос, землянику, виноград, малину, ежевику, ананас, авокадо, папайю, манго, банан и специализированные растения, такие как *Arabidopsis*, а также древесные растения, такие как хвойные и лиственные деревья. Предпочтительно растения по настоящему изобретению представляют собой культурные растения, такие как маис, сорго, пшеница, подсолнечник, томат, крестоцветные, разновидности перца, картофель, хлопчатник, рис, соя, сахарная свекла, сахарный тростник, табак, ячмень, масличный рапс и т. п.

После того как требуемая молекула нуклеиновой кислоты была введена в конкретный вид растения путем трансформации, она может распространяться в пределах данного вида или переходить в другие разновидности того же вида, в частности, включающие коммерческие разновидности, с применением соответствующей методики, с помощью традиционных методик селекции.

Инсектицидный(-ые) белок(белки), кодируемый(-ые) молекулой нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, может функционировать в части растения, растительной клетке, органе растения, семени, собранном продукте, переработанном продукте или экстракте и т. п. в качестве средства для контроля насекомых. Другими словами, инсектицидный(-ые) белок(белки) может продолжать выполнять инсектицидную функцию, которая была характерна для него в трансгенном растении. Функция молекулы нуклеиновой кислоты может заключаться в экспрессии инсектицидного белка. В качестве альтернативы экспрессии инсектицидного белка по настоящему изобретению в некоторых вариантах осуществления функция молекулы нуклеиновой кислоты может заключаться в идентификации трансгенных части растения, растительной клетки, органа растения, семени, собранного продукта, переработанного продукта или экстракта по настоящему изобретению, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты.

В вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения или трансгенное семя по настоящему изобретению являются гемизиготными по молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения или трансгенное семя по настоящему изобретению являются гомизиготными по молекуле нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения включают собранные продукты, полученные из трансгенных растений или их частей по настоящему изобретению, а также переработанный продукт, полученный из данных собранных продуктов. Собранный продукт может представлять собой целое растение или любую часть растения, описанные в данном документе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления неограничивающие примеры собранного продукта включают семя, плод, цветок или его часть (например, пыльник, рыльце и т. п.), лист, стебель и т. п. В других вариантах осуществления переработанный продукт включает без ограничения муку тонкого помола, муку грубого помола, масло, крахмал, патоку, крупу и т. п., полученные из собранного семени или другой части растения по

настоящему изобретению, где указанное семя или другая часть растения содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения представлен экстракт из трансгенного семени или трансгенного растения по настоящему изобретению, где экстракт содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Экстракты из растений или частей растений можно получить в соответствии с процедурами, хорошо известными в данной области техники (см. de la Torre et al., Food, Agric. Environ. 2(1):84-89 (2004); Guidet, Nucleic Acids Res. 22(9): 1772-1773 (1994); Lipton et al., Food Agric. Immun. 12:153-164 (2000)). Такие экстракты можно применять, например, в способах обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения, семя, собранный продукт, переработанный продукт или экстракт характеризуются повышенной инсектицидной активностью в отношении одного или нескольких насекомых-вредителей (например, вредителя, относящегося к чешуекрылым) по сравнению с подходящим контролем, который не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления трансгенные растение, часть растения, растительная клетка, орган растения, семя, собранный продукт, переработанный продукт или экстракт характеризуются повышенной инсектицидной активностью в отношении по меньшей мере *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки). В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение, часть растения, растительная клетка, орган растения, семя, собранный продукт, переработанный продукт или экстракт характеризуются повышенной инсектицидной активностью в отношении по меньшей мере двух (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька).

#### Трансформация и селекция растений

Процедуры для трансформирования растений хорошо известны и общеприняты в данной области техники и подробно описаны в литературе. Неограничивающие примеры способов трансформации растений включают трансформацию с помощью доставки нуклеиновых кислот, опосредованной бактериями (например, с помощью *Agrobacterium*), доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки

нуклеиновых кислот, опосредованной карбидом кремния или вискерами с нуклеиновыми кислотами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной липосомами, микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную циклодекстринами, электропорацию, трансформацию, опосредованную наночастицами, обработку ультразвуком, инфльтрацию, поглощение нуклеиновых кислот, опосредованное PEG, а также любой другой электрический, химический, физический (механический) или биологический механизм, который приводит к введению молекулы нуклеиновой кислоты в растительную клетку, включая любую их комбинацию. Общие руководства по разнообразным способам трансформации растений, известным в данной области техники, включают Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E., Eds. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), pages 67-88) и Rakowoczy-Trojanowska (Cell Mol Biol Lett 7:849-858 (2002)).

Для трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, в целом подходят бинарные векторы или векторы, несущие по меньшей мере одну граничную последовательность T-DNA, тогда как для прямого переноса генов (например, с помощью бомбардировки частицами и т. п.) подходит любой вектор, и можно применять линейную ДНК, содержащую только представляющую интерес конструкцию. В случае прямого переноса генов можно применять трансформацию с помощью одного вида ДНК или котрансформацию (Schocher et al., Biotechnology 4:1093-1096 (1986)). В случае как прямого переноса генов, так и переноса, опосредованного *Agrobacterium*, трансформацию обычно (но необязательно) выполняют с селективируемым маркером, который может представлять собой средство для положительного отбора (например, фосфоманнозоизомераза), которое обеспечивает устойчивость к антибиотику (например, канамицину, гигромицину или метотрексату) или гербициду (например, глифосату или глюфосинату). Однако выбор селективируемого маркера не является критически важным для настоящего изобретения.

Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, представляет собой способ, широко применяемый для трансформации растений в связи с высокой эффективностью трансформации и в связи с его широкой применимостью в отношении множества различных видов. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, как правило, предполагает перенос бинарного вектора, несущего представляющую интерес чужеродную ДНК, в соответствующий штамм *Agrobacterium*, который может зависеть

от набора генов *vir* штамма-хозяина *Agrobacterium*, расположенного либо на корезидентной Ti-плазмиде, либо в хромосоме (Uknes et al. (1993) *Plant Cell* 5:159-169). Перенос рекомбинантного бинарного вектора в *Agrobacterium* можно выполнять с помощью процедуры трехродительского скрещивания с применением *Escherichia coli*, несущей рекомбинантный бинарный вектор, хелперного штамма *E.coli*, несущего плазмиду, которая способна мобилизовать рекомбинантный бинарный вектор в целевом штамме *Agrobacterium*. В качестве альтернативы рекомбинантный бинарный вектор можно переносить в *Agrobacterium* путем трансформации нуклеиновой кислоты (Höfgen & Willmitzer (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:9877).

10 Двудольные растения, а также однодольные растения можно трансформировать с применением *Agrobacterium*. Способы трансформации риса, опосредованной *Agrobacterium*, включают хорошо известные способы трансформации риса, такие как описанные в любом из следующего: европейская патентная заявка EP 1198985 A1, Aldemita and Hodges (*Planta* 199: 612-617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491-15 506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271-282, 1994), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены. В случае трансформации маиса способы предусматривают способы, описанные или в Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745-50, 1996), или в Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13-22, 2002), раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки, 20 как если бы они были полностью изложены. Указанные способы также описаны в качестве примера в Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, в: *Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization*, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 и в Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Нуклеиновую кислоту или конструкцию, подлежащие экспрессии, предпочтительно клонируют в 25 вектор, который является подходящим для трансформации *Agrobacterium tumefaciens*, например, pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). *Agrobacteria*, трансформированные таким вектором, затем можно применять известным способом для трансформации растений, таких как растения, применяемые в качестве модели, такие как *Arabidopsis*, или сельскохозяйственных культур, таких как, в качестве 30 примера, растения табака, например, посредством погружения истолченных листьев или нарубленных листьев в раствор с агробактериями и затем культивирования их в подходящей среде. Трансформация растений посредством *Agrobacterium tumefaciens* описана, например, Hagen and Willmitzer в *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 или известна, в частности, из F. F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; в *Transgenic Plants*,

Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S. D. Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

Растительный материал сои можно соответствующим образом трансформировать, а фертильные растения регенерировать множеством способов, которые широко известны специалисту в данной области техники. Примеры способов трансформации сои можно найти в патенте США № 5024944; Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; McCabe et al. (1988) *Bio/technology* 6:923-926; Khalafalla et al. (2006) *African J. of Biotechnology* 5:1594-1599; патенте США № 7001754; Hinchee et al. (1988) *Bio/Technology* 6:915-922; патенте США № 7002058; публикации патентной заявки США № 20040034889; публикации патентной заявки США № 20080229447 и Paz et al. (2006) *Plant Cell Report* 25:206-213.

Трансгенные растения можно получать с помощью ранее описанных бинарных векторов, содержащих селективируемые маркерные гены, с помощью различных способов трансформации. Например, вектор применяют для трансформации мишеней, представляющих собой незрелые семена, как описано (см., например, публикацию патентной заявки США № 20080229447), с получением напрямую трансгенных растений HPPD с применением ингибитора HPPD, такого как мезотрион, в качестве средства для отбора. Необязательно в полинуклеотиде могут присутствовать другие гены толерантности к гербицидам наряду с другими последовательностями, которые обеспечивают дополнительные средства для отбора/идентификации трансформированных тканей, включая, например, известные гены, которые придают устойчивость к канамицину, гигромицину, фосфинотрицину, бутафенацилу или глифосату. Например, различные бинарные векторы, содержащие селективируемые маркерные гены PAT или EPSPS, вводят посредством трансформации с применением трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, и отбора глюфосинатом или глифосатом, как описано (см., например, публикацию патентной заявки США № 20080229447).

Трансформация растения с помощью рекомбинантной *Agrobacterium* обычно включает совместное культивирование *Agrobacterium* с эксплантатами из растения, и ее проводят в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. На селективной среде регенерирует трансформированная ткань, содержащая маркер устойчивости к антибиотикам или гербицидам между граничными последовательностями T-DNA бинарной плазмиды.

Как обсуждалось ранее, другой способ трансформации растений, частей растений и растительных клеток включает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные ткани и клетки. См, например, патенты США №№ 4945050, 5036006 и 5100792. В общем случае этот способ предусматривает

5 внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные клетки при условиях, эффективных для проникновения через наружную поверхность клетки и обеспечения встраивания в ее внутреннюю часть. При использовании инертных частиц вектор можно вводить в клетку путем покрытия частиц вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту. В качестве альтернативы клетку или

10 клетки можно окружить вектором таким образом, чтобы вектор переносился в клетку вслед за частицей. Биологически активные частицы (например, высушенная дрожжевая клетка, высушенная бактерия или бактериофаг, каждая(-ый) из которых содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, подлежащих введению) также можно внедрять в растительную ткань.

15 В других вариантах осуществления молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно ввести посредством трансформации напрямую в геном пластид. Технология трансформации пластид подробно описана в патентах США №№ 5451513, 5545817 и 5545818, в заявке согласно PCT № WO 95/16783 и в McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7301-7305.

20 Способы отбора трансформированных трансгенных растений, растительных клеток или культур растительных тканей являются общепринятыми в данной области техники и могут использоваться в способах по настоящему изобретению, предусмотренных в данном документе. Например, молекула нуклеиновой кислоты или по настоящему изобретению также может включать кассету экспрессии, содержащую

25 нуклеотидную последовательность селективируемого маркера, который можно применять для отбора трансформированных растения, части растения или растительной клетки.

Примеры селективируемых маркеров включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую neo или nptII, которые придают устойчивость к канамицину, G418 и т. п. (Potrykus et al. (1985) Mol. Gen. Genet. 199:183-188);

30 нуклеотидную последовательность, кодирующую bar, который придает устойчивость к фосфинотрицину; нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную 5-енолпирувилшिकимат-3-фосфатсинтазу (EPSP), которая придает устойчивость к глифосату (Hinchee et al. (1988) Biotech. 6:915-922); нуклеотидную последовательность, кодирующую нитрилазу, такую как bxn от *Klebsiella ozaenae*, которая придает

устойчивость к бромоксилилу (Stalker et al. (1988) *Science* 242:419-423); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную ацетолактатсинтазу (ALS), которая придает устойчивость к имидазолинону, сульфонилмочевине или другим ALS-ингибирующим химическим веществам (европейская патентная заявка № 154204);

5 нуклеотидную последовательность, кодирующую устойчивую к метотрексату дигидрофолатредуктазу (DHFR) (Thillet et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508); нуклеотидную последовательность, кодирующую далапондегалогеназу, которая придает устойчивость к далапону; нуклеотидную последовательность, кодирующую маннозо-6-фосфатизомеразу (также называемую фосфоманнозоизомеразой (PMI)),

10 которая придает способность к метаболизму маннозы (патенты США № 5767378 и № 5994629); нуклеотидную последовательность, кодирующую измененную антранилатсинтазу, которая придает устойчивость к 5-метилтриптофану; или нуклеотидную последовательность, кодирующую *hph*, который придает устойчивость к гигромицину. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящий

15 селектируемый маркер для применения в кассете экспрессии по настоящему изобретению.

Дополнительные селектируемые маркеры включают без ограничения нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -глюкуронидазу или *uidA* (GUS), который кодирует фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты;

20 нуклеотидную последовательность R-локуса, который кодирует продукт, регулирующий продуцирование антоцианиновых пигментов (красного цвета) в растительных тканях (Dellaporta et al., "Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac," pp. 263-282, в: *Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts*, 18th Stadler Genetics Symposium (Gustafson & Appels eds., Plenum Press

25 1988)); нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -лактамазу, фермент, для которого известны различные хромогенные субстраты (например, PADAC, хромогенный цефалоспорин) (Sutcliffe (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-3741); нуклеотидную последовательность, кодирующую *hylE*, который кодирует катехолдиоксигеназу (Zukowsky et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1101-1105);

30 нуклеотидную последовательность, кодирующую тирозиназу, фермент, способный окислять тирозин до DOPA и допахинона, который, в свою очередь, конденсируется с образованием меланина (Katz et al. (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714); нуклеотидную последовательность, кодирующую  $\beta$ -галактозидазу, фермент, для которого существуют хромогенные субстраты; нуклеотидную последовательность,

кодирующую люциферазу (lux), которая обеспечивает выявление с помощью биолюминесценции (Ow et al. (1986) Science 234:856-859); нуклеотидную последовательность, кодирующую экворин, который может быть использован в обнаружении чувствительной к кальцию биолюминесценции (Prasher et al. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 126:1259-1268); или нуклеотидную последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403-406) или другой флуоресцентный белок, такой как dsRed или mCherry. Специалист в данной области техники способен выбрать подходящий селективируемый маркер для применения в кассете экспрессии по настоящему изобретению.

10 Дополнительно, как хорошо известно из уровня техники, трансгенные растения целиком можно регенерировать из трансформированных растительных клеток, культур растительных тканей или культивируемых протопластов с применением любой из множества известных методик. Регенерация растений из растительных клеток, культуры растительных тканей или культивируемых протопластов описана, например, в Evans et al. (Handbook of Plant Cell Cultures, Vol. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)); и Vasil I. R. (ed.) (Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Acad. Press, Orlando, Vol. I (1984), и Vol. II (1986)).

Кроме того, генетические свойства, обеспеченные с помощью конструирования в трансгенных семенах и растениях, частях растения или растительных клетках по настоящему изобретению, описанных выше, могут передаваться путем полового размножения или вегетативного роста и, следовательно, могут поддерживаться и распространяться в растения-потомки. Обычно при поддержании и распространении применяются известные сельскохозяйственные способы, разработанные для соответствия конкретным целям, таким как уборка урожая, посев или возделывание.

25 Следовательно, молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению можно вводить в растение, часть растения или растительную клетку с помощью любого из целого ряда способов, хорошо известных из уровня техники, как описано выше. Следовательно, не придерживаются какого-либо конкретного способа введения молекулы нуклеиновой кислоты в растение, а наоборот, можно применять любой способ, обеспечивающий стабильную интеграцию молекулы нуклеиновой кислоты в геном растения. Если требуется ввести более одного полинуклеотида, то соответствующие полинуклеотиды можно собрать как части одной молекулы нуклеиновой кислоты или как отдельные молекулы нуклеиновых кислот и можно расположить в пределах одной и той же или различных молекул нуклеиновых кислот.

Соответственно, введение полинуклеотидов в представляющую интерес клетку можно осуществлять в ходе одного события трансформации, в ходе отдельных событий трансформации или, например, в растениях, как часть протокола скрещивания.

5 После того как требуемая молекула нуклеиновой кислоты была введена в конкретный вид растения посредством трансформации, она может распространяться в пределах данного вида или переходить в другие разновидности того же вида, в частности, включающие коммерческие разновидности, с помощью традиционных методик селекции.

10 В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение, часть растения, растительная клетка, орган растения, семя, собранный продукт, переработанный продукт или экстракт по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот, которые обеспечивают один или несколько признаков, связанных с затратами (например, устойчивость к насекомым, устойчивость к гербицидам, устойчивость к грибам, 15 устойчивость к вирусам, толерантность к стрессу, устойчивость к заболеваниям, мужскую стерильность, прочность стебля и т. п.), и/или признаков, связанных продуктивностью (например, повышенную урожайность, модифицированные крахмалы, улучшенный профиль масла, сбалансированность аминокислот, высокое содержание лизина или метионина, повышение усвояемости, улучшение качества клетчатки, устойчивость к засухе и т. п.). В некоторых вариантах осуществления 20 трансгенное растение по настоящему изобретению можно скрещивать с другим трансгенным растением, содержащим одну или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот.

25 В некоторых вариантах осуществления одна или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот кодируют одно или несколько вторых средств для контроля вредителей, например, инсектицидный белок *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) и/или инсектицидное средство, отличное от *Bt*, включая без ограничения инсектицидный белок *Xenorhabdus*, инсектицидный белок *Photorhabdus*, инсектицидный белок *Brevibacillus laterosporus*, инсектицидный белок *Bacillus* 30 *sphaericus*, ингибитор протеаз (как серинового, так и цистеинового типов), лектин, альфа-амилазу, пероксидазу, холестериноксидазу или молекулу двухнитевой РНК (dsRNA). В дополнительных вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может представлять собой один или несколько из множества инсектицидных белков *Bacillus thuringiensis*, в том числе без ограничения белок Cry,

вегетативный инсектицидный белок (VIP) и инсектицидные химерные варианты любого из перечисленных выше инсектицидных белков. В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может быть небелковым, например, молекулой интерферирующей РНК, такой как dsRNA.

5 В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей предусматривает любой один или несколько из инсектицидных белков или dsRNA, присутствующих в любом из следующих объектов: объект Bt11 (см. патент США № US6114608), объект MIR604 (см. патент США № US8884102), объект MIR162 (см. патент США № 8232456), объект 5307 (см. патент США № US10428393), объект 10 MZIR098 (см. патентную заявку США № US20200190533), объект TC1507 (см. патент США № US7288643). объект DAS-59122-7 (см. патент США № US7323556), объект MON810 (см. US6713259), объект MON863 (см. патент США № US7705216), объект MON89034 (см. патент США № US8062840), объект MON88017 (см. патент США № US9556492), объект DP-4114 (см. патент США № US9725772), объект MON87411 15 (см. патент США № US9441240), объект DP-032218-9 (см. патентную заявку США № US2015361447), объект DP-033121-3 (см. патентную заявку США № US2015361446), объект DP-023211-2 (см. публикацию согласно PCT № WO2019209700), объект MON95379 (см. патентную заявку США № US2020032289), объект DBN9936 (см. публикацию согласно PCT № WO2016173361), объект DBN9501 (см. публикацию 20 согласно PCT № WO20207125), объект GH5112E-117C (см. публикацию согласно PCT № WO17/088480), LP007-1 (см. китайскую патентную заявку № CN112852801), LP007-2 (китайская патентная заявка № CN112831584), LP007-3 (китайская патентная заявка № CN112877454), LP007-4 (китайская патентная заявка № CN112831585), LP007-5 (китайская патентная заявка № CN113151534), LP007-6 (китайская патентная заявка 25 № CN113151533), LP007-7 (китайская патентная заявка № CN112852991), LP007-8 (CN113980958), Ruifeng8, ND207 или объект Ruifeng125 (см. китайскую патентную заявку № CN105017391). В некоторых вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей предусматривает любой один или несколько из следующих объектов: объект Bt11 (см. патент США № US6114608), объект MIR604 (см. патент 30 США № US8884102), объект MIR162 (см. патент США № 8232456), объект 5307 (см. патент США № US10428393), объект MZIR098 (см. патентную заявку США № US20200190533), объект TC1507 (см. патент США № US7288643). объект DAS-59122-7 (см. патент США № US7323556), объект MON810 (см. US6713259), объект MON863 (см. патент США № US7705216), объект MON89034 (см. патент США

№ US8062840), объект MON88017 (см. патент США № US9556492), объект DP-4114 (см. патент США № US9725772), объект MON87411 (см. патент США № US9441240), объект DP-032218-9 (см. патентную заявку США № US2015361447), объект DP-033121-3 (см. патентную заявку США № US2015361446), объект DP-023211-2 (см. публикацию согласно РСТ № WO2019209700), объект MON95379 (см. патентную заявку США № US2020032289), объект DBN9936 (см. публикацию согласно РСТ № WO2016173361), объект DBN9501 (см. публикацию согласно РСТ № WO20207125), объект GH5112E-117C (см. публикацию согласно РСТ № WO17/088480), LP007-1 (см. китайскую патентную заявку № CN112852801), LP007-2 (китайская патентная заявка № CN112831584), LP007-3 (китайская патентная заявка № CN112877454), LP007-4 (китайская патентная заявка № CN112831585), LP007-5 (китайская патентная заявка № CN113151534), LP007-6 (китайская патентная заявка № CN113151533), LP007-7 (китайская патентная заявка № CN112852991), LP007-8 (CN113980958), Ruifeng8, ND207 или объект Ruifeng125 (см. китайскую патентную заявку № CN105017391).

В вариантах осуществления второе средство для контроля вредителей может быть получено из источников, отличных от *B. thuringiensis*. Например, второе средство для контроля вредителей может представлять собой альфа-амилазу, пероксидазу, холестериноксидазу, пататин, протеазу, ингибитор протеазы, уреазу, ингибитор альфа-амилазы, порообразующий белок, хитиназу, лектин, сконструированное антитело или фрагмент антитела, инсектицидный белок *Bacillus cereus*, инсектицидный белок *Xenorhabdus* spp. (таких как *X. nematophila* или *X. bovienii*), инсектицидный белок *Photorhabdus* spp. (таких как *P. luminescens* или *P. asymobiotica*), инсектицидный белок *Brevibacillus* spp. (таких как *B. laterosporous*), инсектицидный белок *Lysinibacillus* spp. (таких как *L. sphaericus*), инсектицидный белок *Chromobacterium* spp. (таких как *C. subtsugae* или *C. piscinae*), инсектицидный белок *Yersinia* spp. (таких как *Y. entomophaga*), инсектицидный белок *Paenibacillus* spp. (таких как *P. propylaea*), инсектицидный белок *Clostridium* spp. (таких как *C. bifermentans*), *Pseudomonas* spp. (таких как *P. fluorescens*) и лигнин. В других вариантах осуществления второе средство может представлять собой по меньшей мере один инсектицидный белок, полученный из инсектицидного комплекса токсинов (Тс) из *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia* или *Yersinia*. В других вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой АДФ-рибозилтрансферазу, полученную из инсектицидных бактерий, таких как *Photorhabdus* spp. В других вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой белок VIP, такой как VIP1 и/или VIP2 из *B. cereus*. В еще одних

вариантах осуществления инсектицидный белок может представлять собой бинарный токсин, полученный из инсектицидной бактерии, такой как ISP1A и ISP2A из *B.*

*laterosporous* или BinA и BinB из *L. sphaericus*. В еще одних вариантах осуществления инсектицидный белок может быть сконструированным или может представлять собой гибридный белок или химерную молекулу из любых вышеуказанных инсектицидных белков.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот кодируют одно или несколько средств толерантности к гербицидам, например, PAT (фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу), AAD-1 (арилоксиалканоатдиоксигеназу 1), EPSPS (5-енолпирувулшикимат-3-фосфатсинтазу) или ингибиторы протопорфириногенаоксидазы (PPO, см., например, патентную заявку США № US2019185873). В некоторых вариантах осуществления средство толерантности к гербицидам предусматривает любой один или несколько из следующих объектов: GA21 (см. публикацию согласно PCT № WO98/44140), NK603 (см. патент США № US6825400), DAS40278 (см. публикацию согласно PCT № WO2011/022469), DBN9858 (см. публикацию согласно PCT № WO2016173508), MON87429 (см. публикацию согласно PCT № WO19/152316), LW2-2 (см. китайскую патентную заявку № CN113278721) и T25 (см. петицию USDA/APHIS 94-357-01 в отношении определения нерегламентированного статуса устойчивых к глюофосинату трансформационных объектов кукурузы T14 и T25, июнь 1995 г.).

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот кодируют один или несколько ферментов, например альфа-амилазу. В некоторых вариантах осуществления фермент предусматривает объект 3272 (см. патент США № US7635799).

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько других представляющих интерес нуклеиновых кислот предусматривают один или несколько из следующих объектов: MZDT09Y (см. патент США № US9121033), LY038 (см. патент США № US7157281), BT176 (см. Koziel et al. (1993) *Biotechnology* 11: 194-200) и DP202216-6 (см. патентную заявку США № US2019320607).

Трансгенные растения или семена, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, также можно обработать инсектицидом или инсектицидным покрытием для семян, которые описаны, например, в патентах США № 5849320 и № 5876739. В некоторых вариантах осуществления как инсектицид или инсектицидное покрытие для семян, так и трансгенное растение или семя по

настоящему изобретению являются активными в отношении одного и того же целевого насекомого, например, вредителя, относящегося к чешуекрылым (например, кукурузной листовой совки). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления предусмотрен способ повышения контроля популяции насекомого, относящегося к чешуекрылым, предусматривающий обеспечение трансгенного растения или семени по настоящему изобретению и нанесение на растение или семя инсектицида или инсектицидного покрытия для семян.

Даже в случае, если инсектицид или инсектицидное покрытие для семян являются активными в отношении другого насекомого, инсектицид или инсектицидное покрытие для семян применимы для расширения диапазона контроля насекомых, например, посредством добавления инсектицида или инсектицидного покрытия для семян, которые характеризуются активностью в отношении насекомых, относящихся к жесткокрылым, к трансгенному семени по настоящему изобретению, которое в некоторых вариантах осуществления характеризуется активностью в отношении насекомых, относящихся к чешуекрылым, при этом полученное трансгенное семя с нанесенным покрытием обеспечивает контроль насекомых-вредителей, как относящихся к чешуекрылым, так и относящихся к жесткокрылым.

#### Способы применения молекул нуклеиновых кислот и трансгенных растений

В некоторых аспектах в настоящем изобретении также предусмотрены способы получения и применения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению и композиций на ее основе, таких как клетки и растения, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты, а также пути их применения.

В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению обеспечивают контроль по меньшей мере одного насекомого-вредителя, относящегося к чешуекрылым, включая без ограничения одно или несколько из следующего: *Spodoptera* spp., таких как *S. frugiperda* (кукурузная листовая совка), *S. littoralis* (египетская хлопковая совка), *S. ornithogalli* (желто-полосатая совка), *S. praeifica* (западная желто-полосатая совка), *S. eridania* (южная совка), *S. litura* (табачная совка/азиатская хлопковая совка), *S. cosmioides* (черная совка), *S. exempta* (африканская совка), *S. mauritia* (луговая совка) и/или *S. exigua* (свекольная совка); *Ostrinia* spp., таких как *O. nubilalis* (огневка кукурузная) и/или *O. furnacalis* (азиатский кукурузный мотылек); *Plutella* spp., таких как *P. xylostella* (капустная моль); *Agrotis* spp., таких как *A. ipsilon* (совка-ипсилон), *A. segetum* (совка озимая), *A. gladiaria* (глиняная совка) и/или

*A. orthogonia* (совка прямоугольная); *Striacosta* spp., таких как *S. albicosta* (западная бобовая совка); *Helicoverpa* spp., таких как *H. zea* (совка кукурузная/американская кукурузная совка), *H. punctigera* (австралийская совка) и/или *H. armigera* (совка хлопковая); *Heliothis* spp., таких как *H. virescens* (табачная листовертка); *Diatraea* spp.,  
5 таких как *D. grandiosella* (огневка кукурузная юго-западная) и/или *D. saccharalis* (тростниковая огневка); *Trichoplusia* spp., таких как *T. ni* (совка ни); *Sesamia* spp., таких как *S. nonagroides* (мотылек кукурузный средиземноморский), *S. inferens* (розовая стеблевая совка) и/или *S. calamistis* (розовая стеблевая совка); *Pectinophora* spp., таких как *P. gossypiella* (хлопковая моль); *Cochylis* spp., таких как *C. hospes* (полосатая  
10 подсолнечная моль); *Manduca* spp., таких как *M. sexta* (табачный бражник) и/или *M. quinquemaculata* (томатный бражник); *Elasmopalpus* spp., таких как *E. lignosellus* (огневка кукурузная стеблевая малая); *Pseudoplusia* spp., таких как *P. includens* (соевая совка); *Anticarsia* spp., таких как *A. gemmatalis* (совка бархатных бобов); *Plathypena* spp., таких как *P. scabra* (совка клеверная); *Pieris* spp., таких как *P. brassicae* (белянка  
15 капустная), *Papaipema* spp., таких как *P. nebris* (стеблевой мотылек обыкновенный); *Pseudaletia* spp., таких как *P. unipuncta* (луговая совка); *Peridroma* spp., таких как *P. saucia* (пестрая совка); *Keiferia* spp., таких как *K. lycopersicella* (томатная острица); *Artogeia* spp., таких как *A. rapae* (белянка репная); *Phthorimaea* spp., таких как *P. operculella* (картофельная моль); *Chrysodeixis* spp., таких как *C. includens* (золотистая  
20 двупятнистая совка); *Feltia* spp., таких как *F. ducens* (тусклая совка); *Chilo* spp., таких как *C. suppressalis* (огневка желтая рисовая), *C. agamemnon* (восточная кукурузная огневка) и *C. partellus* (крапчатая стеблевая моль), *Snaphalocrocis* spp., таких как *C. medinalis* (огневка рисовая), *Conogethes* spp., таких как *C. punctiferalis* (желтая персиковая моль), *Mythimna* spp., таких как *M. separata* (совка восточная луговая),  
25 *Athetis* spp., таких как *A. lepigone* (чайная совка), *Busseola* spp., таких как *B. fusca* (африканский кукурузный стеблевой сверлильщик), *Etiella* spp., таких как *E. zinckenella* (огневка акациевая), *Leguminivora* spp., таких как *L. glycinivorella* (плодожорка соевая), *Matsumuraeses* spp., таких как *M. phaseoli* (плодожорка адзуки), *Omiodes* spp., таких как *O. indicata* (соевый мотылек/паутинная гусеница бобовых листьев), *Rachiplusia* spp.,  
30 таких как *R. ni* (подсолнечниковая совка), или любой комбинации вышеуказанного. В некоторых вариантах осуществления вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой по меньшей мере *S. frugiperda* (кукурузную листовую совку). В некоторых вариантах осуществления вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой по меньшей мере два (например, 2, 3 или 4) из *Spodoptera*

*frugiperda* (кукурузной листовой совки), *Mythimna separata* (восточной луговой совки), *Spodoptera litura* (озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки) и *Ostrinia furnacalis* (азиатского кукурузного мотылька).

В некоторых вариантах осуществления способы обеспечивают контроль  
5 насекомого-вредителя или колонии кукурузной листовой совки, которая устойчива к  
другому инсектицидному белку, такому как белок Vip3A (например, Vip3Aa, включая  
без ограничения объект маиса MIR162), белок Cry1F (например, Cry1Fa, включая без  
ограничения объект маиса TC1507 или DP-4114), белок Cry1A (например, Cry1A.105,  
10 включая без ограничения объект маиса MON89034) и/или белок Cry2 (например,  
Cry2Ab, включая без ограничения объект маиса MON89034).

В дополнительных вариантах осуществления предусмотрен способ контроля  
вредителя, относящегося к чешуекрылым, при этом способ предусматривает доставку  
вредителю эффективного количества растения или части растения, содержащих  
молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Для эффективного  
15 воздействия инсектицидный(-ые) белок(белки), экспрессируемый(-ые) молекулой  
нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, поглощается вредителем  
пероральным путем. В некоторых вариантах осуществления инсектицидный(-ые)  
белок(белки) доставляется(-ются) вредителю в трансгенном растении, где вредитель  
поедает (поглощает) одну или несколько частей трансгенного растения с поглощением  
20 тем самым инсектицидного(-ых) белка(-ов), который(-ые)  
экспрессируется/экспрессируются в трансгенном растении.

Также охвачены способы получения трансгенного растения с улучшенными  
инсектицидными свойствами. В иллюстративных вариантах осуществления способ  
предусматривает введение в растение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему  
25 изобретению, где молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется в растении с  
образованием инсектицидного(-ых) белка(-ов) с обеспечением тем самым улучшенных  
инсектицидных свойств у растения.

В некоторых вариантах осуществления способ введения молекулы нуклеиновой  
кислоты по настоящему изобретению в растение предусматривает сначала  
30 трансформацию растительной клетки с помощью молекулы нуклеиновой кислоты по  
настоящему изобретению и регенерацию из нее трансгенного растения, где трансгенное  
растение содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В  
некоторых вариантах осуществления способ предусматривает введение в растение,  
культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты по

настоящему изобретению с получением трансформированного растения, трансформированной культуры тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и выращивание трансформированного растения или обеспечения регенерации трансформированного растения из трансформированной культуры тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами.

В качестве альтернативы или дополнения стадия введения может предусматривать скрещивание первого растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, со вторым растением (например, растением, отличным от первого растения, например, растением, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению) и необязательно получение растения-потомка, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Таким образом, трансгенное растение охватывает растение, которое является прямым результатом события трансформации, и его потомка (любого поколения), который содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ идентификации трансгенного растения по настоящему изобретению, при этом способ предусматривает обнаружение присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в растении (или растительной клетке, части растения и т. п., полученных из него) и идентификацию тем самым растения как трансгенного растения по настоящему изобретению на основании присутствия молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления дополнительно предусмотрен способ получения трансгенного растения с повышенной устойчивостью к по меньшей мере одному насекомому-вредителю (например, по меньшей мере одному вредителю, относящемуся к чешуекрылым), при этом способ предусматривает посев семени, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектор по настоящему изобретению, и выращивание трансгенного растения из семени, где трансгенное растение содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Способы получения трансгенного растения, описанного в данном документе, необязательно предусматривают дополнительную стадию сбора семени от

трансгенного растения, где семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Необязательно из семени образуется дополнительное трансгенное растение, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

5 В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены части растения, растительные клетки, органы растения, растительные культуры, семена, растительные экстракты, собранные продукты и переработанные продукты трансгенных растений, полученных с помощью способов по настоящему изобретению.

10 В качестве дополнительного аспекта в настоящем изобретении также предусмотрен способ получения семени, при этом способ предусматривает обеспечение трансгенного растения, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, и сбор семени от трансгенного растения, где семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Необязательно из семени образуется дополнительное трансгенное растение, которое содержит  
15 молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В иллюстративных вариантах осуществления стадия обеспечения трансгенного растения предусматривает посев семени, из которого образуется трансгенное растение.

Дополнительно предусмотрен способ получения семени гибридного растения, при этом способ предусматривает скрещивание первого инбредного растения, которое  
20 представляет собой трансгенное растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, с другим инбредным растением (например, инбредным растением, которое не содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению) и обеспечение возможности образования гибридного семени. Необязательно способ дополнительно предусматривает сбор гибридного семени. В  
25 некоторых вариантах осуществления гибридное семя содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления из гибридного семени образуется трансгенное растение, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

30 В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения товарного растительного продукта, при этом способ предусматривает применение трансгенного растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, для получения из него указанного товарного растительного продукта. Примеры товарных растительных продуктов включают зерно, крахмал, масло из семян, патоку, муку тонкого помола, муку грубого

помола, крахмал, крупу, белок и т. п. Способы получения таких товарных растительных продуктов хорошо известны в данной области техники.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает: (а) приведение образца в контакт с парой праймеров, которые при применении в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), образуют ампликон, который является диагностическим в отношении молекулы нуклеиновой кислоты; (b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с получением тем самым ампликона; и (c) обнаружение ампликона. В некоторых вариантах осуществления пара праймеров представляет собой первый праймер и второй праймер, где первый праймер содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны обратной комплементарной последовательности для последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-50, 10-40, 10-30 или 10-20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает: (а) приведение образца в контакт с зондом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), и не гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК контрольного растения маиса, не содержащего молекулу

нуклеиновой кислоты; (b) воздействие на образец и зонда условий гибридизации высокой жесткости; и (c) обнаружение гибридизации зонда с молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления зонд содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, или ее обратно комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления длина зонда составляет 10-50, 10-40, 10-30 или 10-20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрена пара полинуклеотидных праймеров, содержащая первый полинуклеотидный праймер и второй полинуклеотидный праймер, которые действуют совместно в присутствии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащей последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), в образце с образованием ампликона, диагностического в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец, полученный из части или клетки растения маиса. В некоторых вариантах осуществления первый полипептидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности, обратно комплементарной последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-50, 10-40, 10-30 или 10-20 нуклеотидов.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен набор для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из вышеупомянутых вариантов осуществления или любому другому варианту осуществления, описанному в данном документе (например, содержащей последовательность под любым из

SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любой один или несколько из вариантов, представленных в таблице 3), при этом набор содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты из смежных нуклеотидов с достаточной длиной, чтобы она действовала в качестве праймера или зонда в способе обнаружения нуклеиновой кислоты, и которая после амплификации или гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты в образце с последующим обнаружением ампликона или гибридизации с целевой последовательностью является диагностической в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит пару праймеров, где первый полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, а второй полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 20) смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности, обратной комплементарной последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3. В некоторых вариантах осуществления длина первого и второго праймеров составляет 10-50, 10-40, 10-30 или 10-20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит зонд, который содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31 или любому одному или нескольким из вариантов, представленных в таблице 3, или ее обратной комплементарной последовательности. В некоторых вариантах осуществления длина зонда составляет 10-50, 10-40, 10-30 или 10-20 нуклеотидов. Наборы по настоящему изобретению также могут необязательно содержать реагенты и/или инструкции для проведения обнаружения, как описано в данном документе.

В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы модификации молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, например,

в клетке или растении. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой делецию, вставку (например, гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты), замену, дупликацию или инверсию или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модификация предусматривает делецию части или всей кодирующей последовательности селективируемого маркера, присутствующей в молекуле нуклеиновой кислоты, например, кодирующей последовательности РМІ или EPSPS. В некоторых вариантах осуществления модификацию вводят с применением нуклеазы, такой как нуклеаза CRISPR-Cas, нуклеаза с цинковыми пальцами, мегануклеаза, эффекторная нуклеаза TAL (TALEN) или их комбинация.

10 В некоторых вариантах осуществления модификацию осуществляют в клетке-хозяине или растении-хозяине по настоящему изобретению, например в клетке маиса или растении маиса, с получением модифицированной трансгенной клетки или модифицированного трансгенного растения. В некоторых вариантах осуществления модификацию осуществляют путем экспрессии нуклеазы в клетке-хозяине или растении-хозяине (например, путем трансформации клетки-хозяина или растения-хозяина с помощью кассеты экспрессии, кодирующей нуклеазу, или путем скрещивания растения с другим растением, содержащим такую кассету экспрессии). В некоторых вариантах осуществления модификацию осуществляют путем непосредственного введения нуклеазы в клетку-хозяина или растение-хозяина, например, с применением реагентов, которые переносят нуклеазу в клетку-хозяина или растение-хозяина, например, посредством физических способов, таких как биолистика/бомбардировка частицами, трансфекция протопластов, опосредованная наночастицами доставка, инъекция с применением аэрозольного пучкового инжектора или опосредованная вискерами доставка. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает получение растения из модифицированной трансгенной клетки-хозяина с получением модифицированного трансгенного растения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает обеспечение самоопыления или скрещивание модифицированного трансгенного растения с другим растением в течение по меньшей мере одного поколения (например, одного, двух, трех, четырех или более поколений) с получением тем самым модифицированного трансгенного растения-потомка. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены такие модифицированная трансгенная клетка, модифицированное трансгенное растение или модифицированное

трансгенное растение-потомок, например, полученные посредством способа, описанного в данном документе.

В определенных вариантах осуществления модификацию нуклеиновой кислоты осуществляет (модифицированная) система нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN). В системе ZFN используются искусственные ферменты рестрикции, полученные 5 путем слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с ДНК-расщепляющим доменом, который можно сконструировать для нацеливания на требуемые последовательности ДНК. Неограничивающие примеры способов применения ZFN можно найти, например, в патентах США №№ 6534261, 6607882, 6746838, 6794136, 10 6824978, 6866997, 6933113 и 6979539.

В определенных вариантах осуществления модификацию нуклеиновой кислоты осуществляет мегануклеаза, которая представляет собой эндодезоксирибонуклеазы, характеризующиеся большим сайтом распознавания (двухнитевые последовательности ДНК, составляющие от 12 до 40 пар оснований). 15 Неограничивающие примеры способов применения мегануклеаз можно найти в патентах США №№: 8163514, 8133697, 8021867, 8119361, 8119381, 8124369 и 8129134.

В определенных вариантах осуществления модификацию нуклеиновой кислоты осуществляет комплекс или система CRISPR/Cas. В определенных вариантах осуществления система или комплекс CRISPR/Cas представляют собой систему 20 CRISPR/Cas класса 2. В определенных вариантах осуществления указанные система или комплекс CRISPR/Cas представляют собой систему или комплекс CRISPR/Cas типа II, типа V или типа VI. Для системы CRISPR/Cas не требуется образование специально разработанных белков для нацеливания на конкретные последовательности, а нуклеазу Cas можно запрограммировать с помощью направляющей РНК (gRNA) для 25 распознавания специфической целевой нуклеиновой кислоты, другими словами, нуклеаза Cas может быть рекрутирована в специфический представляющий интерес целевой локус нуклеиновой кислоты с применением указанной короткой направляющей РНК.

В целом, используемая в данном документе система CRISPR/Cas или CRISPR 30 относится в совокупности к элементам, вовлеченным в экспрессию или направляющим активность CRISPR-ассоциированной (“Cas”) нуклеазы, включая последовательности, кодирующие ген Cas, и одну или несколько из последовательности *tracr* (транс-активирующей CRISPR) (например, *tracrRNA* или активная неполная *tracrRNA*), комплементарной последовательности *tracr* (охватывающей “прямой повтор” и

процессированный tracrRNA неполный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющей последовательности (также называемой “спейсером” в контексте эндогенной системы CRISPR) или молекул “РНК”, как этот термин используется в данном документе (например, РНК для направления Cas, такой как Cas9, например РНК CRISPR, и где применимо, транскриптивной (tracr) РНК или 5 одиночной направляющей РНК (sgRNA) (химерной РНК)), или других последовательностей и транскриптов из локуса CRISPR. В целом, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR в сайте целевой последовательности (также называемой протоспейсером в контексте 10 эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR “целевая последовательность” относится к последовательности, в отношении которой сконструированная направляющая последовательность характеризуется комплементарностью, причем гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR.

15 В определенных вариантах осуществления gRNA представляет собой химерную направляющую РНК или одиночную направляющую РНК (sgRNA). В определенных вариантах осуществления gRNA содержит направляющую последовательность и комплементарную последовательность tracr (или прямой повтор). В определенных вариантах осуществления gRNA содержит направляющую 20 последовательность, комплементарную последовательность tracr (или прямой повтор) и последовательность tracr. В определенных вариантах осуществления система или комплекс CRISPR/Cas, описанные в данном документе, не содержат и/или не зависят от присутствия последовательности tracr (например, если нуклеаза Cas представляет собой Cas12a).

25 Нуклеазой CRISPR-Cas может быть любая такая известная из уровня техники нуклеаза, такая как Cas9, Cas12a, Cas12b, Cas12i, Cas13a (ранее называемая C2c2), C2c3, Cas13b или модифицированная версия любой из вышеперечисленного. Нуклеазы CRISPR-Cas хорошо известны из уровня техники (см., например, Dong et al. Efficient Targeted Mutagenesis Mediated by CRISPR-Cas12a Ribonucleoprotein Complexes in Maize. 30 Front. Genome Ed. (2021), vol. 3, article 670529; Wei et al. TALEN or Cas9 – Rapid, Efficient and Specific Choices for Genome Modifications. J. of Genetics and Genomics (2013), vol. 40, pp. 281-289; Sedeek et al. Plant Genome Engineering for Targeted Improvement of Crop Traits. Frontiers in Plant Science (2019), vol. 10, article 114; и Zhang

et al. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology* (2018), vol. 19, article 210).

## ПРИМЕРЫ

### 5 Пример 1. Синтезированные конструкции

Конструировали конструкции бинарных векторов, которые содержали различные комбинации транскрипционных энхансеров, промоторов, транзитных пептидов и терминаторов, и варианты этих генетических элементов, управляющих экспрессией вариантов eCry1Gb.1Ig. Эти генетические элементы синтезировали и лигировали в каждый бинарный вектор с помощью способа клонирования на основе рестриктазы. Все используемые промоторы представляли собой средние или сильные конститутивные промоторы или вирусные промоторы. Для тестирования требуемого уровня экспрессии и эффективности создавали версии генов eCry1Gb.1Ig с различными предпочтениями по использованию кодонов. В таблице 1 показаны созданные 10 конструкций и перечислены генетические элементы с каждой кодирующей 15 последовательностью (CDS). В таблице 2 описан каждый из генетических элементов, обозначенных в таблице 1.

**Таблица 1. Состав бинарных конструкций**

ИД конструкции	Положение кассеты	Промотор	Транзитный пептид	CDS	Терминатор
24795	1	prSoUbi4-02		eCry1Gb.1Ig-03	tZmUbi361-05
	2	prUbi1-43		cPMI-15	tUbi1-04
23698	1	prUbi1-18		eCry1Gb.1Ig-01	tZmUbi361-01
	2	prUbi1-18		cPMI-01	tUbi1-04
24530	1	prScBv-05		eCry1Gb.1Ig-02	tNOS-05-01
	2	prUbi1-18		cPMI-01	tUbi1-04
24534	1	pr35S-12		eCry1Gb.1Ig-02	tNOS-05-01
	2	prUbi1-43		cPMI-15	tUbi1-04
25628	1	prSoUbi4-02	xOTPSSUct-02	eCry1Gb.1Ig-03	tZmUbi361-05
	2	prUbi1-43		cPMI-15	tUbi1-04

20

**Таблица 2. Описание генетических элементов**

Элемент	Название	Описание с соответствующими ссылками
Промотор	SoUbi4-02	Конститутивный промотор гена убиквитина 4 <i>Saccharum officinarum</i> , содержащий первый интрон (под номером доступа в NCBI AF093504.1).

Промотор	ScBv-05	Модифицированный промотор из изолята Ireng Maleng IM бациллиформного баднавируса сахарного тростника (ScBVIM) (Davies et al. 2014).
Промотор	Ubi1-18	Промоторная область из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> , которая содержит первый интрон (под номером доступа в NCBI S94464.1). Обеспечивает конститутивную экспрессию у однодольных растений (Christensen et al. 1992).
Промотор	Ubi1-43	Промоторная область из гена полиубиквитина <i>Zea mays</i> , содержащая первый интрон (под номером доступа в NCBI S94464.1). Обеспечивает конститутивную экспрессию у однодольных растений (Christensen et al. 1992).
Промотор	35S-12	Модифицированный промотор из вируса мозаики цветной капусты (Odell et al. 1985, Nature 313: 810-812).
Транзитный пептид	xOTPSSUct-02	Оптимизированный химерный транзитный пептид малой субъединицы Rubisco подсолнечника и маиса, подобный pDPG434 (патент США № 6040497).
Кодирующая последовательность	eCry1Gb.1Ig-01	Кодон-оптимизированный ген, кодирующий сконструированный белок eCry1Gb.1Ig, который представляет собой химерную молекулу из Cry1Gb и Cry1Ig. Оба белка Cry1Gb и Cry1Ig получены из секвенированных геномов почвенной бактерии <i>Bacillus thuringiensis</i> и активны в отношении нескольких видов вредителей, относящихся к чешуекрылым. Белок eCry1Gb.1Ig конструировали для улучшения инсектицидной активности в отношении кукурузной листовой совки ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) (см., например, международную патентную публикацию № WO2018111553). Белок eCry1Gb.1Ig также характеризуется активностью в отношении других видов вредителей, в том числе, например, восточной луговой совки ( <i>Mythimna separata</i> ), озимой совки обыкновенной/азиатской хлопковой совки ( <i>Spodoptera litura</i> ) и азиатского кукурузного мотылька ( <i>Ostrinia furnacalis</i> ) (см., например, международную патентную заявку № PCT/CN2021/073190).
Кодирующая последовательность	eCry1Gb.1Ig-02	Кодон-оптимизированный ген, кодирующий сконструированный белок eCry1Gb.1Ig, который представляет собой химерную молекулу из Cry1Gb и Cry1Ig. Эта версия кодирует тот же белок, но отличается от eCry1Gb.1Ig-01 четырьмя парами оснований с удалением непредусмотренных открытых рамок считывания.

Кодирующая последовательность	eCry1Gb.1Ig-03	Последовательность, кодирующая сконструированный белок eCry1Gb.1Ig, который представляет собой химерную молекулу из Cry1Gb и Cry1Ig. Для оптимизации частоты использования кодонов вводили “молчащие” мутации.
Кодирующая последовательность	PMI-01	Ген <i>pmi Escherichia coli</i> , кодирующий фермент фосфоманноизомеразу (PMI) (номер доступа в NCBI M15380.1); этот ген также известен под названием <i>manA</i> . Катализирует изомеризацию маннозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат (Negrotto et al. 2000).
Кодирующая последовательность	PMI-15	Ген <i>pmi Escherichia coli</i> , кодирующий фермент фосфоманноизомеразу (PMI) (номер доступа в NCBI M15380.1); этот ген также известен под названием <i>manA</i> . Катализирует изомеризацию маннозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат (Negrotto et al. 2000). Введены “молчащие” мутации относительно PMI-01.
Терминатор	ZmUbi361-01	Терминатор, полученный из гена убиквитина маиса (Nuccio 2018).
Терминатор	ZmUbi361-05	Терминатор, полученный из гена убиквитина маиса (Nuccio 2018), с мутациями для удаления непредусмотренных открытых рамок считывания относительно терминатора ZmUbi361-01.
Терминатор	NOS-05-01	Терминаторная последовательность из гена нопалинсинтазы (NOS) <i>A. tumefaciens</i> (номер доступа в NCBI V00087.1). Образует сайт полиаденилирования (Bevan et al. 1983).
Терминатор	Ubi1-04	Терминатор гена убиквитина 1 из <i>Z. mays</i> . Мутация размером в одну п. о. для удаления внутреннего сайта рестрикции относительно терминатора Ubi1-01.

### Пример 2. Опосредованная *Agrobacterium* трансформация с отбором по фосфоманноизомеразе (PMI)

Для создания трансгенных объектов маиса использовали каждую из

5 конструкций бинарных векторов. Трансформацию *Zea mays* для получения генетически модифицированного маиса осуществляли с применением незрелых зародышей

посредством опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* трансформации, как описано в Zhong et al. (2018) (Advances in *Agrobacterium*-mediated Maize Transformation. В: Lagrimini L. (eds) Maize. Methods in Molecular Biology, vol 1676. Humana Press, New

10 York, NY). Для трансформации маиса применяли штамм LBA4404 *A. tumefaciens* (*recA-*), несущий нейтрализованную плазмиду pTi под названием pAL4404 и хелперную плазмиду pVGW7. Подробная информация о плаزمиде pAL4404 и pVGW7 описана в Hoekema et al. (*Nature*. (1983) 303:179-189), Ishida et al. (*Nat Biotechnol* (1996) 14:745-

750) и Imayama *et al.*(US10266835). Штамм LBA4404 *A. tumefaciens (recA<sup>-</sup>)*, содержащий отдельные бинарные векторы, получали так, как описано в Li *et al.* (*Plant Physiol* (2003) 133:736-47). Для трансформации маиса незрелые зародыши инбредной линии NP2222 маиса, выращенной в теплице, собирали через примерно 9 дней после опыления и использовали в качестве эксплантатов (Zhong *et al.*, 2018). Выделение незрелых зародышей, инокуляцию *Agrobacterium* и совместное культивирование *Agrobacterium* с незрелыми зародышами проводили так, как описано в Zhong *et al.* (2018), с применением способа объемной экстракции, описанного в данном источнике. С помощью этого способа генетические элементы в пределах левой и правой граничных областей плазмиды для трансформации эффективно переносились и интегрировались в геном растительной клетки, в то время как генетические элементы за пределами данных граничных областей не переносились.

Трансформированные ткани и предполагаемые трансгенные объекты регенерировали и укореняли, как описано ранее (Zhong *et al.*, 2018), с применением среды для отбора по маннозе в случае объектов, содержащих селективируемый маркер фосфоманнозоизомеразу (PMI) (Negrotto *et al.*, (2000) *Plant Cell Rep.* 19:789-803.), или с применением 2 мМ гербицида N-(фосфонометил)-глицина (TouchDown<sup>®</sup>) в качестве средства для отбора в случае объектов, содержащих модифицированную версию фермента 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS).

Регенерированные проростки тестировали в отношении присутствия целевых генов и растительного гена селективируемого маркера (PMI или EPSPS) с помощью ПЦР-анализа в реальном времени TAQMAN<sup>®</sup>, разработанного Ingham *et al.* (*Biotechniques* 31(1):132-4, 136-40, 2001). Растения, положительные по целевым генам и селективируемому маркеру, также называемые объектами, переносили в теплицу для дальнейшего размножения. В одном растении, трансформированном с помощью бинарного вектора 24795 (SEQ ID NO: 2), обнаружили, что кассета экспрессии (SEQ ID NO:1) содержит “молчащую” мутацию в кодирующей последовательности сPMI-15 (SEQ ID NO: 7), что создает в растении слегка модифицированную последовательность кассеты экспрессии (SEQ ID NO: 8). При дополнительном секвенировании обнаружили дополнительные мутации, которые указаны в таблице 3 (см. также SEQ ID NO: 9-31). Растения, для которых получили результаты секвенирования, по-видимому, не оказывали какого-либо существенного отрицательного влияния на эффективность по сравнению с пулом других растений, содержащих последовательность под SEQ ID NO: 1.

Таблица 3. Дополнительные варианты, идентифицированные при секвенировании

Положение в последовательности под SEQ ID NO 1	Эталон	Вариант	Эталонная последовательность	Вариант последовательности
324	TC	T	CTCCCTCCTCCCCGTTA (SEQ ID NO: 32)	CTCCCTCCTCCCCGTTA (SEQ ID NO: 33)
711	G	T	TGATTCTGCGGGTTGGC (SEQ ID NO: 34)	TGATTCTGCTGGTTGGC (SEQ ID NO: 35)
7271	A	AC	TAATAAATAGACACCCCTC CACACCCTCTT (SEQ ID NO: 36)	TAATAAATAGACACCCCTCCA CACCCTCTT (SEQ ID NO: 37)
7387	T	TC	CTCGTCCTCCCCCCCCCCCC TC (SEQ ID NO: 38)	CTCGTCCTCCCCCCCCCCCCCT C (SEQ ID NO: 39)
7989	A	AT	CGGTCGTTCAATTCGTTCTA (SEQ ID NO: 40)	CGGTCGTTCAATTCGTTCTA (SEQ ID NO: 41)
6015	C	CT	AGACTAGTGGCTTGCTTTTTTC GTATGTCT (SEQ ID NO: 42)	AGACTAGTGGCTTGCTTTTTTCG TATGTCT (SEQ ID NO: 43)
6470	AT	A	AAAAAATTACCACATATTTT TTTTGTGACA (SEQ ID NO: 44)	AAAAAATTACCACATATTTTTT GTGACA (SEQ ID NO: 45)
6683	CT	C	TAGTGTGCATGTGTTCTCCTT TTTTTTGCAA (SEQ ID NO: 46)	TAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTT TTTGCAA (SEQ ID NO: 47)
7387	T	TC	GTACGCCGCTCGTCCTCCCC CCCCCCTCT (SEQ ID NO: 48)	GTACGCCGCTCGTCCTCCCCCCC CCCCCCTCT (SEQ ID NO: 49)
8397	C	CA	GATCTCCGATCATGCAAAAA CTCATTAACTCAGT (SEQ ID NO: 50)	GATCTCCGATCATGCAAAAAACT CATTAACTCAGT (SEQ ID NO: 51)
5944	CT	C	CTTATGCAGAACCTTTTTTTT TG (SEQ ID NO: 52)	CTTATGCAGAACCTTTTTTTTG (SEQ ID NO: 53)
6015	CT	C	GGAGACTAGTGGCTTGCTTT TTCGTATGTCT (SEQ ID NO: 54)	GGAGACTAGTGGCTTGCTTTTCG TATGTCT (SEQ ID NO: 55)
7387	T	TC	ACGCCGCTCGTCCTCCCCC CCCCCCTCT (SEQ ID NO: 56)	ACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCC CCCCCCTCT (SEQ ID NO: 57)
7576	TG	T	GCCAGTGTCTCTTTGGGG AATCCTGGGAT (SEQ ID NO: 58)	GCCAGTGTCTCTTTGGGAATC CTGGGAT (SEQ ID NO: 59)
10055	G	GT	ACTAACAATTAGTTTTAGTG CATTCAAACA (SEQ ID NO: 60)	ACTAACAATTAGTTTTAGTGCA TTCAAACA (SEQ ID NO: 61)
347	TC	T	TTATAAATTGGCTTCATCCCC TCCTTGCCTCAT (SEQ ID NO: 62)	TTATAAATTGGCTTCATCCCTCC TTGCCTCAT (SEQ ID NO: 63)
1579	A	AT	CATATATCATGTATTTTTTTT TGG (SEQ ID NO: 64)	CATATATCATGTATTTTTTTTTT G (SEQ ID NO: 65)
7387	T	TC	TACGCCGCTCGTCCTCCCCC CCCCCCT (SEQ ID NO: 66)	TACGCCGCTCGTCCTCCCCCCCC CCCCCCT (SEQ ID NO: 67)
7720	CT	C	CATCTTTTCATGCTTTTTTTT GTCTTGGTTGTGATG (SEQ ID NO: 68)	CATCTTTTCATGCTTTTTTTGTCT TGGTTGTGATG (SEQ ID NO: 69)
8656	A	G	CCTGTTCAAAGTATTATGCG CAGCACAGCCA (SEQ ID NO: 70)	CCTGTTCAAAGTATTGTGCGCAG CACAGCCA (SEQ ID NO: 71)
8870	GC	G	GTCTCCCTACTCCAGCCGGT CGCAGGTGCAC (SEQ ID NO: 72)	GTCTCCCTACTCCAGCGGTGCA GGTGCAC (SEQ ID NO: 73)
9064	AC	A	AATTTCTGAATTTTACCGG AAGACAGCGG (SEQ ID NO: 74)	AATTTCTGAATTTTACCGGAAGA CAGCGG (SEQ ID NO: 75)

### Пример 3. Количественный ELISA для обнаружения белков, ассоциированных с признаком

Для обнаружения различных белков, ассоциированных с признаком, применяли два моноклональных антитела, вырабатываемых против каждого белка. Образцы получали из листьев трансгенных объектов и экстрагировали в фосфатно-солевом буферном растворе, pH 7,3 (PBS), содержащем 0,05% Tween-20 (PBST). Общий растворимый белок (TSP) в экстракте измеряли с применением анализа для определения белков с помощью BCA от Pierce (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). Планшеты из полистирола с высокой степенью связывания (Nunc Maxisorp № 430341) покрывали при 4°C на протяжении ночи с помощью 1 мкг/мл специфического моноклонального антитела (MAb) в 25 mM бората, 75 mM NaCl, pH 8,5. Планшеты пять раз промывали с помощью PBST. В планшет добавляли образцы или стандарты в разбавителе для ELISA (PBST, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина) (100 мкл/лунка), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) со встряхиванием и промывали пять раз. Затем в планшет добавляли меченное посредством HRP вторичное MAb (100 мкл/лунка), разведенное с концентрацией 1/10000 в разбавителе для ELISA, инкубировали в течение 1 ч при температуре окружающей среды со встряхиванием и промывали, как описано выше. Добавляли субстрат тетраметилбензидин (SurModics, Иден-Прери, Миннесота, США) (100 мкл/лунка) и оставляли для проявления цвета в течение 15-30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Реакцию останавливали с применением 1 н HCl (100 мкл/лунка). Поглощение измеряли при 450 нм с применением микропланшет-ридера (BioTek Powerwave XS2, Винуски, Вермонт, США). Для построения стандартной кривой применяли четырехпараметрический подбор кривой с отложением на графике концентраций в зависимости от поглощения. Для стандартизации эффективности экстракции концентрацию каждого анализируемого вещества делили на концентрацию общего растворимого белка (TSP).

**Таблица 4. Обобщение данных экспрессии, определенных методом ELISA**

ИД конструкции	Число объектов	нг eCry1Gb.1Ig/мг TSP (среднее значение)	нг eCry1Gb.1Ig/мг TSP (диапазон)
24795	257	23	1-121
23698	43	57	30-125
24530	13	0,4	0,1-0,8

24534	29	0,9	0,3-2,3
25628	16	0	NA

Неожиданным образом с помощью конструкций 24530, 24534 и 25628 получали объекты только с очень низкой экспрессией или с отсутствием экспрессии белка, ассоциированного с признаком, даже несмотря на то, что последовательность белка, ассоциированного с признаком, была спарена с промотором, который, как ожидалось, должен был быть средним или сильным промотором.

#### Пример 4. Тестирование эффективности в теплице

С помощью анализа методом ELISA, который описан в примере 3, подтвердили, что 279 трансгенных объектов кукурузы, полученных с помощью конструкции 24795, характеризуются вставкой одной копии tDNA и экспрессией белка, ассоциированного с признаком. Из этой популяции для биоанализа отбирали 45 трансгенных объектов кукурузы, полученных с помощью конструкции 24795, а также трансгенные объекты кукурузы, полученные с помощью других конструкций, упомянутых в таблице 4.

Отобранные объекты отражали диапазон экспрессии eCry1Gb.1Ig, содержащий смесь объектов с низким, средним и высоким уровнем экспрессии. Отбор образцов для биоанализа состоял из биоанализа отделенных листьев, при котором из растения вырезали часть листа, помещали его в чашку Петри с фильтровальной подушкой, смоченной стерильной водой, и заражали с помощью примерно 10 новорожденных личинок кукурузной листовой совки (*Spodoptera frugiperda*). Образцы инкубировали при температуре окружающей среды в лаборатории и оценивали через 5 дней после заражения. Каждый образец оценивали в отношении процентной доли защиты листа (шкала в диапазоне 1-5) и смертности насекомых (шкала в диапазоне 1-3). Объекты, которые получили ранговую оценку в процентной доле защиты листа, составляющую 1 или 2 (т. е. менее 5% повреждения вырезанного листового диска), и обеспечивали 100% смертности новорожденных личинок, считались эффективными и использовались в качестве эталона сравнения для оценки характеристик конструкции. Полученные в биоанализе данные для 45 протестированных объектов экстраполировали на те объекты, у которых экспрессия кодирующего признак гена была аналогичной, в результате чего в общей сложности 6524795 объектов соответствовали критериям эффективности и экспрессии и были подвергнуты дальнейшему исследованию характеристик. Объекты, полученные с помощью конструкций 23698, 24530, 24534 и

25628, не соответствовали критериям эффективности и экспрессии; данные конструкции не были отобраны для дальнейшего исследования.

#### **Пример 5. Тесты эффективности в полевых условиях**

5            В полевых циклах в Аргентине тестировали 24 трансгенных объекта кукурузы, полученные с помощью конструкции 24795. Объекты высаживали рядами на одном участке с 3 повторами каждого. Ранговую оценку по поражению листьев кукурузной листовой совкой (*Spodoptera frugiperda*) производили на восьми растениях в каждом ряду. Повреждение листьев оценивали с применением шкалы Дэвиса в диапазоне 0-9

10 (Davis, F.M. & Williams, W.P. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station, Technical Bulletin 186, Mississippi State University, MS39762, USA.). 14 из 24 объектов, полученных с помощью вышеуказанной конструкции, характеризовались приемлемой эффективностью в отношении кукурузной листовой совки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая на по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или комплементарной ей последовательности, где последовательность нуклеиновой кислоты кодирует полипептид, содержащий последовательность под SEQ ID NO: 4.
2. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под SEQ ID NO: 3.
3. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31.
4. Молекула нуклеиновой кислоты по п. 1, где молекула нуклеиновой кислоты является выделенной.
5. Вектор на основе рекомбинантной нуклеиновой кислоты, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3.
6. Трансгенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3.
7. Трансгенная клетка-хозяин по п. 6, где клетка представляет собой бактериальную клетку или растительную клетку.
8. Трансгенная клетка-хозяин по п. 7, где клетка представляет собой бактериальную клетку, и бактериальная клетка представляет собой клетку *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium ssp.* или *Pseudomonas ssp.*
9. Трансгенная клетка-хозяин по п. 7, где клетка представляет собой растительную клетку, и растительная клетка представляет собой клетку маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной

травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя или масличного рапса.

5 10. Трансгенная клетка-хозяин по п. 9, где растительная клетка представляет собой клетку маиса.

11. Трансгенное растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3.

10 12. Трансгенное растение по п. 11, где растение представляет собой однодольное растение.

13. Трансгенное растение по п. 11, где растение представляет собой двудольное растение.

15 14. Трансгенное растение по п. 11, где растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, томата, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя и масличного рапса.

20 15. Трансгенное целое растение маиса, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по п. 3.

25 16. Потомок любого поколения растения по п. 15, где потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

17. Часть для вегетативного размножения из растения по п. 15, где часть для вегетативного размножения содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

30 18. Часть растения из растения по п. 15, где часть растения содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

19. Часть растения по п. 18, где часть растения представляет собой семя.

20. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий введение в растение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3 с получением тем самым трансгенного растения, где молекула нуклеиновой кислоты обеспечивает экспрессию белка в эффективных для контроля насекомых количествах.

21. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии:

- а) обеспечения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3;
- б) введения в растение, культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты из стадии (а) с получением трансформированного растения, трансформированной культуры тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и
- в) выращивания трансформированного растения или регенерации трансформированного растения из трансформированной культуры тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами.

22. Способ получения трансгенного семени, предусматривающий стадии:

- а) получения фертильного трансгенного растения по любому из пп. 11-15 и
- б) выращивания растения в подходящих условиях с получением трансгенного семени.

23. Способ получения потомка любого поколения фертильного трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии:

- а) получения фертильного трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3;
- б) сбора трансгенного семени от трансгенного растения;
- в) посева собранного трансгенного семени и
- г) выращивания трансгенных растений-потомков из семени, где потомок характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами по сравнению с нетрансформированным растением.

24. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где первое или второе родительское растение представляет собой растение по любому из пп. 11-15, с получением растения-потомка первого поколения, которое содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

25. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии:

а) полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где первое или второе родительское растение представляет собой растение по любому из пп. 11-15; и

б) отбор растения-потомка первого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами, где выбранное растение-потомок содержит молекулу нуклеиновой кислоты.

26. Способ по п. 25, дополнительно предусматривающий стадии:

а) обеспечения самоопыления растения-потомка первого поколения с получением тем самым совокупности растений-потомков второго поколения и

б) отбора из растений-потомков второго поколения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, где выбранные растения-потомки второго поколения содержат молекулу нуклеиновой кислоты.

27. Способ контроля вредителя, относящегося к чешуекрылым, предусматривающий питание вредителя растением или частью растения, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3.

28. Способ по п. 27, где вредитель, относящийся к чешуекрылым, представляет собой вредителя *Spodoptera frugiperda* (кукурузная листовая совка).

29. Способ получения товарного растительного продукта, при этом способ предусматривает применение растения по любому из пп. 11-15 с получением из него указанного товарного растительного продукта.

30. Способ по п. 29, где товарный растительный продукт представляет собой зерно, крахмал, масло из семян, патоку, муку тонкого помола, муку грубого помола, крахмал, крупу или белок.

5 31. Способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает:

(а) приведение образца в контакт с парой праймеров, которые при применении в реакции амплификации нуклеиновой кислоты с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, образуют ампликон, который является

10 диагностическим в отношении молекулы нуклеиновой кислоты;

(b) проведение реакции амплификации нуклеиновой кислоты с получением тем самым ампликона и

(с) обнаружение ампликона.

15 32. Способ обнаружения присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце, при этом способ предусматривает:

(а) приведение образца в контакт с зондом, который гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, и не гибридизуется в условиях высокой жесткости с ДНК контрольного

20 растения маиса, не содержащего молекулу нуклеиновой кислоты;

(b) воздействие на образец и зонд условий гибридизации высокой жесткости и

(с) обнаружение гибридизации зонда с молекулой нуклеиновой кислоты.

25 33. Пара полинуклеотидных праймеров, содержащая первый полинуклеотидный праймер и второй полинуклеотидный праймер, которые действуют совместно в присутствии молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3 в образце с образованием ампликона, диагностического в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты в образце.

30 34. Пара полинуклеотидных праймеров по п. 33, где первый полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31, а второй полинуклеотидный праймер содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов,

которые комплементарны обратной комплементарной последовательности для последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31.

5 35. Набор для обнаружения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, при этом набор содержит по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты из смежных нуклеотидов с достаточной длиной, чтобы она действовала в качестве праймера или зонда в способе обнаружения нуклеиновой кислоты, и которая после амплификации или гибридизации с целевой последовательностью нуклеиновой кислоты в образце с последующим обнаружением ампликона или гибридизации с целевой последовательностью является диагностической в отношении присутствия молекулы нуклеиновой кислоты.

15 36. Набор по п. 35, где по меньшей мере одна молекула нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере 10 смежных нуклеотидов, которые комплементарны последовательности под любым из SEQ ID NO: 1 или 8-31.

20 37. Способ, предусматривающий введение модификации в молекулу нуклеиновой кислоты, присутствующую в трансгенной клетке-хозяине по любому из пп. 6-10 или трансгенном растении по любому из пп. 11-15, с получением тем самым модифицированной трансгенной клетки-хозяина или модифицированного трансгенного растения.

25 38. Способ по п. 37, где модификация представляет собой делецию, вставку, замену, дупликацию или инверсию или их комбинацию.

39. Способ по п. 38, где модификация предусматривает делецию части или всей кодирующей последовательности селективируемого маркера, присутствующей в молекуле нуклеиновой кислоты.

30 40. Способ по любому из пп. 37-39, где модификацию вводят с применением нуклеазы или гомологичной рекомбинации или их комбинации.

41. Способ по п. 40, где нуклеаза представляет собой нуклеазу CRISPR-Cas.

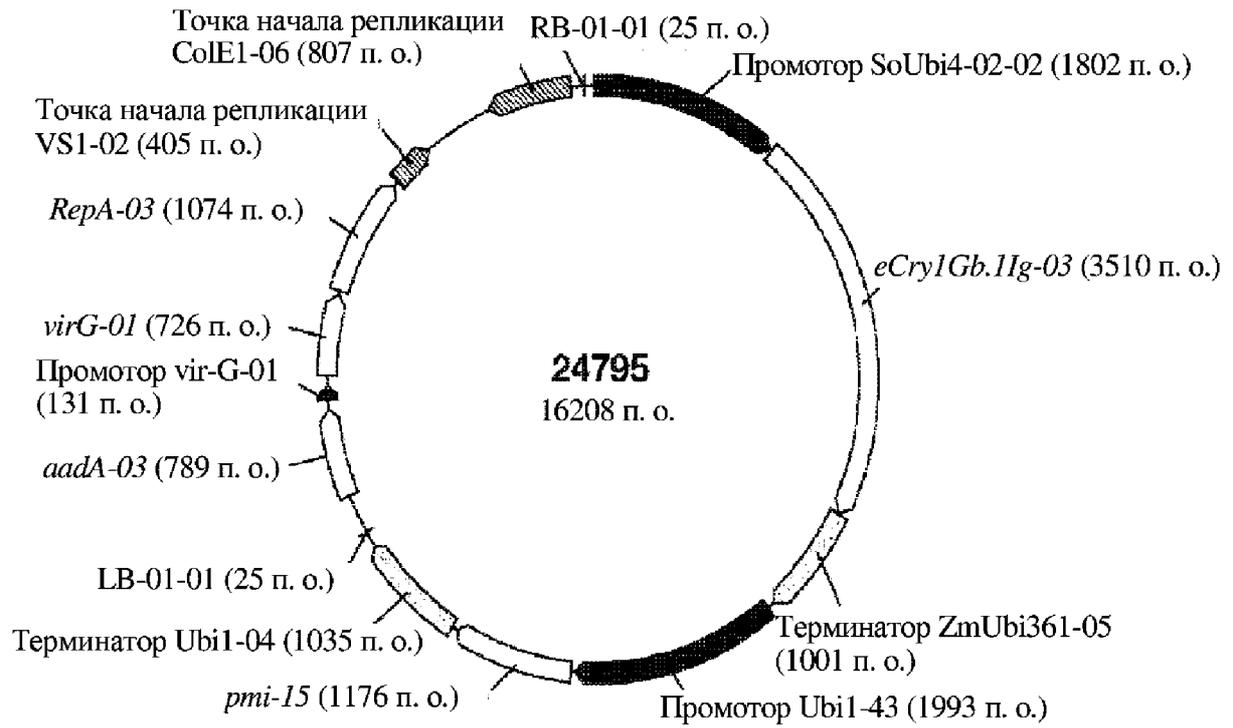
42. Способ по любому из пп. 37-41, где способ дополнительно предусматривает получение растения из модифицированной трансгенной клетки-хозяина и обеспечение самоопыления или скрещивание растения с другим растением с получением тем самым модифицированного трансгенного растения-потомка.

5

43. Способ по любому из пп. 37-41, где способ дополнительно предусматривает обеспечение самоопыления или скрещивание модифицированного трансгенного растения с другим растением с получением тем самым модифицированного трансгенного растения-потомка.

10

44. Способ по п. 42 или п. 43, где способ дополнительно предусматривает обеспечение самоопыления или ауткроссинг модифицированного трансгенного растения-потомка в течение по меньшей мере одного дополнительного поколения.



Фиг. 1