

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491657** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.09.10

(51) Int. Cl. *A01H 1/00* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2023.01.13

(54) **МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *Lox3* И УСТОЙЧИВОСТЬ К СОВКАМ**

(31) **63/299,628; 22153142.9**

(32) **2022.01.14; 2022.01.25**

(33) **US; EP**

(86) **PCT/EP2023/050685**

(87) **WO 2023/135231 2023.07.20**

(71) Заявитель:
КВС ЗААТ СЕ & КО. КГАА (DE)

(72) Изобретатель:
**Бак Аурели (US), Шталь Диемар,
Штирнвейс Даниэль, Шойерманн
Даниэла, Кессель Беттина (DE)**

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(57) В настоящей заявке представлена новая технология придания растениям устойчивости или повышения их устойчивости к насекомым и, как вариант, к грибковым патогенам. В частности, настоящее изобретение предоставляет способ придания кукурузе и масличному рапсу (OSR) устойчивости или толерантности, или повышения их устойчивости или толерантности к насекомым и, необязательно, к грибковым патогенам путем нацеливания на эндогенный ген *Lox3*. Далее, предоставляются устойчивые или толерантные растения, клетки, ткани, органы или семена кукурузы, или масличного рапса, которые получены или могут быть получены с помощью способа, в соответствии с настоящим изобретением. Также, представлены экспрессионные конструкции и векторы для различных подходов, описанных в настоящем документе, а также использование таких конструкций и методов для придания растениям устойчивости или повышения их устойчивости к насекомым и, необязательно, к грибкам.

A1

202491657

202491657

A1

Модуляция экспрессии гена *Lox3* и устойчивость к совкам

Область техники, к которой относится изобретение

В настоящей заявке представлена новая технология, с помощью которой растениям придается устойчивость к насекомым и, как вариант, устойчивость к грибковым патогенам или, с помощью которой, повышается такая устойчивость растений. В частности, настоящее изобретение предлагает способ придания растениям кукурузы и масличного рапса (OSR) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к насекомым и, необязательно, к грибковым патогенам путем воздействия на эндогенный ген *Lox3*. Путем введения либо конструкции для подавления экспрессии генов, либо системы редактирования генома, либо модификации генома, которые приводят к целенаправленному нокадауну или нокауту эндогенного для растения гена *Lox3*, можно создать или повысить устойчивость растений к насекомым и, необязательно, к грибковым патогенам. Далее, могут быть предоставлены устойчивые или толерантные растения кукурузы или растения масличного рапса, их клетки, ткани, органы или семена, которые получены или могут быть получены с помощью способов, в соответствии с настоящим изобретением. Также, в настоящем изобретении, представлены экспрессионные конструкции и векторы для различных подходов, описанных в настоящем документе, а также представлено использование таких конструкций и методов для придания растениям устойчивости или повышения их устойчивости к насекомым и, необязательно, к грибковым заболеваниям.

Предпосылки создания изобретения

В природе существует большое разнообразие организмов, вызывающих заболевания растений и/или иным образом негативно влияющих на здоровье растений. Такие патогены можно разделить на (i) инфекционные организмы, к которым относятся грибы, оомицеты, бактерии, вирусы, вириды, вирусоподобные организмы, фитоплазмы, простейшие, нематоды и растения-паразиты, и (ii) эктопаразиты, к которым относятся насекомые, клещи, позвоночные и другие вредители, отрицательно влияющие на здоровье растений из-за поедания ими их растительных тканей.

Мониторинг и обеспечение здоровья растений как в естественных, так и в культивируемых популяциях представляют собой первостепенные задачи для обеспечения надежных

поставок продуктов питания и большого количества товаров в глобальном масштабе. В совокупности, вредители и болезни растений ежегодно вызывают до 40 % потерь урожая. Соответственно, в истории существует множество примеров, демонстрирующих серьезное воздействие болезней растений на общество.

В качестве примера можно привести великий голод в Ирландии в период с 1845 по 1852 год, в результате которого погибло около 1 миллиона человек и картофельный голод в Хайленде в период с 1846 по 1856 год. Непосредственной причиной этого голода был фитофтороз картофеля, серьезное заболевание картофеля и томатов, вызываемое оомицетом *Phytophthora infestans*.

В период с 2010 по 2011 год, на западе США были безвозвратно потеряны 750 000 гектаров деревьев из-за заражения южным сосновым лубоедом. Это заражение было (по меньшей мере частично) вызвано засухой, поскольку активности этих насекомых обычно способствует более теплый климат. Кроме прочего, засуха делает ткани растений еще более питательными для насекомых, поскольку при недостатке воды содержащиеся в деревьях аминокислоты концентрируются. Соответственно, угроза, исходящая от насекомых для сельскохозяйственных культур, возрастает по мере развития глобального потепления.

Насекомые являются одними из наиболее опасных организмов, которые нападают на сельскохозяйственные и садовые культуры и наносят им существенный ущерб. Ущерб, который они причиняют, двоякий: (i) прямой ущерб из-за повреждений, которые они наносят растению, например, поедая растительные ткани, и (ii) косвенный ущерб, вызванный грибковыми, бактериальными или вирусными инфекциями, которые они переносят. В настоящее время, в среднем 15% урожая в мире погибает исключительно из-за насекомых. В то же время урожайность сельскохозяйственных культур необходимо увеличить как минимум на 40 %, чтобы иметь возможность надежно прокормить население численностью около 9 миллиардов человек, которое, по прогнозам, будет населять Землю к 2050 году.

В классе насекомых особенно актуальным видом, причиняющим вред растениям, является гусеница кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) отряда чешуекрылых (*Lepidoptera*), которая представляет собой личиночную стадию кукурузной лиственной совки. Это насекомое демонстрирует крупномасштабное инвазивное поведение и

считается вредителем, который может повредить и даже уничтожить самые разнообразные сельскохозяйственные культуры, нанося большой экономический ущерб. Гусеница кукурузной лиственной совки – это один из самых вредоносных вредителей кукурузы (*Zea mays*). Географически, кукурузная лиственная совка распространена в восточной и центральной частях Северной Америки и в Южной Америке. Из-за своей восприимчивости к более низким температурам, это насекомое может пережить зиму только в самых южных регионах Соединенных Штатов, а именно в Техасе и Флориде. Однако, в сезон, насекомое распространяется по восточной части Соединенных Штатов, вплоть до южной Канады. Модель CLIMEX потенциального глобального распространения этого вида показала, что большая часть потенциального ареала распространения насекомого находится в Европе, Южной Африке, Китае и Австралии. За последние годы, кукурузная лиственная совка уже была обнаружена как минимум в 28 странах Африки (например, в Гане, Того, Бенине, Нигерии и Сан-Томе и Принсипи), в Азии (например, в китайской провинции Юньнань и, как минимум, в 25 других китайских провинциях), в Индии, Шри-Ланке и Бангладеш) и по всему австралийскому континенту (например, в Западной Австралии, Квинсленде, Северной территории, Новом Южном Уэльсе, Северном Квинсленде и на островах Торресова пролива).

Глобальное распространение кукурузной лиственной совки чревато в дальнейшем серьезным экономическим ущербом. Например, в 2016 году, насекомое нанесло значительный ущерб посевам кукурузы в Африке. Кроме прочего, сообщалось о сильном заражении гусеницей кукурузной лиственной совки плантаций в Шри-Ланке, а в 2020 году насекомое достигло северо-восточного кукурузного пояса Китая, и Министерство сельского хозяйства и сельских дел Китайской Народной Республики оценило ситуацию как "очень серьезную". Ожидается, что заражение гусеницей кукурузной лиственной совки, также, серьезно скажется на шерстяной промышленности Австралии, поскольку насекомое питается всеми основными пастбищными растениями.

Еще одним чрезвычайно актуальным видом насекомых, наносящим серьезный ущерб растениям, является кукурузная цикадка *Dalbulus maidis* из отряда полужесткокрылых (*Hemiptera*). Этот вид широко распространен в большинстве тропических и субтропических регионов Земли, включая Юго-Восточную Азию и Китай, Австралию, Африку, а также Северную и Южную Америку. Кукурузная цикадка *Dalbulus maidis* является преимущественно вредителем кукурузы и ее родственников, имеющих большое

экономическое значение. Помимо прямого ущерба, причиняемого травоядным образом жизни, кукурузная цикадка *Dalbulus maidis*, также, является переносчиком нескольких видоспецифичных вирусов кукурузы, таких как вирус полосатости кукурузы (MSV), вирус мозаики кукурузы (MMV) и вирус штриховатости кукурузы (MStV). Последние два являются патогенными вирусами, которые могут снизить урожайность сельскохозяйственных культур на 9–90 %. Высказывались даже предположения, что распространение кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* вместе с вирусом мозаики кукурузы (MMV) и вирусом штриховатости кукурузы (MStV) в Новый Свет способствовало распаду цивилизации майя. Заражение кукурузной цикадкой *Dalbulus maidis* приводит к физическому повреждению растения, поскольку насекомое прокалывает сосудистую ткань растения, чтобы питаться выделяющимся соком. В конечном итоге это повреждение приводит к пожелтению листьев, увяданию, слабости стебля и, наконец, к гибели растения. Пищевое поведение одной лишь кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* может привести к потере урожая на 10–15%.

Еще одним типичным видом насекомых, имеющим большое влияние на повреждение растений, является глобально распространенная зеленая персиковая тля (*Myzus persicae*), которая является самым серьезным вредителем персиковых деревьев и, как известно, поражает более 240 видов растений из 64 различных семейств. В результате заражения зеленой персиковой тлей (*Myzus persicae*), у персиковых деревьев наблюдается замедление роста, сморщивание листьев и отмирание различных тканей. Но длительное заражение зеленой персиковой тлей (*Myzus persicae*) может привести к резкому снижению урожая и различных корнеплодов, и листовых культур. Кроме того, зеленая персиковая тля (*Myzus persicae*) может стать серьезной проблемой для урожая масличного рапса. Например, осенью 2018 года было зарегистрировано сильное заражение рапса зеленой персиковой тлей (*Myzus persicae*) в юго-восточной части Румынии. При этом заражении была зарегистрирована высокая плотность вредителей - 243 особи тли на лист рапса. Кроме прочего, зеленая персиковая тля (*Myzus persicae*) действует как переносчик вирусов растений, таких как потивирус перца, Y потивирус картофеля (PVY), вирус гравировки табака (TEV) и вирус огуречной мозаики (CMV), которые могут передаваться многим разным продовольственным культурам.

Зеленый вонючий клоп *Dichelops melacanthus* является основным вредителем кукурузы и пшеницы - двух наиболее важных сельскохозяйственных культур в глобальном масштабе.

Он распространен почти по всей Южной Америке и поражает не менее 29 видов растений. Помимо кукурузы и пшеницы, другие культуры, имеющие большое экономическое значение, которые поражает этот клоп включают сою, овес и тритикале. На ранних стадиях жизни растений, ущерб, причиняемый зеленым вонючим клопом *Dichelops melacanthus*, может быть особенно серьезным, поскольку насекомое физически повреждает сосудистую ткань, чтобы питаться соком, и тем самым, возможно, вводит токсичные ферменты слюны в основание стебля растения. Со временем это приводит к увяданию листьев, увяданию самого растения и, наконец, к его гибели.

Грибы и грибоподобные организмы являются самыми многочисленными патогенами растений и вызывают широкий спектр болезней растений, которые, по некоторым данным, приводят и к 100% потере урожая. Например, большинство болезней овощных культур вызваны грибковыми инфекциями. Среди причин многочисленности грибковых инфекций, одной из ключевых является возможность их распространения через воду и с помощью ветра, а также через зараженную почву, с помощью животных, через саженцы и другие растительные материалы. Грибы проникают в растения через естественные отверстия, такие как устьица и через раны, вызванные, например, обрезкой, сбором урожая, насекомыми, градом и другими причинами появления механических повреждений.

Leptosphaeria maculans (анаморф: *Phoma lingam*) - это глобально распространенный грибковый патоген из отдела царства грибов аскомицеты (*Ascomycota*), который является возбудителем почернения корневой шейки или болезни черной ножки у культур рода капусты (*Brassica*). Гриб способен проникать непосредственно в корни растений. Симптомы заболевания черной ножки включают почернение корневой шейки, небольшие серые поражения на листьях и корневую гниль. Почернение корневой шейки является основной причиной резкого снижения урожайности. *Leptosphaeria maculans* поражает множество видов культур рода капустных (*Brassica*), включая масличный рапс (*Brassica napus*) и капусту огородную (*Brassica oleracea*). Грибковый патоген особенно болезнетворен на масличном рапсе. Заражение может привести к снижению урожайности примерно на 10-20 %. Выделение аскоспор *Leptosphaeria maculans* обычно происходит с сентября по ноябрь при умеренной температуре в пределах от 8 °C до 15 °C и относительно высокой влажности. В это время сельскохозяйственный масличный рапс наиболее уязвим.

Другим, экономически влияющим на урожайность грибковым патогеном растений является *Plasmiodiophora brassicae*, относящийся к классу *Phytophthora* и вызывающий килу у большинства растений семейства крестоцветных (*Brassicaceae*). Симптомы килы включают образование наростов и гипертрофирования скрытых корней растения, придавая им форму булавы или веретена. У капусты такое воздействие на корни приводит к замедлению роста кочана или даже к полному отсутствию роста кочана, что часто сопровождается снижением жизнеспособности и гибелью растения. Другие симптомы включают увядание, пожелтение и задержку роста растения. В конце XIX века сильные эпидемии килы привели к потере значительной части урожая капусты в Санкт-Петербурге. В настоящее время кила по-прежнему является заболеванием, имеющим большое экономическое влияние и поражающим примерно 10 % посевных площадей. Заболевание может поражать целые поля, что значительно снижает урожайность и даже приводит к полному отсутствию урожая. На полях, патоген может сохраняться в течение многих лет в виде покоящихся спор.

Следовательно, существует острая и быстрорастущая потребность в эффективных стратегиях минимизации и ограничения экономического ущерба, причиняемого патогенами растений.

Наиболее часто для защиты от насекомых используются различные инсектициды. В южных регионах для борьбы с гусеницей кукурузной лиственной совки, кукурузу приходится обрабатывать инсектицидами каждый день. В 2020 году в Австралии в экстренном порядке был одобрен биопестицид-вирус, специфичный для гусениц, предназначенный для борьбы с гусеницей кукурузной лиственной совки. Для этой же цели используются и различные паразитоиды (например, оса *Trichogramma pretiosum*). Использование инсектицидов имеет множество недостатков. Например, многие инсектициды неизбирательно наносят вред или даже уничтожают другие виды, помимо целевых. Ярким примером этого явления является наблюдаемое сокращение численности опылителей, таких как пчелы, из-за синдрома разрушения пчелиных семей (колоний) (CCD). На пищевое поведение пчел могут повлиять даже сублетальные количества инсектицидов. Гибель же опылителей приводит к снижению урожайности сельскохозяйственных культур. Кроме того, при поедании растений или насекомых, находившихся в контакте с инсектицидами, могут погибать птицы. Популяции насекомоядных птиц также сокращаются из-за сокращения популяций насекомых, являющихся их пищей. В частности, считается, что распыление инсектицидов

на кукурузу и пшеницу в Европе привело к сокращению численности летающих насекомых примерно на 80%, что, в свою очередь, привело к сокращению европейской популяции птиц на одну-две трети. Сток неправильно применяемых инсектицидов и их способность к просачиванию могут негативно повлиять на качество водных источников и нанести вред экологии, что оказывает косвенное воздействие на человеческую популяцию посредством биомагнификации и биоаккумуляции.

В качестве альтернативы, для борьбы с насекомыми применяются различные агротехнические приемы, например, ранняя посадка, избегание шахматной посадки и чередование культур. Эти стратегии требуют больших затрат средств и времени, не могут применяться повсеместно из-за экологических ограничений и, следовательно, несут в себе ряд рисков. Например, чередование культур успешно применялось против гусеницы кукурузной лиственной совки в небольших тепличных, садовых и полевых экспериментах. Однако, в более крупных коммерческих масштабах, с помощью этого метода можно снизить ущерб, наносимый вредителями лишь для очень небольшой части культурных растений.

Грибковые заболевания растений можно контролировать с помощью фунгицидов и с применением различных других сельскохозяйственных методов. Обычно, применяемые фунгициды включают фунгициды-ингибиторы биосинтеза эргостерола (EBI) и метилбензимидазол-2-ил карбамата (MBC), которые могут снизить количество заболеваний в популяциях сельскохозяйственных культур. Однако, использование фунгицидов имеет такие же, описанные выше недостатки, как и использование инсектицидов. Кроме того, некоторые фунгициды также отрицательно влияют на общий рост сельскохозяйственных культур. Агротехнические методы включают удаление стерни и севооборот. Было доказано, что удаление стерни снижает риск заражения *Leptosphaeria maculans* у видов рода капустных (*Brassica*). Также, было доказано, что севооборот снижает риск возникновения черной ножки при выращивании рапса.

Учитывая трудности при применении сельскохозяйственных и химических методов и их недостатки в деле снижения заражаемости и инфицирования растений, в сфере генной инженерии прилагаются значительные усилия, направленные на оптимизацию культурных растений, с целью сделать их более устойчивыми к условиям окружающей среды и к вредителям.

Известно, что у кукурузы и других культурных растений, липоксигеназный (Lox) путь играет определенную роль в обеспечении устойчивости растений к патогенам. Однако предыдущие исследования показали, что фактическая функция липоксигеназного (Lox) пути в отношении устойчивости к определенным патогенам крайне непредсказуема из-за чрезвычайно высокой степени специфичности и хозяина, и патогена, до такой степени, что в пределах одного и того же вида хозяина, метаболизм, обусловленный Lox, может оказывать и совершенно противоположное влияние на устойчивость к патогенам, в зависимости от вида самого патогена.

В липоксигеназном (Lox) пути различные высокоспециализированные формы липоксигеназ катализируют синтез гидропероксида полиненасыщенных жирных кислот, которые являются субстратами по меньшей мере для семи различных семейств ферментов. Например, было продемонстрировано, что растительные оксипирины, образующиеся в результате липоксигеназного (Lox) пути, функционируют как экологически- и развитие-регулируемые сигналы защиты и развития. Также было продемонстрировано, что эти молекулы функционируют как мощные регуляторы спорогенеза и биосинтеза микотоксинов у грибов. В частности, было продемонстрировано, что гидропероксиды жирных кислот, полученные из 9-Lox, вызывают конидиацию и выработку микотоксинов.

В 2007 году Gao и др. (MPMI, vol. 20, No. 8, 2007, pp. 922-933) создали мутанты кукурузы, лишенные функционального 9-Lox, путем нарушения работы *ZmLox3* (гена, кодирующего 9-Lox) посредством транспозонного мутагенеза. Соответственно, наблюдалось снижение уровня 9-Lox-производных гидропероксидов. Вследствие этого, в ядрах *lox3*-мутантов наблюдалось снижение конидиации и уменьшение производства микотоксина фумонизина В1 гриба *Fusarium verticillioides*, в сравнении с диким типом. Кроме того, *lox3*-мутанты продемонстрировали снижение тяжести таких различных заболеваний, вызванных грибами, как антракнозная пятнистость (*Colletotrichum graminicola*), пятнистость, вызванная *Cochliobolus heterostrophus* и заболеваний, вызывающих стеблевую гниль (вызванных *Fusarium verticillioides* и *Colletotrichum graminicola*). На основании полученных данных, был сделан вывод, что метаболизм на основе 9-LOX, очевидно, необходим для патогенеза грибов, включая такие стадии, как развитие заболевания и производство спор и микотоксинов.

Однако, в 2008 году Gao и др. (MPMI, vol. 21, No. 1, 2008, pp. 98-109) продемонстрировали, что мутанты кукурузы с нокаутом *lox3-4* демонстрируют повышенную привлекательность для галловых нематод *Meloidogyne incognita*. Они заметили, что ген фенилаланин-аммиак лиазы (PAL) мутантов с нокаутом *lox3-4* не индуцируется зависимым от корневых нематод способом. Это позволяет предположить, что метаболизм, опосредованный фенилаланин-аммиак лиазой (PAL), имеет важное значение для придания устойчивости к галловой нематод. Более того, у мутантов с нокаутом *lox3-4* наблюдалось специфическое для корней увеличение содержания жасмоновой кислоты, этилена и салициловой кислоты, а также сверхэкспрессия соответствующих биосинтетических генов. Следовательно, метаболический путь, опосредованный ZmLox3, очевидно, необходим для трех основных сигнальных путей защиты для придания устойчивости к нематодам.

Поэтому существует большая потребность в определении новых молекулярных механизмов повышения толерантности или устойчивости основных сельскохозяйственных растений, включая кукурузу, масличный рапс и другие, к их когнитивным и специфическим патогенам, путем специального изучения и контроля эндогенных сигнальных путей для оптимизации защиты растений от патогенов и, следовательно, повышения их урожайности. Определив новые способы влияния и контроля Lox3-путей в различных сельскохозяйственных культурах в ответ на действие некоторых специфических патогенных насекомых и грибов, которые вызывают специфическую реакцию у соответствующего целевого растения, цели придания растениям устойчивости или толерантности, или повышения их устойчивости или толерантности могут быть достигнуты с помощью способов, представленных и раскрытых ниже.

Раскрытие изобретения

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу придания растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) или масличного рапса (*OSR*) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к таким патогенам, как насекомые, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совке (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к таким патогенам, как грибы, в частности, к видам фузариум (*Fusarium*), включающему следующие этапы:

- (i) обеспечение по меньшей мере одной растительной клетки, предпочтительно клетки растения кукурузы или клетки растения масличного рапса;

- (ii) введение по меньшей мере в одну растительную клетку по меньшей мере одной конструкции подавляющей ген по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, что приводит к целенаправленному нокдауну или нокауту гена Lox3, эндогенного для растения;
- (iii) получение по меньшей мере одной модифицированной растительной клетки с пониженной или отмененной экспрессией гена Lox3; и
- (iv) получение по меньшей мере одной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени со сниженной или отмененной экспрессией гена Lox3, необязательно после дополнительного этапа регенерации растительной ткани, органа, растения или семени из по меньшей мере одной модифицированной клетки.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ заключается в придании или повышении устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* или огневки кукурузной (*Ostrinia nubilalis*), и/или предпочтительно, если способ заключается в придании или в повышении устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis* в кукурузе (*Zea mays*).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ предназначен для придания растению устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, ген Lox3 представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88, соответственно, или где ген Lox3 представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86, соответственно.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, ген Lox3 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89, соответственно, или где ген Lox3 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82, соответственно.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, согласно любому из выше описанных способов осуществления, на этапе (ii), в по меньшей мере одну растительную клетку вводят конструкцию, нацеленную на ген Lox3 для подавления экспрессии генов, где конструкция представляет собой конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), или, где конструкция кодирует конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген Lox3, причем конструкция для РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку,

(a) где смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по

меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4, необязательно, где конструкцию вводят по меньшей мере в одну растительную клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинации.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), в по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов, предпочтительно, если конструкцию вводят как часть вектора, который вводится в растительную клетку и который включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5 или который состоит из такой последовательности.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii) в по меньшей мере одну клетку вводится по меньшей мере одна система редактирования генома,

конструкция которой нацелена на ген *Lox3*, при этом по меньшей мере одна система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере, одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, хотя бы одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем; и

необязательно, где по меньшей мере одна система редактирования генома вводится в, по меньшей мере одну клетку кукурузы или масличного рапса (OSR) путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой или трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинацией.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii) проводят мутагенез для получения по меньшей мере одной модификации генома на одной клетке или на множестве клеток путем применения химических веществ или облучения, предпочтительно, когда алкилирующий агент, включая этилметансульфонат, наносится на одну или на множество клеток, с целью индуцировать мутагенез.

В дополнительном варианте осуществления выше описанного способа настоящего изобретения, на этапе (ii) в ген *Lox3* встраивают одну или несколько мутаций и идентифицируют их методом TILLING и/или на этапе (ii) в гене *Lox3* отбирают одну или несколько клеток с нокдаун- или нокаут-мутациями.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке, ткани, органу, растению или семени кукурузы, или масличного рапса (OSR), полученным или получаемым способом согласно любому из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, которая нацелена на ген *Lox3* в кукурузе или масличном рапсе (OSR) с целью подавления гена, причем такая конструкция кодирует конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), содержащую смысловую и антисмысловую последовательность, нацеленную на ген *Lox3*, эндогенный для растений кукурузы или масличного рапса (OSR), причем конструкция для РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку, где

(а) смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или необязательно где РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3; и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к конструкции шпильки РНКи для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) или растениям масличного рапса (OSR) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности к такому патогену, как насекомое, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности к видам Фузариум (*Fusarium*), или для

повышения такой устойчивости или толерантности кукурузы и масличного рапса, где конструкция шпильки РНКи включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на ген *Lox3* в кукурузе или масличном рапсе (OSR), где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере, одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, хотя бы одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

предпочтительно, где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке, ткани, органу, целому растению или семени кукурузы, или масличного рапса (OSR), содержащим экспрессионную конструкцию, или вектор, кодирующий ее, или конструкцию шпильки РНКи, или вектор, кодирующий ее, в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В дополнительном из вариантов осуществления, настоящее изобретение относится к применению по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов и/или по меньшей мере одной системы редактирования генома и/или по меньшей мере одной

системы модификации генома, определенных в любом из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения, что приводит к целенаправленному нокауту или нокдауну эндогенного гена *Lox3*, с целью придания растению, предпочтительно кукурузе (*Zea mays*) или масличному рапсу (*OSR*) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности, или с целью повышения их устойчивости или толерантности к таким патогенам, как насекомые, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности к видам фузариум (*Fusarium*).

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к способу придания растению устойчивости или толерантности, или повышения их устойчивости или толерантности к насекомым и, необязательно, к грибковому патогену, включающему следующие этапы:

- (i) предоставление по меньшей мере одной растительной клетки;
- (ii) введение в, по меньшей мере одну растительную клетку по меньшей мере одной конструкции, подавляющей ген, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, что приводит к целенаправленному нокдауну или нокауту эндогенного для растения гена *Lox3*;
- (iii) получение по меньшей мере одной модифицированной растительной клетки с пониженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*; и
- (iv) получение по меньшей мере одной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени со сниженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*, необязательно после дополнительного этапа регенерации растительной ткани, органа, растения или семени из по меньшей мере одной модифицированной клетки.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и/или огневки кукурузной (*Ostrinia nubilalis*) и/или, необязательно, в придании или

повышении устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis*.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, способ предназначен для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и/или, необязательно, для придания или повышения устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, ген *Lox3* представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, ген *Lox3* кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89.

В другом из вариантов реализации выше описанного способа, ген *Lox3* представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86.

В еще одном из вариантов осуществления выше описанного способа, ген Lox3 кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), в, по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген Lox3 для подавления экспрессии генов.

В одном из вариантов выше описанного способа, конструкция представляет собой конструкцию РНК-интерференции или кодирует конструкцию РНК-интерференции, включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген Lox3, причем конструкция РНК-интерференции при транскрипции образует РНК-шпильку.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, в придании или повышении устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis* и смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В другом из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*),

кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, в придании кукурузе или в повышении устойчивости или толерантности кукурузы к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2.

В еще одном из вариантов осуществления выше описанного способа, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В следующем из вариантов осуществления выше описанного способа, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, в придании кукурузе или повышении устойчивости или толерантности кукурузы к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora*

zae-maydis и конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В еще одном, следующем из вариантов осуществления выше описанного способа, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, в придании кукурузе или повышении устойчивости или толерантности кукурузы к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zae-maydis* и в растительную клетку вводится вектор, который включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, конструкция вводится в, по меньшей мере одну растительную клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинацией.

В следующем из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), по меньшей мере одна система редактирования генома вводится в, по меньшей мере одну клетку, которая нацелена на ген *Lox3*, где по меньшей мере одна система редактирования генома включает в себя:

- (a) по меньшей мере, одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, по меньшей мере одна система редактирования генома вводится в по меньшей мере одну клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц; химической трансфекции или их комбинацией.

В еще одном из вариантов осуществления выше описанного способа, способ предназначен для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания масличному рапсу устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*, и по меньшей мере одна система редактирования генома включает крПНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), мутагенез осуществляется на одной или на множестве клеток путем применения химических веществ или облучения.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, алкилирующий агент, в частности этилметансульфонат, наносится на одну или на множество клеток, с целью вызвать мутагенез.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), одна или несколько мутаций встраиваются в ген *Lox3* и идентифицируются методом TILLING.

В следующем из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), отбирают одну или несколько клеток с нокдаун- или нокаут-мутациями в гене *Lox3*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке кукурузы, ткани кукурузы, органу кукурузы, целому растению кукурузы или семенам кукурузы, полученным или получаемым способом, в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке масличного рапса, ткани масличного рапса, органу масличного рапса, целому растению масличного рапса или семени масличного рапса, полученному или получаемому способом в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В еще одном, дополнительном аспекте, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, нацеленной на ген *Lox3* в кукурузе для подавления экспрессии генов, где такая конструкция кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, эндогенный для растения кукурузы, которая при транскрипции образует РНК-шпильку.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, нацеленной на ген *Lox3* в масличном рапсе для подавления экспрессии генов, где такая конструкция кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, эндогенный для растения масличного рапса, которая при транскрипции образует РНК-шпильку.

В одном из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В другом из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2.

В еще одном из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В одном из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к вектору, включающему (или состоящему из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5 или последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%,

83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к конструкции РНКи шпильки для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis*, где конструкция шпильки РНКи включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на ген Lox3 в кукурузе, где система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на ген Lox3 в масличном рапсе, где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

В одном из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В другом из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, экспрессионная конструкция включает крПНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В дополнительном варианте реализации выше описанной экспрессионной конструкции, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к вектору, кодирующему экспрессионную конструкцию в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке кукурузы, ткани кукурузы, органу кукурузы, целому растению кукурузы или семени кукурузы, содержащим экспрессионную конструкцию или вектор в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к клетке масличного рапса, ткани масличного рапса, органу масличного рапса, целому растению масличного рапса или семени масличного рапса, содержащим экспрессионную конструкцию или вектор, в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, которая приводит к направленному нокауту или нокдауну эндогенного гена *Lox3*, с целью придания растениям устойчивости или толерантности, или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым и, необязательно, одному или нескольким грибковым патогенам.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, которая приводит к направленному нокауту или нокдауну эндогенного гена *Lox3*, с целью придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, с целью придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, которая приводит к направленному

нокауту или нокдауну эндогенного гена *Lox3*, с целью придания растениям масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию конструкции, представляющей собой конструкцию для РНК-интерференции (RNAi) или кодирующей конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на эндогенный ген *Lox3* растения кукурузы, где конструкция для РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК шпильку, с целью придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или с целью повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, с целью придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию конструкции, представляющей собой конструкцию для РНК-интерференции (RNAi) или кодирующей конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на эндогенный ген *Lox3* растения масличного рапса, где конструкция для РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК шпильку, с целью придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или

нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus pycitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из выше описанных вариантов использования конструкции, смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В другом из из выше описанных вариантов использования конструкции, антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательностью SEQ ID №: 2.

В еще одном из выше описанных вариантов использования конструкции, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В одном из выше описанных вариантов использования конструкции, конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию вектора, который включает (или состоит из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5 для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis*.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию системы редактирования генома, которая нацелена на эндогенный ген Lox3 в растении кукурузы, где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее

для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум

(*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию системы редактирования генома, которая нацелена на эндогенный ген *Lox3* в растении масличного рапса, где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее

для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на эндогенный ген *Lox3*, в растении кукурузы, где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям масличного рапса устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на эндогенный ген Lox3 в растении масличного рапса, где система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, хотя бы одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по

меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем

для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmidiophora brassicae*.

В одном из выше описанных вариантов использования, экспрессионная конструкция включает крРНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В другом из выше описанных вариантов использования, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию вектора, кодирующего систему редактирования генома, определенную выше, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из

группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию вектора, кодирующего систему редактирования генома, определенную выше, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus pycitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID №.	Описание
1	Смысловая нить целевого участка РНК-интерференции перед RGA2intronII
2	Антисмысловая нить целевого участка РНК-интерференции после RGA2intronII
3	Последовательность RGA2intronII из <i>Triticum aestivum</i> - второй интрон RGA2 (аналог гена устойчивости; ген, участвующий в придании пшенице устойчивости к бурой листовой ржавчине) по данным Loutre et al., 2009, The Plant Journal 60, 1043-1054
4	Последовательность кассеты РНК-интерференции (RNAi) (смысловая нить целевого участка РНК-интерференции (RNAi) перед RGA2intronII + RGA2intronII + антисмысловая нить целевого участка РНК-интерференции (RNAi) после RGA2intronII)
5	Последовательность полного типового вектора РНК-интерференции (RNAi), здесь начинающаяся с ColE1 ori.
6	Zm00001eb054040_B73AGP05_T001_genomic (ZmLox3) – Геномная последовательность Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>).
7	Zm00001eb054040_B73AGP05_T001_CDS (ZmLox3) – Кодированная последовательность Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
8	Zm00001eb054040_B73AGP05_T001_pro (ZmLox3) – Аминокислотная последовательность Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
9	ZmLox3_gDNA_A188 – геномная последовательность Lox3 линии A188 кукурузы (<i>Zea mays</i>)

10	ZmLox3_CDS_A188 – кодирующая последовательность Lox3 линии A188 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
11	ZmLox3_protein_A188 – аминокислотная последовательность Lox3 линии A188 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
12	SL57_Zm00001d033623(LOX3)_gDNA – тропическая линия кукурузы SL57 – геномная последовательность Lox3 тропической линии кукурузы SL57 (<i>Zea mays</i>)
13	SL57_Zm00001d033623(LOX3)_CDS - тропическая линия кукурузы SL57 – кодирующая последовательность Lox3 тропической линии кукурузы SL57 (<i>Zea mays</i>)
14	SL57_Zm00001d033623(LOX3)_protein - тропическая линия кукурузы SL57 – аминокислотная последовательность Lox3 тропической линии кукурузы SL57 (<i>Zea mays</i>)
15	ZmLox3_PH207_genomic – геномная последовательность Lox3 линии PH207 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
16	ZmLox3_PH207_CDS – кодирующая последовательность Lox3 линии PH207 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
17	ZmLox3_PH207_protein – аминокислотная последовательность Lox3 линии PH207 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
18	Праймер для Lox3 qRT-PCR: S3460 – кукуруза – Праймер для анализа экспрессии Lox3 в кукурузе (<i>Zea mays</i>)
19	Праймер для Lox3 qRT-PCR: S3461 – кукуруза – Праймер для анализа экспрессии Lox3 в кукурузе (<i>Zea mays</i>)
20	Праймер для Ef-Tu qRT-PCR: S3428 – Праймер для анализа экспрессии гена домашнего хозяйства Фактор элонгации 1-альфа

21	Праймер для Ef-Tu qRT-PCR: S3429 - Праймер для анализа экспрессии гена домашнего хозяйства Фактор элонгации 1-альфа
22	Ген фактора элонгации 1- альфа (EF1) линии A188 – кодирующая последовательность гена фактора элонгации 1-альфа (EF1) линии A188 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
23	Белок фактора элонгации 1- альфа (EF1) линии A188 – аминокислотная последовательность гена фактора элонгации 1- альфа (EF1) линии A188 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
24	ZmPLT5 PRT – аминокислотная последовательность транскрипционного фактора PLETHORA (PLT) кукурузы (<i>Zea mays</i>)
25	ZmPLT5 CDS – кодирующая последовательность транскрипционного фактора PLETHORA (PLT) кукурузы (<i>Zea mays</i>)
26	RBP8 PRT – аминокислотная последовательность белка - усилителя регенерации
27	RBP8 CDS – кодирующая последовательность белка - усилителя регенерации
28	LbCpf1-RR PRT – аминокислотная последовательность Cpf1 бактерии <i>Lachnospiraceae RR</i>
29	LbCpf1-RR CDS – кодирующая последовательность Cpf1 бактерии <i>Lachnospiraceae RR</i>
30	tdTomato PRT – аминокислотная последовательность флуоресцентного белка tdTomato

31	tdTomato CDS – кодирующая последовательность флуоресцентного белка tdTomato
32	Протоспейсер m7GEP336 ДНК – Последовательность ДНК протоспейсера m7GEP336
33	Протоспейсер m7GEP337 ДНК – Последовательность ДНК протоспейсера m7GEP337
34	Протоспейсер m7GEP338 ДНК – Последовательность ДНК протоспейсера m7GEP338
35	Протоспейсер m7GEP339 ДНК – Последовательность ДНК протоспейсера m7GEP339
36	Zm00008a004913_pro.pro – аминокислотная последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) Zm00008a004913
37	WVP18-09358-016_pro – аминокислотная последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09358-016
38	WVP18-09344-014_pro.pro – аминокислотная последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09344-014
39	WVP18-09309-014_339-009_pro.pro – аминокислотная последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09309-014
40	WVP18-09307-014_pro.pro – аминокислотная последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09307-014

41	Zm00008a004913_CDS – кодирующая последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) Zm00008a004913
42	WVP18-09358-016_CDS.seq – кодирующая последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09358-016
43	WVP18-09344-014_CDS.seq – кодирующая последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09344-014
44	WVP18-09309-014_339-009_CDS.seq – кодирующая последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09309-014
45	WVP18-09307-014_CDS.seq – кодирующая последовательность Lox3 мутанта кукурузы (<i>Zea mays</i>) WVP18-09307-014
46	крРНК1 - секвенирование ДНК, кодирующее крРНК1 для нацеливания на ген lox3 масличного рапса (OSR).
47	крРНК 2.1 – секвенирование ДНК, кодирующее крРНК 2.1 для нацеливания на ген lox3 масличного рапса (OSR)
48	крРНК 2.2 – секвенирование ДНК, кодирующее крРНК 2.2 для нацеливания на ген lox3 масличного рапса (OSR)
49	крРНК 3 – секвенирование ДНК, кодирующее крРНК 3 для нацеливания на ген lox3 масличного рапса (OSR)
50	pZFNnptII-LbCpf1-tDT-lox3_TTTV – плазмидная последовательность pZFNnptII-LbCpf1-tDT-lox3_TTTV
51	сгааххххххf02х – обратный праймер сгааххххххf02х для анализа присутствия трансгена

52	сuaxxxxxxxxg01x – обратный праймер сuaxxxxxxxxg01x для анализа присутствия трансгена
53	nptIIxxxf01 – обратный праймер nptIIxxxf01 для анализа присутствия трансгена
54	nptIIxxxr01 – обратный праймер nptIIxxxr01 для анализа присутствия трансгена
55	tDTxxxf04 – обратный праймер tDTxxxf04 для анализа присутствия трансгена
56	tDTxxxr01 – обратный праймер tDTxxxr01 для анализа присутствия трансгена
57	СuaxxxMGB – зонд СuaxxxMGB для анализа присутствия трансгена
58	nptIIxxxMGB – зонд nptIIxxxMGB для анализа присутствия трансгена
59	tDTxxxMGB – зонд tDTxxxMGB для анализа присутствия трансгена
60	Fwmfor нуклеаза – прямой праймер LbCpf1 для нуклеазного теста
61	LbCpf1- Rv – обратный праймер LbCpf1 для ДНК нуклеазного теста - LbCpf1
62	Зонд – зонд для нуклеазного теста
63	IR106_lox3_F1 – праймер IR106_lox3_F1 для редактирования анализа профиля
64	IR106_lox3_F2 – праймер IR106_lox3_F2 для редактирования анализа профиля

65	IR106_lox3_F3 – праймер IR106_lox3_F3 для редактирования анализа профиля
66	IR106_lox3_F4 – праймер IR106_lox3_F4 для редактирования анализа профиля
67	IR106_lox3_R1 – праймер IR106_lox3_R1 для редактирования анализа профиля
68	IR106_lox3_R2 – праймер IR106_lox3_R2 для редактирования анализа профиля
69	IR106_lox3_R3 – праймер IR106_lox3_R3 для редактирования анализа профиля
70	IR106_lox3_R4 – праймер IR106_lox3_R4 для редактирования анализа профиля
71	946R – праймер 946R для секвенирования ампликонов
72	1145F – праймер 1145F для секвенирования ампликонов
73	346F – праймер 346F для секвенирования ампликонов
74	1948R – праймер 1948R для секвенирования ампликонов
75	Геномная ДНК масличного рапса (OSR) Lox3 VnaC08g37760D_At_ortholog:AT1G17420 – последовательность геномной ДНК Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
76	Геномная ДНК масличного рапса (OSR) Lox3 VnaA08g23120D_At_ortholog: AT1G17420 – последовательность геномной ДНК Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)

77	Геномная ДНК масличного рапса (OSR) Lox3 VnaA09g45010D_At_ortholog:AT1G17420 – последовательность геномной ДНК Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
78	Геномная ДНК масличного рапса (OSR) Lox3 VnaC08g48320D_At_ortholog:AT1G17420 – последовательность геномной ДНК Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
79	PRT Lox3 масличного рапса (OSR) VnaC08g37760D_At_ortholog:AT1G17420 – аминокислотная последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
80	PRT Lox3 масличного рапса (OSR) VnaA08g23120D_At_ortholog:AT1G17420 – аминокислотная последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
81	PRT Lox3 масличного рапса (OSR) VnaA09g45010D_At_ortholog:AT1G17420 – аминокислотная последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
82	PRT Lox3 масличного рапса (OSR) VnaC08g48320D_At_ortholog:AT1G17420 – аминокислотная последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
83	CDS Lox3 масличного рапса (OSR) VnaC08g37760D_At_ortholog: AT1G17420 – кодирующая последовательность of Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
84	CDS Lox3 масличного рапса (OSR) VnaA09g45010D_At_ortholog:AT1G17420 – кодирующая последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)

85	CDS Lox3 масличного рапса (OSR) BnaA09g45010D_At_ortholog:AT1G17420 – кодирующая последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
86	CDS Lox3 масличного рапса (OSR) BnaC08g48320D_At_ortholog:AT1G17420 – кодирующая последовательность Lox3 масличного рапса (<i>Brassica napus</i>)
87	Zm00001eb054040_B73AGP05_T002_CDS – кодирующая последовательность альтернативного транскрипта Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
88	Zm00001eb054040_B73AGP05_T002_genomic – геномная последовательность, кодирующая альтернативный транскрипт Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
89	Zm00001eb054040_B73AGP05_T002_pro – аминокислотная последовательность альтернативного варианта сплайсинга Lox3 кукурузы (<i>Zea mays</i>)
90	Праймер PH207m034d (Таблица 4Б)
91	Праймер PH207m034h (Таблица 4Б)
92	Праймер PH207m034b (Таблица 4Б)
93	Праймер PH207m034f (Таблица 4Б)
94	Последовательность PH207m034d (Таблица 4Б)
95	Последовательность PH207m034h (Таблица 4Б)
96	Последовательность PH207m034b (Таблица 4Б)
97	Последовательность PH207m034f (Таблица 4Б)

Определение терминов

Растение проявляет "устойчивость" или "толерантность" к насекомому или грибковому патогену, когда симптомы заражения уменьшаются или не наблюдаются вовсе, в том случае, если растение подвергается воздействию патогена в условиях, допускающих заражение. Косвенно, устойчивость и толерантность также можно наблюдать, изучая действие патогена на устойчивые или толерантные растения по сравнению с растениями, не имеющими устойчивости или толерантности. Например, можно наблюдать и сравнивать количество, размер или вес патогена. Вес личинок насекомых может, например, уменьшиться на устойчивых или толерантных растениях по сравнению с контрольным неустойчивым растением. Как правило, устойчивое или толерантное растение демонстрирует снижение потери урожая по сравнению с неустойчивым растением, зараженным тем же патогеном, в тех же условиях. В идеале, у устойчивого растения потеря урожая, вызванная заражением, полностью компенсируется, то есть растение дает столько же урожая, сколько растение, которое вообще не подвергалось воздействию патогена, но выращивалось в тех же условиях.

"Насекомые-патогены" или "грибковые патогены" - это любые насекомые или грибы, которые вторгаются на поля и заражают культурные растения, вызывая их повреждение и, в конечном счете, потерю урожая. Специалистам известен ряд насекомых или грибковых патогенов, опасных для каждого сельскохозяйственного растения. В некоторых случаях, грибковым заболеваниям благоприятствуют механические повреждения, наносимые насекомыми, так что ущерб может увеличиваться. Поэтому устойчивость или толерантность к насекомым-вредителям может также обеспечивать определенную степень устойчивости к грибковым заболеваниям.

Термины „РНК-интерференция“ или „RNAi“, или „РНК-подавление экспрессии генов“, или „подавление экспрессии генов“, используемые в настоящем документе как взаимозаменяемые, относятся к механизму снижения экспрессии (или нокдауна) генов, который, как было показано, существует у всех эукариот. Впервые этот механизм был обнаружен у растений и был назван „посттранскрипционным подавлением экспрессии генов“ или „PTGS“. В процессе РНК-интерференции (RNAi), малые РНК направляют специфические эффекторные белки к нуклеотидной последовательности-мишени с помощью комплементарной пары оснований, что приводит к деградации мишени. Конструкция механизма „подавления экспрессии генов“ или „конструкция РНК-интерференции“ обычно включает в себя так называемые „смысловые“ и „антисмысловые“

последовательности. Смысловая и антисмысловая последовательности - это комплементарные последовательности, которые присутствуют в последовательности нуклеиновой кислоты и имеют разные направления. Если конструкция нуклеиновой кислоты включает смысловую и соответствующую антисмысловую последовательности, то при транскрипции эти две комплементарные последовательности образуют двойную нить РНК, что приводит к образованию „РНК-шпильки“. В РНК-шпильке смысловые последовательности и соответствующие антисмысловые последовательности вместе образуют двойную нить и разделены „промежуточной последовательностью интронной петли“, образующей петлю в структуре шпильки. „Конструкция РНК-интерференции (RNAi)“, также, может включать более одной пары смысловых и антисмысловых последовательностей и образовывать несколько петель.

„Система редактирования генома“ представляет собой комбинацию сайт-специфической нуклеазы или сайт-специфической нуклеазы или их функционально активного фрагмента или варианта с соответствующей гидовой РНК (или гидовой РНК для праймированного редактирования (pegRNA) или кРНК), направляющей соответствующую нуклеазу CRISPR к сайту-мишени, который должен быть расщеплен. Под „сайт-специфической нуклеазой“ понимается нуклеаза или ее активный фрагмент, способный специфически распознавать и расщеплять ДНК в определенном сайте-мишени. Такие нуклеазы обычно вызывают двуцепочечный разрыв (DSB), который затем восстанавливается путем нехомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации (HR). Нуклеазы включают нуклеазы с цинковыми пальцами; эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции; инженерные эндонуклеазы самонаведения; рекомбиназы, транспозазы и мегануклеазы, а также нуклеазы CRISPR и/или любые их комбинации, варианты или активные фрагменты. Система редактирования генома может представлять собой CRISPR/Cas систему, включая CRISPR/Cas9 системы, CRISPR/Cas13 системы, CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a) системы, CRISPR/C2C2 системы, CRISPR/CasX системы, CRISPR/CasY системы, CRISPR/Cmr системы, CRISPR/Csm системы, CRISPR/MAD2 системы, CRISPR/MAD7 системы, CRISPR/CasZ системы, или их каталитически активный фрагмент. „Гидовая молекула“, в частности „гидовая РНК“ (gRNA), может быть транс-активируемой CRISPR РНК (tracrRNA), синтетической CRISPR РНК (crRNA) или одиночной гидовой РНК (sgRNA) и содержит информацию о последовательности, нацеленной на геномную последовательность с целью ее расщепления нуклеазой.

Термин „нуклеаза CRISPR“, используемый в настоящем документе, представляет собой любую нуклеазу, которая была идентифицирована во встречающейся в природе системе CRISPR и которая впоследствии была выделена из ее природного контекста и, предпочтительно, была модифицирована или объединена в представляющую интерес рекомбинантную конструкцию, чтобы стать пригодной в качестве инструмента для целевой генной инженерии. Любая нуклеаза CRISPR может быть использована и, необязательно, перепрограммирована или дополнительно мутирована, чтобы стать пригодной для различных вариантов осуществления настоящего изобретения, при условии, что исходная нуклеаза CRISPR дикого типа обеспечивает распознавание ДНК, т.е. свойства связывания. Указанное распознавание ДНК может зависеть от PAM (мотива, примыкающего к протоспейсеру). Для конкретного применения можно использовать и создавать нуклеазы CRISPR, имеющие оптимизированные и разработанные матрицы распознавания PAM (мотива, примыкающего к протоспейсеру). Расширение кода распознавания PAM (мотива, примыкающего к протоспейсеру) может быть пригодным для нацеливания сайт-специфических эффекторных комплексов на интересующий сайт-мишень, независимо от исходной специфичности PAM нуклеазы дикого типа, основанной на CRISPR. Варианты Cpf1 могут содержать по меньшей мере одну из мутаций S542R, K548V, N552R или K607R, предпочтительно мутацию S542R/K607R или S542R/K548V/N552R в AsCpf1 из *Acidaminococcus*. Кроме того, модифицированные варианты Cas или Cpf1 или любые другие модифицированные варианты эффектора CRISPR, например варианты Cas9, могут быть использованы в соответствии со способами настоящего изобретения в составе комплекса редактирования оснований, например BE3, VQR-BE3, EQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaKKH-BE3 (см. Kim et al., Nat. Biotech., 2017, doi:10.1038/nbt.3803). Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением предполагается использовать искусственно модифицированные нуклеазы CRISPR, которые, в действительности могут не являться "нуклеазами", в смысле ферментов с помощью которых расщепляются двойные цепочки, но представляют собой никазы или варианты мертвых нуклеаз, которые все же обладают присущей им способностью распознавать ДНК и, следовательно, связывать ее. Подходящие эффекторы на основе Cpf1 для использования в способах настоящего изобретения получены из бактерии *Lachnospiraceae* (LbCpf1, например, справочная последовательность NCBI: WP_051666128.1) или из *Francisella tularensis* (FnCpf1, например, UniProtKB/Swiss-Prot: A0Q7Q2.1). Варианты Cpf1 известны (см. Gao et al., BioRxiv, dx.doi.org/10.1101/091611). Варианты AsCpf1 с мутациями S542R/K607R и

S542R/K548V/N552R, которые могут расщеплять сайты-мишени с PAM TУCV/СССС и TATV соответственно, с повышенной активностью *in vitro* и *in vivo*, таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, рассматриваются как сайт-специфические эффекторы. Полногеномная оценка внецелевой активности показала, что эти варианты сохраняют высокий уровень специфичности нацеливания на ДНК, который может быть дополнительно улучшен путем введения мутаций в домены, не взаимодействующие с PAM (мотивом, примыкающим к протоспейсеру). В совокупности, эти варианты увеличивают диапазон нацеливания AsCpf1 до одного сайта расщепления на каждые ~8,7 пар оснований (п.н.) в неповторяющихся областях генома, обеспечивая полезное дополнение к набору инструментов геномной инженерии CRISPR/Cas (см. Gao et al., выше).

Термины „SDN-1“, „SDN-2“ и „SDN-3“, используемые в настоящем документе, являются аббревиатурами для платформенного метода „сайт-направленной нуклеазы“ 1, 2 или 3 соответственно, вызываемой любым сайт-направленным действием представляющей интерес нуклеазы, например, мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активатору транскрипции (TALEN), и нуклеазы CRISPR. SDN-1 производит двухцепочечный или одноцепочечный разрыв в геноме растения без добавления чужеродной ДНК. SDN-2 и SDN-3 обеспечивает во время редактирования гена предоставление клетке экзогенной нуклеотидной матрицы. Однако в случае SDN-2, рекомбинантная чужеродная ДНК не встраивается в геном клетки-мишени, а процесс эндогенной репарации копирует, например, мутацию, присутствующую в матрице, чтобы вызвать (точечную) мутацию. Напротив, механизмы SDN-3 используют введенную матрицу во время восстановления разрыва ДНК, обеспечивая внедрение генетического материала в геномный материал.

Термин „модификация генома“, в контексте настоящего изобретения, относится к любому изменению последовательности (нуклеиновой кислоты), которое приводит по меньшей мере к одному изменению в последовательности (нуклеиновой кислоты), отличающему ее от исходной последовательности. В частности, модификация может быть достигнута путем инсерции или добавления одного или нескольких нуклеотидов, или замены или удаления одного, или нескольких нуклеотидов исходной последовательности или путем комбинации любых вышеперечисленных действий.

Термин „нокдаун“ гена относится к экспериментальному методу, с помощью которого снижается экспрессия гена. Снижение экспрессии может, например, быть достигнуто путем подавления экспрессии генов. С другой стороны, „нокаут“ приводит к полной отмене экспрессии, т. е. ген вообще не экспрессируется. Это, например, может быть достигнуто заменой или прерыванием последовательности целевого гена путем редактирования генома.

Молекула нуклеиновой кислоты или ген, который является „эндогенным“ для клетки или организма, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая встречается в геноме этой клетки или организма в естественной среде. С другой стороны, молекула нуклеиновой кислоты, которая является „экзогенной“ для клетки или организма, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая не встречается в естественном состоянии в этой клетке или организме, но была введена в клетку или организм трансгенно.

„Регенерация“ растения, ткани, органа или семени осуществляется путем культивирования модифицированной или отредактированной клетки способом, который может включать этапы дедифференциации и дифференциации для получения специализированной ткани или целого растения, которое несет модификацию или редактирование, предпочтительно в каждой клетке. Способы регенерации растений хорошо известны специалистам в данной области техники.

„Конструкция нуклеиновой кислоты“, „конструкция“ или „экспрессионная конструкция“ относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей или содержащей один, или несколько генетических элементов, которые при введении в клетку-мишень могут быть транскрибированы и/или транслированы в функциональную форму, например, РНК (РНК-ы) или полипептид (полипептиды) или белок (белки). Конструкция нуклеиновой кислоты может также включать регуляторные последовательности, такие как промоторная и терминаторная последовательности, способствующие экспрессии генетического элемента (элементов), а также спейсеры и интроны. Генетические элементы настоящего изобретения, также, могут быть закодированы в наборе конструкций, которые могут быть введены в клетку одновременно или последовательно.

Конструкция (нуклеиновой кислоты) настоящего изобретения „нацелена“ на геномную последовательность или ген, если она содержит информацию о последовательности,

которая позволяет ей распознать геномную последовательность или ген и, таким образом, обеспечить возможность вмешаться в последовательность, например, путем сайт-специфического расщепления или путем подавления экспрессии генов. Нацеливание может происходить либо путем прямого взаимодействия с самой геномной последовательностью, либо путем взаимодействия с транскриптом геномной последовательности. Например, если конструкция нуклеиновой кислоты настоящего изобретения включает или кодирует смысловую и соответствующую антисмысловую последовательность, нацеленную на геномную последовательность, то при транскрипции конструкции активируется механизм подавления экспрессии РНК или механизм РНК-интерференции (RNAi), который приводит к разрушению транскрипта геномной последовательности-мишени и, таким образом, подавляет экспрессию мишени. В другом случае конструкция нуклеиновой кислоты может кодировать сайт-специфическую нуклеазу и гидовую РНК, что приводит к расщеплению целевой последовательности.

„Трансформация“ или „трансфекция“ растительной клетки с включением конструкции или набора конструкций относится к любой установленной методике введения молекул нуклеиновых кислот в клетку, такой как биолистические подходы (например, бомбардировка частицами), микроинъекция, пермеабилзация клеточной мембраны с помощью различных методов обработки, таких как электропорация или обработка PEG, или трансформация, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens*. Как правило, включение конструкции (конструкций) нуклеиновой кислоты, например, путем трансформации, может быть осуществлено с помощью методов, которые в основном известны специалистам в данной области. Например, конструкция нуклеиновой кислоты может быть инкорпорирована в растительные клетки путем заражения растительной ткани или растительной клетки *Agrobacterium tumefaciens*, содержащей в своей плазмиде последовательность нуклеиновой кислоты для переноса, которая может быть интегрирована в геном растения. Другим вариантом является инкорпорация с помощью биолистического переноса, при котором конструкция нуклеиновой кислоты, подлежащая инкорпорации в растительную клетку, наносится на частицы золота или вольфрама, которые затем выстреливаются в клетки с высокой скоростью. Другой, известный специалистам в данной области, вариант инкорпорации конструкции нуклеиновой кислоты в растительную клетку - трансформация протопластов, при которой в протопласты добавляют полиэтиленгликоль в присутствии молекул нуклеиновой кислоты, подлежащих включению, или протопласты подвергают воздействию короткого импульса тока, в

результате чего мембрана протопластов временно становится проницаемой для конструкции (конструкций) нуклеиновой кислоты.

Термин „вектор“ относится к элементу, используемому для введения конструкции нуклеиновой кислоты или набора конструкций нуклеиновой кислоты в клеточную систему. Вектор может представлять собой плазмиду или плазмидный вектор; космиду; искусственные дрожжевые хромосомы (YAC); искусственные бактериальные хромосомы (BAC) или искусственные хромосомы P1 (PACs); фагмиду; бактериальный вектор на основе фага; изолированную одноцепочечную или двухцепочечную последовательность нуклеиновой кислоты, включающую последовательности ДНК и РНК в линейной или кольцевой форме, или их комбинацию для введения (или трансформации) в растение, растительную клетку, ткань, орган или материал, в соответствии с настоящим изобретением.

Термины „растение“, „растительная клетка“ или „часть растения“, используемые в настоящем документе, относятся к растительному организму, растительному органу, дифференцированным и недифференцированным растительным тканям, растительным клеткам, семенам, а также их производным и потомкам. Растительные клетки включают, без ограничения, например, клетки из семян, из зрелых и незрелых клеток или органов, включая эмбрионы, меристематические ткани, проростки, каллусные ткани в разных состояниях дифференциации, листья, цветы, корни, побеги, мужские или женские гаметофиты, спорофиты, пыльцу, пыльцевые трубки, микроспоры и протопласты.

„Мутагенез“ означает метод, при котором модификации или мутации вносятся в последовательность нуклеиновой кислоты случайным или не сайт-специфическим образом. Например, мутации могут быть индуцированы определенными химическими веществами, такими как EMS (этилметансульфонат) или ENU (N-этил-N-нитрозомочевина), или физическими методами, например, облучением ультрафиолетовыми или гамма-лучами. „Сайт-специфические модификации“, с другой стороны, основаны на действии сайт-специфических эффекторов, таких как нуклеазы, никиазы, рекомбиназы, транспозазы, редакторы оснований. Эти инструменты распознают определенную последовательность-мишень и позволяют ввести модификацию в определенном месте последовательности-мишени.

„TILLING“ (Targeting Induced Local Lesions in Genomes - нацеливание на индуцированные локальные повреждения в геномах) - это процесс, позволяющий выявить мутации в конкретном гене после проведения (неспецифического) мутагенеза. Мутагенез может быть проведен, например, с использованием химического мутагена, такого как этилметансульфонат (EMS). Затем для выявления одноосновных мутаций используется чувствительный метод ДНК-скрининга. Методы проведения TILLING известны специалистам в данной области техники.

Во всех случаях, когда в настоящем документе идет речь о процентах идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот друг другу, эти значения определяют те значения, которые получены с помощью программы EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments (nucleotide) (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html) для нуклеиновых кислот или программы EM-BOSS Water Pairwise Sequence Alignments (protein) (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) для аминокислотных последовательностей. Выравнивания или сравнения последовательностей, о которых идет речь в настоящем документе, относятся к выравниванию двух последовательностей, сравниваемых друг с другом, по всей длине. Такие инструменты, предоставленные Европейской лабораторией молекулярной биологии (EMBL) и Европейским институтом биоинформатики (EBI) для локального выравнивания последовательностей, используют модифицированный алгоритм Смита-Уотермана (см. www.ebi.ac.uk/Tools/psa/ и Smith, TF & Waterman, M.C. „Identification of common molecular subsequences“ *Journal of Molecular Biology*, 1981, 147 (1): 195-197). При проведении выравнивания используются параметры по умолчанию, определенные EMBL-EBI. Эти параметры таковы: (i) для последовательностей аминокислот: матрица = BLOSUM62, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5 или (ii) для последовательностей нуклеиновых кислот: матрица = полная ДНК, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5. Специалисту в данной области техники хорошо известен тот факт, что, например, последовательность, кодирующая белок, может быть „оптимизирована по кодонам“, если соответствующая последовательность должна использоваться в другом организме, отличном от исходного организма, из которого происходит молекула.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 демонстрирует бинарный вектор, используемый для подавления гена *ZmLox3*, опосредованного РНК-интерференцией (RNAi). Шпильку РНК-интерференции (RNAi), направленную против гена *ZmLox3*, для трансформации кукурузы встраивали в бинарный вектор. Трансферную ДНК (Т-DNA) бинарного вектора трансформировали в генотип кукурузы A188. Интрон между промотором *d35S* и областью-мишенью РНК-интерференции (RNAi) является первым интроном гена полиубиквитина кукурузы (*ZmUbi*; Christensen, A.H., Quail, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5, 213–218 (1996). <https://doi.org/10.1007/BF01969712>).

Фигура 2 демонстрирует снижение экспрессии гена *ZmLox3* в трансгенных линиях *ZmLox3_RNAi*. Образцы листьев гомозиготных ГМ (генетически модифицированных) растений анализировали методом qRT-PCR на экспрессию гена *ZmLox3* и сравнивали с экспрессией гена у нетрансгенных, азиготных растений. Линии FDC003-T002, FDC003-T005, FDC003-T010, FDC003-T021 и FDC003-T023 показали сильное снижение экспрессии *Lox3*. Экспрессия *Lox3* была нормализована по отношению к экспрессии гена домашнего хозяйства *EF1*. Показаны средние значения для 3 и 5 растений. Для азиготных линий растений, $n=3$. Для ГМ-линий растений, $n=5$.

Фигура 3 демонстрирует повышенную устойчивость линий *ZmLox3_RNAi* к насекомым. Вес личинки кукурузной лиственной совки (в мг) через 10 дней после кормления листьями кукурузы A188 (WT (A)) и после кормления листьями трех разных линий *ZmLox3_RNAi* (B1: FDC003-T002, B2: FDC003-T011 и B3: FDC003-T023). Данные взяты из 3 независимых экспериментов, объединенных вместе (среднее значение \pm SE). Разные буквы обозначают группы, которые достоверно значительно различаются друг от друга (ANOVA и post hoc анализ достоверно значимого различия по критерию Тьюки, $n = 75$; $P < 0.05$).

Фигура 4 демонстрирует повышенную устойчивость линии *ZmLox3_RNAi* FDC0003-T023 к грибам. Слева: оценки заболеваемости початков кукурузы, зараженных гнилью, вызванной *Gibberella* гибридов FDC0003-T029, азиготной FDC0003-T029 и тестовой линии RP5G FDC0003-T023. Площадь заражения в 40-50 головок каждого гибрида измеряли через 40 дней после заражения растений кукурузы патогеном *Fusarium graminearum*, в теплице. Справа: экспрессия *Lox3* в листьях гибридов FDC003-T029, азиготных FDC0003-T029 и FDC0003-T023 в сравнении с тестовой линией RP5G в конце анализа на влияние гриба.

Экспрессию *Lox3* определяли с помощью qRT-PCR, и она снижена в гибриде FDC0003-T023, который демонстрирует повышенную устойчивость к грибам и насекомым.

Фигура 5 демонстрирует бинарный вектор, использованный для создания нокдауна *Lox3* (SDN-1 *Lox3*) в тропической кукурузе путем редактирования генома.

Фигура 6 показывает схему подсчета баллов для теста на килу, выполненного в **примере 11**.

Фигура 7 показывает (по оси x) вес личинок, питавшихся кукурузой с нокаутом *Lox3* (SDN-1 *Lox3* *corn*) на 5, 8, 12 и 15 сутки после заражения. По оси y показан вес личинок FAW (гусеницы кукурузной лиственной совки) в мг. Приведены статистические различия между отредактированными и контрольными линиями на 8, 12 и 15 сутки после заражения (ANOVA и post hoc анализ достоверно значимого различия по критерию Тьюки, $P < 0.05$). См. **пример 5**.

Фигура 8 демонстрирует изображения гусеницы кукурузной лиственной совки, питающейся немодифицированной кукурузой (слева = контрольное растение) и кукурузой с нокаутом *Lox3* через 15 дней после заражения личинками (= SDN-1 *Lox3*). Смотрите фигуру 7 и пример 5.

Фигура 9 показывает, как устойчивость масличного рапса (OSR) к насекомым измеряется путем измерения процента повреждений растений капустной молью после ее питания масличным рапсом отредактированной линии с нокдауном *Lox 3* (=SDN1 *Lox3*). Слева: немодифицированный масличный рапс (OSR), справа - SDN-1 *Lox3*. Среднее значение \pm SE N=16. Звездочка (*) обозначает значительную разницу по t-критерию Стьюдента, $P < 0,05$.

Фигура 10 демонстрирует выживаемость личинок на немодифицированных растениях кукурузы (слева) и у кукурузы с нокдауном *Lox 3* (SDN-1 *Lox3*) (справа), описанную в примере 13. Среднее значение \pm SE N=16. Звездочка (*) обозначает значительную разницу по t-критерию Стьюдента, $P < 0,05$.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает средства и способы придания растениям устойчивости или толерантности к некоторым соответствующим патогенным насекомым и, необязательно - дополнительно, к грибковым патогенам. В частности, в настоящем документе рассматриваются болезни кукурузы (*Zm*) и рапса (*OSR*), сильно повреждающие растения. В некоторых случаях грибковым заболеваниям способствуют механические повреждения, вызванные вторжением насекомых, поэтому ущерб, вызванный патогенами может увеличиваться. Таким образом, было показано, что устойчивость или толерантность к насекомым-вредителям может также обеспечивать определенную степень устойчивости или толерантности к грибковым патогенам. Для борьбы с насекомыми, поражающими сельскохозяйственные растения, часто используют инсектициды и свойства *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), то есть генетически модифицированных (*ГМ*) растений, которые производят инсектицидные токсины. Настоящее изобретение предлагает новый подход к борьбе с насекомыми-вредителями с использованием признаков, отличных от *ГМ* (не *ГМ* признаков). Благодаря разработке продукта *TILLING* можно получить признак, отличный от *ГМ* (не *ГМ* признак), повышающий устойчивость к насекомым. Его можно использовать в дополнение к пестицидам чтобы сократить их использование и/или для защиты урожая от насекомых, в случаях, когда пестициды применять невозможно (например, во время дождя). Кроме того, можно добиться нокдауна с помощью подавления экспрессии генов и нокаута с помощью методов редактирования генома.

В одном из предпочтительных аспектов, настоящее изобретение относится к способу придания растениям, предпочтительно кукурузе (*Zea mays*) или масличному рапсу (*OSR*) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к патогенным насекомым, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и/или огневке кукурузной (*Ostrinia nubilalis*) и, необязательно, к патогенным грибам, в частности вида фузариум (*Fusarium*), включающему этапы:

- (i) предоставление по меньшей мере одной растительной клетки, предпочтительно клетки кукурузы или масличного рапса (*OSR*);
- (ii) введение по меньшей мере в одну растительную клетку по меньшей мере одной конструкции, подавляющей ген, по меньшей мере одной системы

редактирования генома или модификации генома, что приводит к целенаправленному нокдауну или нокауту гена *Lox3*, эндогенного для растения;

- (iii) получение по меньшей мере одной модифицированной растительной клетки с пониженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*; и
- (iv) получение по меньшей мере одной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени со сниженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*, необязательно после дополнительного этапа регенерации растительной ткани, органа, растения или семени из по меньшей мере одной модифицированной клетки.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к способу придания растению устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к насекомым и, необязательно, к грибковому патогену, включающему этапы:

- (i) предоставление по меньшей мере одной растительной клетки;
- (ii) введение по меньшей мере в одну растительную клетку по меньшей мере одной конструкции, подавляющей ген, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, что приводит к целенаправленному нокдауну или нокауту гена *Lox3*, эндогенного для растения;
- (iii) получение по меньшей мере одной модифицированной растительной клетки с пониженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*; и
- (iv) получение по меньшей мере одной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени со сниженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*, необязательно после дополнительного этапа регенерации растительной ткани, органа, растения или семени из по меньшей мере одной модифицированной клетки.

В контексте настоящего изобретения было установлено, что снижение или устранение экспрессии эндогенного гена *Lox3* в растениях придает или повышает устойчивость к насекомым-вредителям и, в то же время, может также обеспечивать определенную степень устойчивости к грибковым патогенам. Чтобы уменьшить или отменить экспрессию

эндогенного гена *Lox3*, можно использовать три различных подхода. Экспрессию *Lox3* можно снизить путем подавления гена с использованием конструкции шпильки РНК-интерференции (RNAi), которая содержит в качестве смысловых и антисмысловых последовательностей участка эндогенного гена *Lox3*. В качестве альтернативы можно использовать систему редактирования генома, которая вводит двухцепочечный разрыв (DSB) на или в эндогенной последовательности *Lox3*, что приводит к нарушению или (частичной) замене локуса *Lox3*. Наконец, также возможно путем случайного мутагенеза ввести мутации в эндогенный *Lox3* и идентифицировать такие мутации, которые обеспечивают желаемый нокдаун или нокаут-эффект.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, предпочтительно, чтобы способ, описанный в настоящем документе, не представлял собой получение по меньшей мере одной указанной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени в результате по сути биологического процесса. Вместо этого, указанная по меньшей мере одна растительная клетка, ткань, орган, растение или семя должны быть получены посредством по меньшей мере одного этапа искусственного вмешательства человека, как такового, аналоги которого не встречаются в природе и производят свое воздействие на растительную клетку путем модификации и/или введения фазы технического характера, влияющего на половое скрещивание и отбор. Такая фаза может включать этап редактирования генома, например, для замены интересующего основания или нуклеотида; химическую обработку, например, для хромосомных дупликаций агента или гена, или генного продукта, включая удаление хромосомы; введение экзогенного гена или генетического материала в геном растения (ядерный, митохондриальный или пластидный геном) и тому подобное, или любую комбинацию перечисленных методов.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, описанный выше способ является способом придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis*, зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и/или огневки кукурузной (*Ostrinia nubilalis*), и/или, необязательно, придания растениям кукурузы устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов

Colletotrichum, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydisf*.

Вышеупомянутые патогены наносят большой ущерб кукурузе и значительно снижают ее урожайность. Используя описанные в настоящем документе подходы, можно придать растению устойчивость или толерантность, или повысить его устойчивость или толерантность к этим патогенам. Другое важное культурное растение - масличный рапс, также может страдать от некоторых насекомых или грибковых вредителей.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, описанный выше способ представляет собой способ придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmidiophora brassicae*.

Ген Lox3 в кукурузе (*Zea mays*) представлен последовательностью геномной ДНК SEQ ID №: 6, а кодирующая последовательность представлена последовательностью SEQ ID №: 7. Для линий кукурузы A188, тропической линии кукурузы, линии PH207 и альтернативного транскрипта, геномные последовательности и кодирующие последовательности соответственно представлены последовательностями SEQ ID №№: 9 (A188, геномная ДНК), 10 (A188, кодирующая последовательность), 12 (линия тропической кукурузы, геномная ДНК), 13 (линия тропической кукурузы, кодирующая последовательность), 15 (PH207, геномная ДНК), 16 (PH207, кодирующая последовательность), 87 (альтернативный транскрипт, кодирующая последовательность) и 88 (альтернативный транскрипт, геномная последовательность).

В одном из вариантов выше описанного способа, ген *Lox3* представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88.

Белковые (аминокислотные) последовательности *Lox3* в кукурузе (*Zea mays*), транслированные из вышеуказанных последовательностей нуклеиновых кислот, представлены последовательностями SEQ ID №№: 8 (белок *ZmLox3*), 11 (A188, белок *ZmLox3*), 14 (тропическая линия кукурузы, белок *ZmLox3*), 17 (PH207, белок *ZmLox3*) и 89 (альтернативный транскрипт, белок *ZmLox3*).

В одном из вариантов выше описанного способа, ген *Lox3*, таким образом, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89, или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или по меньшей мере на 99 % идентична последовательности SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89.

Ген *Lox3* масличного рапса (*Brassica napus*) представлен последовательностями геномной ДНК SEQ ID №: 75, 76, 77 и 78, тогда как кодирующие последовательности представлены последовательностями SEQ ID №: 83, 84, 85 и 86.

В одном из вариантов выше описанного способа, ген *Lox3*, таким образом, представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72. %, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86.

Белковые (аминокислотные) последовательности *Lox3* масличного рапса (*Brassica napus*), транслированные из вышеуказанных последовательностей нуклеиновых кислот, представлены последовательностями SEQ ID №: 79, 80, 81 и 82.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, ген *Lox3*, таким образом, кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения согласно любому из выше описанных способов, на этапе (ii), в, по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов.

Методы РНК-интерференции (RNAi) для целенаправленного подавления генов хорошо известны в данной области техники. С этой целью в растительную клетку вводят конструкцию РНК-интерференции (RNAi), которая содержит информацию о последовательности геномной мишени, которая должна быть подавлена в клетке. Конструкцию предпочтительно вводят в виде последовательности ДНК, которая затем в клетке транскрибируется в функциональную РНК. В частности, конструкция РНК-интерференции (RNAi) кодирует смысловую и антисмысловую последовательности, которые представляют собой фрагмент геномной мишени. Комплементарные смысловые и антисмысловые последовательности, которые присутствуют в конструкции в обратном друг другу направлении, при транскрипции образуют двойную цепь РНК, что приводит к образованию шпильки РНК с промежуточной последовательностью интронной петли. Присутствие конструкции РНК-интерференции (RNAi), в конечном итоге, приводит к снижению экспрессии мишени, т.е. к нокдауну.

В одном из вариантов выше описанного способа, конструкция кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, причем конструкция РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку.

В предпочтительном варианте осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), в, по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов, где конструкция представляет собой конструкцию РНК-интерференции (RNAi) или где она кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), активную в растительной клетке, предпочтительно в клетке кукурузы или в клетке масличного рапса (OSR), содержащую смысловую и антисмысловую последовательность,

нацеленную на ген *Lox3*, причем конструкция РНК-интерференции (RNAi), при транскрипции образует шпильку РНК:

(а) где смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4, необязательно, где конструкцию вводят в по меньшей мере одну растительную клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинации.

Предпочтительно, смысловая и антисмысловая последовательности имеют длину от 40 до 500 нуклеотидов, более предпочтительно от 100 до 300 нуклеотидов.

В одном из вариантов осуществления выше описанного способа, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), в по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов, предпочтительно, если конструкцию вводят как часть вектора, который вводится в растительную клетку и который включает (или состоит из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или

последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

В одном из вариантов осуществления способа, описанного в любом из вариантов осуществления изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В других вариантах осуществления способа, описанного в любом из вариантов осуществления изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательностью SEQ ID №: 2.

В еще одном из вариантов осуществления способа, описанного в любом из вариантов осуществления изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В одном из вариантов осуществления способа, описанного в любом из вариантов осуществления изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis* и конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

Конструкция РНК-интерференции (RNAi), предпочтительно, может быть введена на векторе, кодирующем шпильку РНК-интерференции (RNAi), которая образуется при транскрипции.

В одном из вариантов осуществления способа, описанного в любом из вариантов осуществления изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или в повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis* и в растительную клетку вводится вектор, который включает или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

Введение конструкции в растительную клетку может быть достигнуто, например, посредством трансформации или трансфекции. Помимо методов трансформации, основанных на биологических подходах, таких как трансформация *Agrobacterium* или трансформация растений, опосредованная вирусным вектором, популярными методами импорта генетического материала в интересующую растительную клетку или ткань стали и методы, основанные на методах физической доставки, такие как бомбардировка частицами или микроинъекция. Helenius и др. ("Gene delivery into intact plants using the Helios™ Gene Gun", *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18 (3):287-288) раскрывают тему бомбардировки частицами как физический метод переноса материала в растительную клетку. В настоящее время существует множество способов трансформации растений, включающих биологические и физические средства, известные специалисту в области биотехнологии растений, которые могут быть применены для введения генетического материала в форме генетической конструкции в интересующую растительную клетку. Распространенным биологическим способом является трансформация с помощью *Agrobacterium* spp. который десятилетиями использовался для получения различных растительных материалов. Следующую стратегию введения генетического материала в интересующую клетку представляет собой трансформация растений, опосредованная

вирусным вектором. Физические средства, нашедшие применение в биологии растений, - это бомбардировка частицами, также называемая биолитической трансфекцией или опосредованным микрочастицами переносом генов, которая относится к физическому методу доставки для переноса покрытой микрочастицы или наночастицы, содержащей нуклеиновую кислоту или генетическую конструкцию, представляющую интерес, в клетку или ткань-мишень. Физические средства введения подходят для введения нуклеиновых кислот, т.е. РНК и/или ДНК, и белков. Кроме того, существуют методы трансформации или трансфекции для специфического введения нуклеиновой кислоты или интересующей аминокислотной конструкции в растительную клетку, включая электропорацию, микроинъекцию, наночастицы и проникающие в клетку пептиды (CPPs). Кроме того, существуют химические методы трансфекции для введения генетических конструкций и/или нуклеиновых кислот и/или белков, включающие, в частности, трансфекцию фосфатом кальция, трансфекцию липосомами, например, катионными липосомами, или трансфекцию катионными полимерами, включая DEAD-декстран или полиэтиленимин, или их комбинации. Каждый метод доставки должен быть специально отлажен и оптимизирован таким образом, чтобы интересующая конструкция могла быть введена в конкретный участок интересующей клетки-мишени в полностью функциональном и активном виде.

В одном из вариантов выше описанного способа, конструкция вводится в, по меньшей мере одну растительную клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц; химической трансфекции или их комбинацией.

Как уже упоминалось выше, нокаун или нокаут эндогенного гена *Lox3* для придания или повышения устойчивости или толерантности также может быть осуществлен путем редактирования генома, применяемого в качестве альтернативы технологии подавления экспрессии генов.

В одном из вариантов выше описанного способа, на этапе (ii), по меньшей мере одна система редактирования генома вводится в, по меньшей мере одну клетку, которая нацелена на ген *Lox3*, где по меньшей мере одна система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

Методы редактирования генома позволяют ввести двухцепочечный разрыв в одном или нескольких заранее определенных сайтах-мишенях, т.е. рядом с эндогенным *Lox3* или внутри него, тем самым нарушая локус *Lox3* при чем, необязательно, можно вставить экзогенную последовательность или заменить ее. Двухцепочечный разрыв вводится сайт-специфическими нуклеазами, такими как мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) или нуклеазы с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами (CRISPR). Нуклеазы вызывают двухцепочечные разрывы (DSB) в определенных сайтах расщепления, которые восстанавливаются путем негомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинации (HR). Использование репарационной матрицы направляет процесс клеточной репарации таким образом, который обеспечивает безошибочные и предсказуемые результаты репарации. Репарационная матрица предпочтительно включает симметричные или асимметричные плечи гомологии, которые комплементарны последовательностям, фланкирующим двухцепочечный разрыв, и поэтому позволяют вставлять последовательность или закрывать разрыв контролируемым образом.

В одном из вариантов выше описанного способа, по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

Предпочтительная нуклеаза Cpf1 (Cas12a), используемая в способе настоящего изобретения, кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 29, или

последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 29.

Предпочтительная нуклеаза Cpf1 (Cas12a) далее представлена аминокислотной последовательностью SEQ ID №: 28 или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 28.

Система редактирования генома может быть введена путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц; химической трансфекции или их комбинацией, более подробно описанных выше, в контексте конструкции РНК-интерференции (RNAi).

Система коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) включает в себя использование гидовой РНК (gRNA) или CRISPR РНК (crRNA), которая направляет нуклеазу CRISPR к сайту-мишени путем распознавания последовательности.

В предпочтительном варианте осуществления способа, описанного выше в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения и направленного на придание растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или на повышение их устойчивости или толерантности к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности, к виду фузариум (*Fusarium*), по меньшей мере одна система редактирования генома включает протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или, по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35.

В одном из вариантов осуществления способа, описанного выше в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ заключается в придании кукурузе (*Zea*

mays), в частности тропической линии кукурузы устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, *необязательно*, в придании кукурузе (*Zea mays*), в частности тропической линии кукурузы устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis*, и в этом способе по меньшей мере одна система редактирования генома включает протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35.

В одном из вариантов осуществления способа, описанного выше в вариантах осуществления настоящего изобретения, способ предназначен для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или для повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, *необязательно*, для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*, и, в этом способе по меньшей мере, одна система редактирования генома включает крРНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В одном из вариантов осуществления способа настоящего изобретения, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

Дополнительной альтернативой введению модификации, которая приводит к снижению или отмене экспрессии эндогенного *Lox3*, является мутагенез. Из множества мутантов, полученных, например, с помощью применения метода нацеливания на индуцированные локальные поражения в геномах (TILLING), можно выделить те, которые обладают желаемым нокдауном или нокаутом,

В одном из вариантов выше описанного способа, на этапе (ii), мутагенез осуществляется на одной или на множестве клеток путем применения химических веществ или облучения.

Предпочтительно, алкилирующий агент, в частности этилметансульфонат, наносится на одну или на множество клеток, с целью вызвать мутагенез.

В одном из вариантов выше описанного способа, на этапе (ii), одна или несколько мутаций встраиваются в ген *Lox3* и идентифицируются методом нацеливания на индуцированные локальные поражения в геномах (TILLING).

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, на этапе (ii), отбирают одну или несколько клеток с нокдаун- или нокаут-мутациями в гене *Lox3*.

В одном из вариантов выше описанного способа, мутант кукурузы, отобранный на этапе (ii), включает *Lox3* с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей SEQ ID №№: 36-40 или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 36-40.

В другом из вариантов осуществления выше описанного способа, мутант кукурузы, отобранный на этапе (ii), включает *Lox3*, кодируемый последовательностью нуклеиновой

кислоты, выбранной из последовательностей SEQ ID №№: 41-45 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 41 - 45.

В предпочтительном варианте осуществления любого, выше описанного в настоящем изобретении способа придания растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности к видам физариум (*Fusarium*), на этапе (ii) проводят мутагенез и выбирают мутант кукурузы, который включает Lox3 с аминокислотной последовательностью, выбранной из последовательностей SEQ ID №№: 36-40 или аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 36-40.

В предпочтительном варианте осуществления любого, выше описанного в настоящем изобретении способа придания растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности к видам физариум (*Fusarium*), на этапе (ii) проводят мутагенез и выбирают мутант кукурузы, который включает Lox3, кодируемый последовательностью нуклеиновой кислоты, выбранной из последовательностей SEQ ID №№: 41-45, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 41-45.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к клетке кукурузы, ткани кукурузы, органу кукурузы, целому растению кукурузы или семени кукурузы, полученным или получаемым способом, соответствующим любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше.

В следующем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке масличного рапса, ткани масличного рапса, органу масличного рапса, целому растению масличного рапса или семени масличного рапса, полученным или получаемым способом соответствующим любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше.

Настоящее изобретение также предлагает экспрессионные конструкции для специфического воздействия на ген *Lox3* кукурузы и масличного рапса с целью подавления экспрессии гена. Для получения такой конструкции, в качестве смысловых и антисмысловых последовательностей, используются последовательности соответствующего эндогенного гена *Lox3*, которые при транскрипции в клетке образуют шпильку РНК.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, нацеленной на ген *Lox3* в кукурузе для подавления экспрессии генов, где такая конструкция кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, эндогенный для растения кукурузы, которая при транскрипции образует РНК-шпильку.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, нацеленной на ген *Lox3* в масличном рапсе для подавления экспрессии генов, где такая конструкция кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, эндогенный для растения масличного рапса, которая при транскрипции образует РНК-шпильку.

Предпочтительно, смысловая и антисмысловая последовательности имеют длину от 40 до 500 нуклеотидов, более предпочтительно, от 100 до 300 нуклеотидов.

В предпочтительном варианте реализации экспрессионной конструкции, такая экспрессионная конструкция нацелена на ген *Lox3* в кукурузе для подавления экспрессии гена и кодирует конструкцию РНК-интерференции (RNAi), содержащую смысловую и антисмысловую последовательность, нацеленную на ген *Lox3*, эндогенный для растения кукурузы, причем эта конструкция РНК-интерференции (RNAi), при транскрипции, образует РНК шпильку, где

(а) смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или необязательно, при этом шпилька РНК имеет промежуточную последовательность интронной петли, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID №: 3; и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В одном из вариантов реализации экспрессионной конструкции, описанной выше, смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В другом из вариантов реализации экспрессионной конструкции, описанной выше, антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательностью SEQ ID №: 2.

В еще одном из вариантов реализации экспрессионной конструкции, описанной выше, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В следующем из вариантов реализации экспрессионной конструкции, описанной выше, конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к вектору, включающему (или состоящему из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5 или последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к конструкции шпильки РНК-интерференции (RNAi) придающей растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивость или толерантность или повышающей ее устойчивость или толерантность к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности видам фузариум (*Fusarium*), где конструкция шпильки РНК-интерференции (RNAi) содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93 %, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

В еще одном из аспектов, настоящее изобретение относится к конструкции шпильки РНК-интерференции (RNAi) придающей растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивость или толерантность или повышающей ее устойчивость или толерантность к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, придающей или повышающей устойчивость или толерантность к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeaе-maydis*, где конструкция шпильки РНК-интерференции (RNAi) содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4 или

последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% , 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

Настоящее изобретение также предлагает конструкции для редактирования генома, нацеленные на эндогенный ген *Lox3* кукурузы и масличного рапса. Такие системы редактирования генома, в случае системы на основе CRISPR, содержат сайт-специфическую нуклеазу, гидовую РНК и, необязательно, репарационную матрицу.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на ген *Lox3* в кукурузе, где система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

В предпочтительном варианте реализации выше описанной конструкции, предпочтительно по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В одном из вариантов осуществления экспрессионной конструкции, описанной в любом из выше указанных вариантов осуществления настоящего изобретения, экспрессионная конструкция содержит протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на ген *Lox3* в масличном рапсе, где система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее.

В одном из вариантов осуществления выше описанной экспрессионной конструкции, по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В одном из вариантов осуществления выше описанной экспрессионной конструкции, экспрессионная конструкция включает крПНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В другом из вариантов реализации выше описанной экспрессионной конструкции, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%,

81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

В одном из вариантов осуществления выше описанной экспрессионной конструкции, экспрессионная конструкция содержит протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

В еще одном из вариантов, настоящее изобретение относится к вектору, кодирующему экспрессионную конструкцию в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретение, также, предоставляет клетку кукурузы, ткань кукурузы, орган кукурузы, растение кукурузы или семя кукурузы, или клетку масличного рапса, ткань масличного рапса, орган масличного рапса, растение масличного рапса или семя масличного рапса, содержащие экспрессионную конструкцию или вектор в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает использование экспрессионной конструкции из любого из выше описанных вариантов для придания растениям устойчивости или толерантности к насекомому и, необязательно, к грибковому патогену или для повышения такой устойчивости или толерантности, в частности, обеспечивает использование экспрессионной конструкции в любом из выше описанных способов осуществления настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте выше описанного использования, по меньшей мере одна конструкция подавления экспрессии генов и/или по меньшей мере одна система редактирования генома, и/или по меньшей мере одна система модификации генома, определенная в любом из выше описанных вариантов осуществления настоящего изобретения, которая приводит к целевому нокдауну или нокауту эндогенного гена *Lox3*, используется для придания растению, предпочтительно растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности повышения ее устойчивости или толерантности к

гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности к видам *Fusarium*.

В одном из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов и/или по меньшей мере одной системы редактирования генома, и/или модификации генома, которые приводят к целенаправленному нокдауну или нокауту эндогенного гена *Lox3*, для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение относится к использованию по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов и/или по меньшей мере одной системы редактирования генома, и/или модификации генома, которые приводят к целенаправленному нокдауну или нокауту эндогенного гена *Lox3*, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

Согласно одному из подходов, подробно описанному выше, РНК-интерференция (RNAi) или конструкция подавления экспрессии генов может быть использована для придания

растениям устойчивости или толерантности, или повышения их устойчивости или толерантности к насекомым и, необязательно, к грибковым патогенам.

В одном из аспектов, настоящее изобретение, таким образом, относится к использованию конструкции, представляющей собой конструкцию РНК-интерференции (RNAi) или кодирующей конструкции РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на эндогенный ген *Lox3* растения кукурузы, где конструкция РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку, для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной листовенной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydisf*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение, таким образом, относится к использованию конструкции, представляющей собой конструкцию РНК-интерференции (RNAi) или кодирующей конструкции РНК-интерференции (RNAi), включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на эндогенный ген *Lox3* растения масличного рапса, где конструкция РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus pycitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из выше описанных вариантов использования, смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1.

В другом из вариантов использования, согласно любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше, антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательностью SEQ ID №: 2.

В еще одном из вариантов использования, согласно любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше, РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

В одном из вариантов использования, описанных выше, конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

Настоящее изобретение, также, относится к использованию вектора, который включает (или состоит из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5 для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа (*Dichelops melacanthus*) и,

необязательно, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydisf*.

В другом из аспектов, настоящее изобретение, также, относится к использованию системы редактирования генома, в соответствии с любым из описанных выше вариантов осуществления настоящего изобретения.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, использование системы редактирования генома направлено на придание растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности, или на повышение их устойчивости или толерантности к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковому патогену, в частности, к виду фузариум (*Fusarium*).

В одном из выше описанных вариантов использования, по меньшей мере одна система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, хотя бы одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

необязательно, где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

В другом из вариантов использования, описанном в любом из выше описанных вариантов осуществления изобретения, система редактирования генома содержит протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35.

В одном из вариантов выше описанного использования, система редактирования генома нацелена на эндогенный ген *Lox3* в растении кукурузы, причем система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее

для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineohum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

В одном из вариантов выше описанного использования, система редактирования генома содержит протоспейсер, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 32, 33, 34 или 35, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 32, 33, 34 или 35.

В другом из вариантов выше описанного использования, система редактирования генома нацелена на эндогенный ген *Lox3* в растении масличного рапса, причем система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере, одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее

для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

Настоящее изобретение, также, относится к использованию экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, нацеленную на эндогенный ген *Lox3* в растении кукурузы, причем система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1

(CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или для повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растениям устойчивости или толерантности или для повышения устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineohum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zea-maydis*.

Кроме того, настоящее изобретение, также, относится к использованию экспрессионной конструкции, кодирующей систему редактирования генома, которая нацелена на эндогенный ген *Lox3* в растении масличного рапса, причем система редактирования генома включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и
- (б) необязательно, хотя бы одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем

для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

В одном из вариантов выше описанного использования, экспрессионная конструкция включает крПНК, кодируемую любой из последовательностей нуклеиновой кислоты SEQ ID №№: 46-49, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID №№: 46-49.

В другом из вариантов выше описанного использования, система редактирования генома кодируется плазмидой, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 50 или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 50.

Настоящее изобретение, также, относится к использованию вектора, кодирующего определенную выше систему редактирования генома, для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus* и, необязательно, для придания растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышения ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов Фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в

частности из *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis*.

Наконец, настоящее изобретение, также, относится к использованию вектора, кодирующего определенную выше систему редактирования генома, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus picitarsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания растению масличного рапса (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

Пример 1: Создание линии кукурузы с нокдауном гена Lox3 путем РНК-интерференции (RNAi)

Конструкцию шпильки РНК-интерференции (RNAi), направленную против гена ZmLox3, сконструировали (фигура 1, SEQ ID №: 1 - 5) и трансформировали в генотип кукурузы A188 путем трансформации, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенные растения T0 идентифицировали с помощью ПЦР и перенесли в теплицу для получения семян T1 путем самоопыления. Анализ сегрегации проводили на растениях T1. Отбирали гомозиготные растения ZmLox3_RNAi и нетрансгенные азиготные растения и получали семена T2. Семена T2 использовали для анализа их устойчивости к насекомым.

Снижение экспрессии гена ZmLox3 (SEQ ID №: 6 – 16, 87-89) в линиях ZmLox3_RNAi было продемонстрировано с помощью qRT-PCR после выделения РНК из листьев гомозиготных генно-модифицированных (ГМ) и нетрансгенных, азиготных растений (фигура 2). Экспрессию ZmLox3 измеряли с использованием праймера S3460 (SEQ ID №: 18) и праймера S3461 (SEQ ID №: 19). Экспрессию Lox3 нормализовали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства фактора элонгации 1-альфа (EF1, SEQ ID №: 22 и 23) с использованием праймера S3428 (SEQ ID №: 20) и праймера S3429 (SEQ ID №: 21).

Анализ экспрессии листьев кукурузы показал, что линии FDC003-T002, FDC003-T005, FDC003-T010, FDC003-T021 и FDC003-T023 демонстрируют сильное снижение экспрессии *Lox3* (Фигура 2).

Пример 2: Определение устойчивости растений к насекомым путем измерения веса личинок осенней кукурузной совки, питающихся линиями с геном *Lox3*, подавленным путем РНК-интерференции (RNAi).

Цель данного эксперимента - оценить, связано ли подавление гена *Lox3* с устойчивостью кукурузы к гусенице кукурузной лиственной совки. Для этого, в качестве меры устойчивости к антибионтам была выбран набор веса личинок кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*).

Три линии кукурузы с *ZmLox3_RNAi* (FDC003-T002, FDC003-T011 и FDC003-T023) были оценены в сравнении с (с использованием) немодифицированной кукурузой A188 в качестве контрольного растения. Было проведено три независимых эксперимента на анализ устойчивости к насекомым. В каждом эксперименте использовали пять биологических реплик для A188 и для каждой линии *ZmLox3_RNAi*. Три, только что вылупившиеся, личинки кукурузной лиственной совки добавляли в отдельные пробирки Falcon, содержащие листья кукурузы. Ежедневно давали свежие листья, а через десять дней оценивали вес личинки.

Все протестированные линии продемонстрировали значительное повышение устойчивости к гусенице кукурузной лиственной совки (фигура 3). Эти данные подтвердили, что ген *ZmLox3* является геном восприимчивости к кукурузной лиственной совке и что снижение экспрессии гена *ZmLox3* повышает устойчивость.

Пример 3: Определение устойчивости к грибам линии с геном *Lox3*, подавленным путем РНК-интерференции (RNAi).

Поскольку стеблевым и колосовым гнилям, вызываемым *Fusarium spp.*, благоприятствуют механические повреждения растений, наносимые насекомыми, устойчивость к насекомым, опосредованная *Lox3*, может влиять на устойчивость к грибам.

Устойчивая к насекомым линия FDC003-T023 была скрещена с тестовой линией RP5G и проведено сравнение азиготных гибридов FDC0003-T029 и FDC0003-T029 с тестовой линией RP5G, которые не показали подавления LOX3, определенного qRT-PCR (фигура 4, слева). Гибрид FDC003-T023 показал на 13% и 8 % меньше заражения *Fusarium* по сравнению с азиготными гибридами FDC0003-T029 и FDC0003-T029 (фигура 4, справа), что подтверждает, что устойчивая к насекомым линия с РНКи также обладает более высокой устойчивостью к грибковым заболеваниям.

Пример 4: Получение нокдауна Lox3 тропической кукурузы с помощью редактирования генома посредством SDN 1

Lox3 был подавлен в генотипах тропической кукурузы с помощью сайт-направленной нуклеазы.

1. Тропические линии кукурузы выращивали в почве из семян в течение пяти недель, а незрелые метелки собирали, как описано ранее. (WO2021170785).
2. Материал метелок подвергался бомбардировке с использованием следующих векторов:
 - а. TGCD035 (ZmPLT5, SEQ ID №№: 24 и 25)
 - б. GEZM145 (RBP8, SEQ ID №№: 26 и 27)
 - в. GEZM152 (гидовая РНК (gRNA), протоспейсер m7GEP336: GCACGTTCTTGCGCATGAGCA, SEQ ID №: 32)
 - г. GEZM153 (гидовая РНК (gRNA), протоспейсер m7GEP337: GCGCCACCGTCGTTGACAGCA, SEQ ID №: 33)
 - д. GEZM154 (гидовая РНК (gRNA), протоспейсер m7GEP338: CTGTGCAGACAACGGCAACCG, SEQ ID №: 34)
 - е. GEZM155 (гидовая РНК (gRNA), протоспейсер m7GEP339: AGCTTCTCCACSTCCCAGTCG, SEQ ID №: 35)
 - ж. GEMT121 (LbCpf1-RR и tdTomato, SEQ ID №№: 28 - 31)

3. Используя стандартный протокол регенерации тропических линий кукурузы, 12 растений были отобраны и проанализированы методом ампликонного секвенирования с использованием следующих праймеров:

Таблица 1:

Праймер	Последовательность	SEQ ID №
946R	GCTCTCTCGGCCCCCACTTTTT	71
1145F	TGTTCTGCGCCCAGGCTACA	72
346F	TCGCGAACACACCGGTCGTA	73
1948R	ACTCACATGCCTCGCCCTCA	74

Были идентифицированы три растения с правками в гене Lox3. Все три растения были отредактированы в нескольких местах (Таблица 2).

Таблица 2:

	Мишень 1	Мишень 2	Мишень 3
GEZM152T012	100%: делеции 3 и 12 bp	100%: делеции 3 и 12 bp	50%: делеция 15 bp
GEZM152T013	50%: делеция 5 bp	50%: делеция 5 bp	50%: делеция 23 bp
GEZM152T014	100%: делеции 3 и 11 bp	100%: делеция 3 и 11 bp	50%: делеция 15 bp

4. Растения переносили из среды в почву и содержали в условиях короткого дня (in a lean-in Conviron) как можно дольше, чтобы вызвать развитие метелок и початков, прежде чем в конечном итоге переместить их в стандартные тепличные условия.

Пример 5: Определение устойчивости тропической кукурузы к насекомым путем измерения веса личинок кукурузной лиственной совки, питающейся отредактированными линиями тропической кукурузы (с подавленным с помощью SDN1 геном Lox3).

Цель этого эксперимента — оценить, связан ли нокаут гена Lox3 с устойчивостью тропической кукурузы (SL57) к гусенице кукурузной лиственной совки. Чтобы проверить

это, в качестве меры измерения устойчивости к антибиотикам был выбран параметр набор веса личинок кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*).

Три линии тропической кукурузы ZmLox3_SDN-1 из GEZM152T013 оценивались в сравнении с немодифицированной тропической кукурузой SL57021, использованной в качестве контрольного растения для каждой линии ZmLox3_SDN-1. Было проведено три независимых эксперимента на измерение устойчивости к насекомым. В каждом эксперименте использовали шесть биологических реплик для немодифицированной тропической кукурузы SL57021 и для каждой линии ZmLox3_SDN-1. Три только что вылупившиеся личинки кукурузной лиственной совки добавляли в отдельные пробирки Falcon, содержащие листья кукурузы. Ежедневно давали свежие листья, а через пять, восемь, двенадцать и пятнадцать дней оценивали вес личинок.

Линии тропической кукурузы с воздействием SDN-1 на Lox3 продемонстрировали значительное повышение устойчивости к гусенице кукурузной лиственной совки (**фигуры 7 и 8**). Эти данные подтвердили, что ген ZmLox3 является геном восприимчивости к кукурузной лиственной совке и, что подавление экспрессии гена ZmLox3 повышает устойчивость тропической кукурузы.

Пример 6: Получение мутантов с воздействием на Lox3 методом TILLING (нацеливания на индуцированные локальные поражения в геномах)

Мутагенез с использованием этилметансульфоната (EMS mutagenesis): Была создана мутагенизированная популяция (с помощью обработки этилметансульфонатом (EMS)) из PH207. Был проведен скрининг экзонической области 7 Zm00008a004913 и выявлено 5 положительных мутантов, несущих аминокислотные изменения и стоп-кодоны (SEQ ID №№: 36 - 40, Таблица 3). В кДНК Zm00008a004913 мутанта WVP18-09344-014, С в положении 1876 заменен на Т (см. также SEQ ID №: 43), что приводит к аминокислотной замене Р на S в положении 569 (см. также SEQ ID №: 37); в кДНК Zm00008a004913 мутантов WVP18-09309-014 и WVP18-09339-009, G в положении 2004 заменен на А (см. также SEQ ID №: 44), что приводит к аминокислотной замене W на STOP в положении 668 (см. также SEQ ID №: 39); в кДНК Zm00008a004913 мутанта WVP18-09358-016, G в положении 2079 заменен на А (см. также SEQ ID №: 42), что приводит к аминокислотной замене W на STOP в положении 693 (см. также SEQ ID №: 37); в кДНК Zm00008a004913 мутанта WVP18-09307-014, G в положении 2287 заменен на А (см. также SEQ ID №: 45),

что приводит к аминокислотной замене G на S в положении 763 (см. также SEQ ID №: 40). После самоопыления этих мутантов для получения двух классов гомозигот (гомозигот дикого типа и мутанта) они были оценены в полевых условиях на устойчивость к двум видам *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. verticillioides*, см. пример 7).

Таблица 3:

Название мутанта	Название гена	Код	Положение CDS	Основание дикого типа	Основание мутанта	Положение аминокислотной замены (A3)	Аминокислота дикого типа при A3	Аминокислота мутанта при A3
WVP18-09344-014	LOX3	PH207m034b	1876	C	T	569	P	S
WVP18-09309-014	LOX3	PH207m034d	2004	G	A	668	W	STOP
WVP18-09339-009	LOX3	PH207m034d	2004	G	A	668	W	STOP
WVP18-09358-016	LOX3	PH207m034f	2079	G	A	693	W	STOP
WVP18-09307-014	LOX3	PH207m034h	2287	G	A	763	G	S

Пример 7: Определение устойчивости мутантов к грибам при воздействии на Lox3 методом TILLING (нацеливания на индуцированные локальные поражения в геномах)

После самоопыления указанных мутантов для получения двух классов гомозигот (гомозигот дикого типа и мутанта), мутанты были оценены в полевых условиях на устойчивость к двум видам *Fusarium* (*F. graminearum* (FG), *F. verticillioides* (FV)).

В 2020 году растения выращивали рядами - по 20 растений в ряду на участке GON, а в 2021 году - на участке MUR. Десять растений каждой экспериментальной единицы были

инокулированы через четыре-шесть дней после начала цветения экспериментальной единицы, исключая первое растение ряда, с целью избежать возможного эффекта границы. Ряды считались цветущими, когда по меньшей мере 50% растений в ряду образовывали шелковые нити. Даты женского цветения (FF) отмечали для каждого ряда ежедневно.

1 мл суспензии инокулята с концентрацией 15.000 конидий мл⁻¹ (*F. graminearum* (FG)) и 1.000.000 конидий мл⁻¹ (*F. verticilloides* (FV)) инокулировали в канал к шелковым нитям с помощью самозаполняющегося шприца. Эксперименты для двух разных видов проводились отдельно.

Примерно через 50 дней после инокуляции початки очищали от шелухи и все растения визуально оценивали на наличие симптомов фузариоза, определяя процент початка, покрытого мицелием. Оставшиеся незараженные растения каждой экспериментальной единицы использовали в качестве контрольных для определения доли естественно зараженных початков. Для дальнейшего анализа использовали среднее арифметическое значение 10 оцененных инокулированных растений.

Класс гомозиготных мутантов по RH207m034b и RH207m034h показал меньшую зараженность *F. graminearum* (FG) и *F. verticilloides* (FV) (таблица 4А).

Таблица 4А:

Имя записи	FV_ GON	FG_ GON	FV_ MUR	FG_ MUR	Ген	2020		2021				
						Растение_ 2020	Ген	Растение_2 021	Сред. значение_F V_GON	Сред. значение_F G_GON	Сред. значение_F V_MUR	Сред. значение _FG_MUR
PH207	12,60	41,67	45,50	38,13		WVP20- 73701/MIX	WVP20- 72327/MIX					
PH207	18,67	30,00	58,50	32,78		WVP20- 73701/MIX	WVP20- 72372/MIX					
PH207	37,50	56,00	42,22	38,89		WVP20- 73701/MIX	WVN19- 79936/MIX	22,92	42,56	43,92	35,36	
PH207 m034b			16,11	8,86	LOX3- MUT	WVP20- 73214/005	LOX3- MUT	WVP20- 73212/007				
PH207 m034b	17,40		35,50	12,50	LOX3- MUT	WVP20- 73216/005	LOX3- MUT	WVP20- 73212/007				
PH207 m034b	18,33	0,00	8,00	4,11	LOX3- MUT	WVP20- 73217/003	LOX3- MUT	WVP20- 73212/007				
PH207 m034b	9,60	10,00	23,00	9,33	LOX3- MUT	WVP20- 73217/006	LOX3- MUT	WVP20- 73212/007	15,11	5,00	20,65	8,70

PH207					LOX3-	WVP20-	LOX3-	WVP20-		
w034b	36,50	9,63	14,17	25,00	WT	73214/006	WT	73212/007		
PH207					LOX3-	WVP20-	LOX3-	WVP20-		
w034b	40,00	56,63	28,89		WT	73215/005	WT	73212/007		
PH207					LOX3-	WVP20-	LOX3-	WVP20-		
w034b	19,00	30,00	24,00	1,50	WT	73217/004	WT	73212/007		
PH207					LOX3-	WVP20-	LOX3-	WVP20-		
w034b	9,00	36,67		11,50	WT	73217/007	WT	73212/007	26,13	33,23
PH207							LOX3-	WVP20-		
w034b			15,00	28,33			WT	73212/007	20,51	16,58
PH207					LOX3-	WVP20-				
m034h	34,44	53,50	n.d.	n.d.	MUT	73264/004				
PH207					LOX3-	WVP20-				
m034h	28,50	50,00	n.d.	n.d.	MUT	73266/004				
PH207					LOX3-	WVP20-				
m034h	23,00	25,00	n.d.	n.d.	MUT	73268/001				
PH207					LOX3-	WVP20-				
m034h	27,80	54,38	n.d.	n.d.	MUT	73270/002			28,44	45,72

PH207					LOX3-	WVP20-		
w034h	57,00	46,80	n.d.	n.d.	WT	73267/002		
PH207					LOX3-	WVP20-		
w034h	28,11	28,00	n.d.	n.d.	WT	73267/003		
PH207					LOX3-	WVP20-		
w034h	37,78	71,67	n.d.	n.d.	WT	73268/002		
PH207					LOX3-	WVP20-		
w034h	32,40	45,50	n.d.	n.d.	WT	73270/004	38,82	47,99
PH207					LOX3-	WVN18-		
m034d	n.d.	n.d.	0,00	65,83	MUT	76855/003	n.d.	n.d.
PH207					LOX3-	WVN18-		
m034d	n.d.	n.d.	12,50		MUT	76855/008	n.d.	n.d.
PH207					LOX3-	WVN18-		
m034d	n.d.	n.d.		40,00	MUT	76856/005	n.d.	n.d.
PH207					LOX3-	WVN18-		
m034d	n.d.	n.d.	57,50	15,00	MUT	76856/012	n.d.	n.d.
PH207					LOX3-	WVN18-		
m034d	n.d.	n.d.	40,56	41,43	MUT	76857/009	n.d.	n.d.

PH207					LOX3- WVN18-					
m034d	n.d.	n.d.	19,38	47,50	MUT 76858/013	n.d.	n.d.	25,99	41,95	
PH207			100,0		LOX3- WVN18-					
w034d	n.d.	n.d.	0	53,75	WT 76854/012	n.d.	n.d.			
PH207					LOX3- WVN18-					
w034d	n.d.	n.d.	7,50	31,67	WT 76856/006	n.d.	n.d.			
PH207					LOX3- WVN18-					
w034d	n.d.	n.d.	71,67	51,67	WT 76856/009	n.d.	n.d.			
PH207					LOX3- WVN18-					
w034d	n.d.	n.d.	57,00	45,00	WT 76857/007	n.d.	n.d.			
PH207					LOX3- WVN18-					
w034d	n.d.	n.d.	41,67	46,67	WT 76858/008	n.d.	n.d.	55,57	45,75	

В следующей **таблице 4Б** представлен обзор праймеров, использованных для захвата аллелей X и Y d, h, b и f мутантов PH207m034, соответственно:

Мутант	Праймер_			Последовательность	Направление
	Общий SEQ ID №:	Аллель X	Аллель Y		
PH207m034d	90	A	G	94	Обратное
PH207m034h	91	A	G	95	Обратное
PH207m034b	92	C	T	96	Обратное
PH207m034f	93	A	G	97	Обратное

Пример 8: Определение устойчивости мутантов к насекомым при воздействии на *Lox3* методом TILLING (нацеливания на индуцированные локальные поражения в геномах)

Цель данного эксперимента - оценить, связана ли стоп-мутация *Lox3*, осуществленная методом TILLING с устойчивостью кукурузы, произрастающей в умеренном климате (линии PH207) к гусенице кукурузной лиственной совки. Для проверки этого факта, в качестве меры измерения устойчивости к антибионтам был выбран параметр набора веса личинки кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*).

Оценивались два различных стоп-мутанта по *Lox3*, соответствующие дикие типы, полученные из гетерозиготного мутантного растения, и линия PH207, которая является родителем мутантной популяции. Было проведено три независимых эксперимента на оценку устойчивости к насекомым, в каждом из которых использовалось по пять биологических реплик. Три только что вылупившиеся личинки кукурузной лиственной совки были добавлены в отдельные пробирки Falcon, содержащие листья кукурузы. Ежедневно давали свежие листья, а через десять дней оценивали вес личинки.

Пример 9: Создание нокдауна гена *Lox3* масличного рапса (OSR) с помощью редактирования генома посредством SDN1

1. Трансформация на основе агротехнологий, нуклеаза, представлена в той же конструкции, вместе с гРНК (фигура 5: карта конструкции, последовательность плазмиды: pZFNnptII-LbCpf1-tDT-lox3_TTTV, SEQ ID №: 50); всего было использовано четыре крРНК,

нацеленные на ген масличного рапса (OSR) lox3 (SEQ ID №№: 46-49); последовательности BnLox3 SEQ ID №№: 75-86.

- а. Трансформация на основе агротехнологий была использована для создания растений (GE - от generate) с использованием различных исходных материалов рассады в возрасте от 1 до 10 дней.

Протокол трансформации масличного рапса включает следующие шаги:

1. Стерилизация семян 70% этанола и хлорки;
 2. Проращивание семян на среде для проращивания;
 3. Культивирование штамма *Agrobacterium*, содержащего интересующую конструкцию;
 4. Подготовка *Agrobacterium* для инокуляции;
 5. Подготовка растительного материала и совместное культивирование;
 6. Восстановление каллуса;
 7. Отбор;
 8. Рост побегов;
 9. Укоренение.
2. Молекулярные анализы: Секвенирование следующего поколения (NGS), цифровая капельная ПЦР (ddPCR) и Decomposition Regression to Identify Variations for Editing Events (DRIVE).

- а. Сначала, отредактированные геном SDN-1 растения, анализировали на наличие трансгена методом qPCR, используя настройки, приведенные в таблицах 5 и 6:

Таблица 5:

	Праймер	Концентрация рабочего	SEQ ID №

		материала (μ M)	
Праймеры	cruaxxxxxxf02x	20	51
	cruaxxxxxxr01x	20	52
	nptlxxxxf01	20	53
	nptlxxxxr01	20	54
	tDTxxxxf04	20	55
	tDTxxxxr01	20	56
зонды	CruaxxxMGB	10	57
	nptlxxxxMGB	10	58
	tDTxxxxMGB	10	59

qPCR параметры:

Таблица 6:

50°C	2 мин.	
95°C	5 мин.	
95°C	15 сек.	40 циклов
60°C	30 сек.	

- б. Затем трансгенные растения были проанализированы методом qPCR с использованием наборов праймеров SEQ ID №: 60, 61 и 62 (зонда) для нуклеаного теста.
- в. Профиль редактирования был получен путем амплификации и секвенирования ПЦР-продукта с использованием наборов праймеров, показанных в таблице 7, а затем был проведен Drive-анализ в OMICS для получения информации о редактировании.

Таблица 7:

	Праймер	SEQ ID №:
IR106_lox3_F1	CCTCTGACCTCCAAAAGACCCTTA	63
IR106_lox3_F2	CCATTA CT TGT TTTGGTCGGCGT	64
IR106_lox3_F3	GCCATCACTTGT TTTCTCGGC	65
IR106_lox3_F4	CCGTC ACT TGT TTTCTCGGC	66

IR106_lox3_R1	TCAAAGGCTAATATAACTGACACGT	67
IR106_lox3_R2	GGCAAACGCGTTTCCTTAATTCA	68
IR106_lox3_R3	ATAACGCTGATGTGCTAAGC	69
IR106_lox3_R4	GTTAATAACGCTGATGTACTAAGC	70

Пример 10: Определение устойчивости масличного рапса (OSR) к насекомым путем измерения повреждений листьев капустной молью и путем измерения размножения тли, питающейся насекомыми на отредактированной линии (Lox3 SDN1)

Цель данного эксперимента - оценить, связан ли нокаут гена Lox3 с устойчивостью масличного рапса (OSR, Palma) к капустной моли и зеленой персиковой тле. Для такой проверки, в качестве параметров для меры измерения устойчивости растений были выбраны процент повреждений, вызванных питанием капустной моли (*Plutella xylostella*) и количество особей зеленой персиковой тли в процессе размножения (*Myzus persicae*).

Одна линия Lox3_SDN-1 масличного рапса (OSR) оценивалась с использованием в качестве контрольного растения немодифицированного масличного рапса (*Palma*). Было проведено три независимых эксперимента на проверку устойчивости к насекомым; для каждого эксперимента использовалось четырнадцать биологических реплик.

Для теста на устойчивость к капустной моли, на каждый саженец масличного рапса (OSR) возрастом в одну неделю помещались по четыре только что вылупившиеся личинки. Через четыре дня, процент повреждения растений (= процент листьев, съеденных личинкой) оценивался визуально по шкале от 0 до 100%.

Для теста на устойчивость к зеленой персиковой тле, на каждый однонедельный саженец масличного рапса (OSR) помещали по одной взрослой тле. Через семь дней регистрировали количество особей тли на каждом саженце (взрослая тля + потомство).

Пример 11: Определение устойчивости линий масличного рапса (OSR) с отредактированным геном Lox3 к грибам

Тест на заболеваемость корней

В поле собирались зараженные корни масличного рапса. 100 г зараженных корней измельчали и добавляли в 400 мл воды. Затем, раствор грубо фильтровали. Для скрининга использовались два разных изолята: изолят А (сорта, выведенные по методу Менделя,

которые демонстрируют устойчивость) и С (сорта, выведенные по методу Менделя, которые обладают высокой восприимчивостью).

Тестируемые растения масличного рапса (OSR) высевали в песок и собирали через 10-14 дней. Корни промывали и инкубировали в растворе спор в течение 15-20 минут. Затем, растения извлекали и высаживали в почвенно-песчаный субстрат. После этого, раствор спор дополнительно наносился пипеткой непосредственно на растения. Затем, растения выращивали в тепличных условиях в течение примерно 6 недель.

После промывки корней, образование галлов оценивали по шкале от 1 до 4, где 1 - означает отсутствие галлов, 4 - сильное образование галлов (фигура 6). Индекс заболеваемости (DI) рассчитывали (E. Diederichsen and M.D. Sacristan, Plant Breeding 115, 5-10 (1996), Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor.) по следующей формуле:

$$DI = \frac{\sum(0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3)}{3N} \times 100$$

Значения $n_0 - n_3$ соответствуют количеству растений в каждом классе, а N - общему количеству тестируемых растений. Генотипы с индексом заболеваемости (DI) <10 были оценены как высокоустойчивые. Генотипы с индексом заболеваемости (DI) в диапазоне 10-25 оценивались как устойчивые, а генотипы с индексом заболеваемости (DI) >25 - как восприимчивые.

Тест на заболеваемость черной ножкой

Рассаду масличного рапса (OSR) проращивали в почве, в камере с контролируемой средой, при температуре 20-24°C, в течение семи дней. Каждую полностью раскрывшуюся семядолю дважды прокалывали иглой. Раны инокулировали раствором 10⁷ пикнидиоспор, полученных из немецкого полевого изолята (пикнидии собирали из выращенного на среде гриба, суспендировали в стерильной воде и определяли количество). Чтобы отсрочить старение семядолей, настоящие листья срезали у черешка. Примерно через 10 дней симптомы оценивали по шкале от 1 до 6 (1-3 = устойчивый, 4-6 = восприимчивый), основываясь на возрастающем повреждении семядоли и споруляции гриба.

Пример 12: Устойчивость масличного рапса (OSR) к насекомому – капустной моли, после питания насекомом растениями линии масличного рапса с отредактированным, с использованием SDN1, Lox3

Цель этого эксперимента заключалась в дальнейшей оценке (см. **пример 10** выше) того, связан ли нокаут гена Lox3 с устойчивостью масличного рапса к капустной моли (*Plutella xylostella*). Чтобы проверить это, в качестве меры для измерения устойчивости основанной на антиксенозе, было выбрано процентное повреждение растений (процент листьев, съеденных капустной молью).

Линию масличного рапса Lox3_SDN-1 оценивали, используя в качестве контрольного растения немодифицированный масличный рапс (генотип *Palma*).

Для немодифицированного масличного рапса Palma и для линии Lox3_SDN-1 использовали 16 биологических реплик. Две только что вылупившиеся личинки капустной моли помещали в контейнер, содержащий диск из листьев масличного рапса, помещенный на агар. Личинкам давали питаться в течение четырех дней и подсчитывали процент съеденных листьев.

Среди масличного рапса (OSR), линия масличного рапса SDN-1 Lox3, также, продемонстрировала значительное повышение устойчивости к капустной моли (**фигура 9**). Полученные данные подтвердили, что личинки капустной моли, питающиеся масличным рапсом с нокаутированным Lox3, наносят меньший ущерб растениям по сравнению с личинками, питающимися обычным масличным рапсом, и что Lox3 четко связан с сильным фенотипом устойчивости к насекомым, также и у растений масличного рапса (OSR).

Пример 13: Модификация Lox3 придает устойчивость к патогенам широкого спектра, включая устойчивость к огневке (*Ostrinia*)

Целью данного эксперимента было оценить на тропической кукурузе (SL57021), связан ли нокаут гена Lox3 с устойчивостью к другим патогенным насекомым, включая устойчивость к огневке кукурузной (*Ostrinia nubilalis*). Для этого, в качестве меры измерения устойчивости к антибионтам был выбран параметр выживаемости личинок огневки кукурузной дикого типа (*Ostrinia nubilalis*, дикий тип чувствителен/восприимчив к инсектицидам и инсектицидным токсинам).

ZmLox3_SDN-1 тропической линии кукурузы GEZM152T013 оценивался с использованием в качестве контрольного растения немодифицированной тропической кукурузы SL57021. Для немодифицированной тропической кукурузы SL57021 и для ZmLox3_SDN-1 было использовано 16 биологических реплик. Десять только что вылупившихся личинок кукурузной огневки помещали в контейнер с листьями кукурузы, взятыми у немодифицированной тропической кукурузы SL57021 или у ZmLox3_SDN-1. Свежие листья давали каждый день, а через шесть дней оценивали выживаемость личинок.

Линия тропической кукурузы с Lox3, модифицированным SDN-1, продемонстрировала значительное повышение устойчивости к огневке кукурузной (фигура 10).

Эти данные, наглядно продемонстрировали, что личинки огневки кукурузной, питавшиеся кукурузой с нокаутированным Lox3, имели более высокий уровень смертности по сравнению с личинками, питавшимися обычной кукурузой.

В целом, этот вывод еще раз подтвердил, что Lox3 является основополагающим фактором в придании устойчивости нескольким важным сельскохозяйственным растениям разных видов к патогенным насекомым и грибам.

Формула изобретения

1. Способ придания растениям, предпочтительно растениям кукурузы (*Zea mays*) и растениям масличного рапса (*OSR*) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к патогенным насекомым, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и/или к огневке кукурузной (*Ostrinia nubilalis*) и, необязательно, к грибковым патогенам, в частности к видам фузариум (*Fusarium*), который включает следующие шаги:

(i) обеспечение по меньшей мере одной растительной клетки, предпочтительно клетки растения кукурузы или клетки растения масличного рапса;

(ii) введение по меньшей мере в одну растительную клетку по меньшей мере одной конструкции, подавляющей ген, по меньшей мере одной системы редактирования генома или модификации генома, что приводит к целенаправленному нокдауну или нокауту гена *Lox3*, эндогенного для растения;

(iii) получение по меньшей мере одной модифицированной растительной клетки с пониженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*; и

(iv) получение по меньшей мере одной растительной клетки, ткани, органа, растения или семени со сниженной или отмененной экспрессией гена *Lox3*, необязательно после дополнительного этапа регенерации растительной ткани, органа, растения или семени из по меньшей мере одной модифицированной клетки.

2. Способ, в соответствии с пунктом 1, где способ заключается в придании растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из гусеницы кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*), кукурузной цикадки *Dalbulus maidis* и зеленого вонючего клопа *Dichelops melacanthus*, или огневки кукурузной (*Ostrinia nubilalis*), и/или предпочтительно, где способ заключается в придании растению кукурузы (*Zea mays*) устойчивости или толерантности или повышении ее устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из видов фузариум (*Fusarium*), видов *Colletotrichum*, в частности *Colletotrichum graminicola* и *Colletotrichum sublineolum*, видов *Diplodia*, *Cercospora zeina* и *Cercospora zeae-maydis* to/in maize.

3. Способ, в соответствии с пунктами 1 и 2, где способ предназначен для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его

устойчивости или толерантности к одному или нескольким насекомым, выбранным из группы, состоящей из зеленой персиковой тли (*Myzus persicae*), капустной моли (*Plutella xylostella*), рапсовой блошки (*Psylliodes chrysocephala*), блошки крестоцветной (*Phyllotreta cruciferae*), полосатой блошки (*Phyllotreta striolata*), блошки конопляной (*Psylliodes punctulata*), скрытнохоботника стеблевого рапсового (*Ceutorhynchus piciparsis*) и скрытнохоботника стеблевого капустного (*Ceutorhynchus quadridens*) и, необязательно, для придания масличному рапсу (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения его устойчивости или толерантности к одному или нескольким грибковым патогенам, выбранным из группы, состоящей из *Phoma lingam* и *Plasmodiophora brassicae*.

4. Способ, в соответствии с любым из предшествующих пунктов, где ген *Lox3* представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16, 87 или 88, соответственно, или где ген *Lox3* представлен последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86 или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 75, 76, 77, 78, 83, 84, 85 или 86, соответственно.

5. Способ, в соответствии с любым из предшествующих пунктов, где ген *Lox3* кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 8, 11, 14, 17 или 89, соответственно, или где ген *Lox3* кодирует аминокислотную последовательность SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 79, 80, 81 или 82, соответственно.

6. Способ, в соответствии с любым из предшествующих пунктов, где на этапе (ii), в, по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов, где конструкция представляет собой конструкцию

для РНК-интерференции (RNKi) или, где конструкция кодирует конструкцию для РНК-интерференции, включающую смысловую и антисмысловую последовательности, нацеленные на ген *Lox3*, где эта конструкция для РНК-интерференции, при транскрипции, образует РНК-шпильку,

(а) где смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4, необязательно, где конструкцию вводят в по меньшей мере одну растительную клетку путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой; трансформации, опосредованной *Agrobacterium*; путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинации.

7. Способ, в соответствии с пунктом 6, где РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3.

8. Способ, в соответствии с любым из предшествующих пунктов, где на этапе (ii), в по меньшей мере одну растительную клетку, вводят конструкцию, которая нацелена на ген *Lox3* для подавления экспрессии генов, предпочтительно, если конструкцию вводят как часть вектора, вводимого в растительную клетку, который включает (или состоит из) последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 5, или последовательность (последовательности) нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 5.

9. Способ, в соответствии с любым из пунктов 1 - 5, где на этапе (ii) в, по меньшей мере одну клетку вводится по меньшей мере одна система редактирования генома, конструкция которой нацелена на ген *Lox3*, при этом по меньшей мере одна система редактирования генома включает в себя:

(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

необязательно, где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем; и

необязательно, где по меньшей мере одна система редактирования генома вводится в, по меньшей мере одну клетку кукурузы или масличного рапса (OSR) путем трансформации или трансфекции, опосредованной биолитической бомбардировкой или трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, путем доставки микро- или наночастиц, химической трансфекции или их комбинацией.

10. Способ, в соответствии с любым из пунктов 1 - 5, где на этапе (ii) проводят мутагенез для получения по меньшей мере одной модификации генома на одной клетке или на множестве клеток путем применения химических веществ или облучения, предпочтительно, когда алкилирующий агент, включая этилметансульфонат, наносится на одну или на множество клеток, с целью индуцировать мутагенез.

11. Способ, в соответствии с пунктом 10, где одна или несколько мутаций в гене *Lox3* вставлены и идентифицированы методом TILLING на этапе (ii) и/или где на этапе (ii), отбирают одну или несколько клеток с нокдаун- или нокаут-мутациями в гене *Lox3*.

12. Клетка, ткань, орган, растение или семя кукурузы, или масличного рапса (OSR), полученные или получаемые методом в соответствии с любым из предыдущих пунктов.

13. Экспрессионная конструкция, которая нацелена на ген *Lox3* в кукурузе или масличном рапсе (OSR) с целью подавления гена, причем такая конструкция кодирует конструкцию для РНК-интерференции (RNAi), содержащую смысловую и антисмысловую последовательность, нацеленную на ген *Lox3*, эндогенный для растений кукурузы или масличного рапса (OSR), где конструкция для РНК-интерференции (RNAi) при транскрипции образует РНК-шпильку, где

(а) смысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 1, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 1; и/или

(б) где антисмысловая последовательность кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 2, или последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 2, и/или необязательно, где РНК-шпилька имеет промежуточную последовательность интронной петли, включающую последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 3, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 3; и/или

(в) предпочтительно, где конструкция включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

14. Конструкция шпильки РНК-интерференции (RNAi) для придания растению кукурузы (*Zea mays*) или растению масличного рапса (OSR) (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к патогенным насекомым, предпочтительно к гусенице кукурузной листовенной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковым патогенам, в частности к видам фузариум (*Fusarium*), где конструкция шпильки РНК-интерференции (RNAi) включает последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID №: 4, или последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%,

77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID №: 4.

15. Экспрессионная конструкция, кодирующая систему редактирования генома, которая нацелена на ген *Lox3* в кукурузе или масличном рапсе (OSR), где система редактирования генома включает в себя:

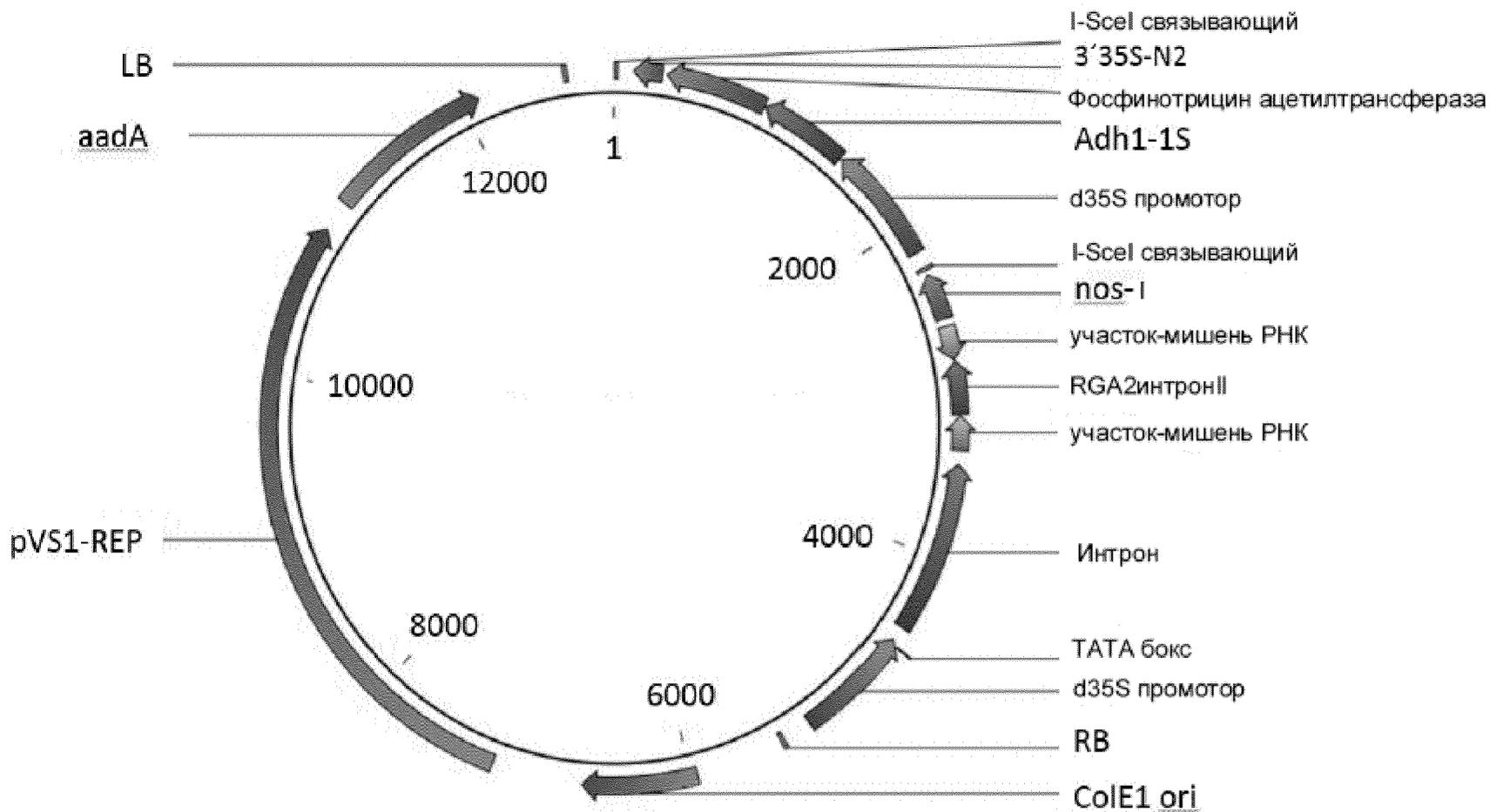
(а) по меньшей мере одну сайт-специфическую нуклеазу или сайт-специфическую нуклеазу, и, необязательно, в случае использования системы CRISPR, по меньшей мере одну гидовую молекулу или последовательность, кодирующую ее, и

(б) необязательно, по меньшей мере одну репарационную матрицу или последовательность, кодирующую ее,

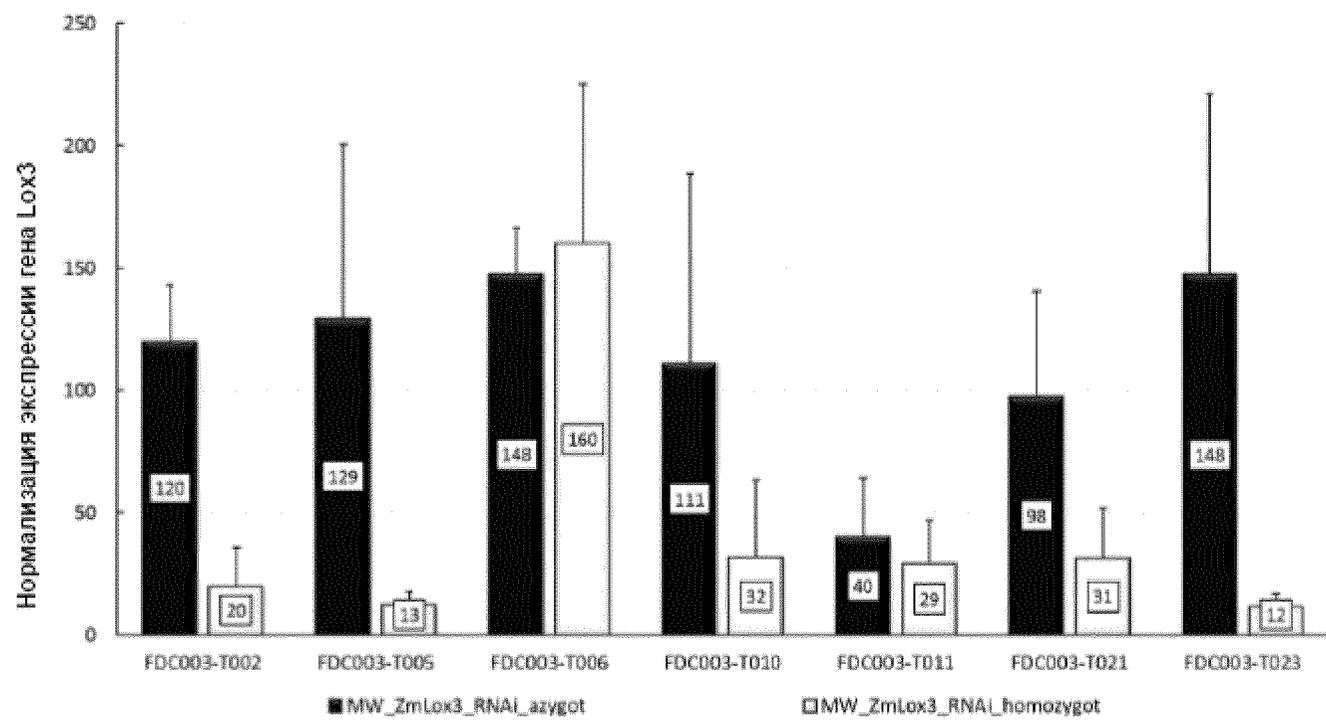
предпочтительно где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы CRISPR/Cas, предпочтительно из системы CRISPR/MAD7, системы CRISPR/Cpf1 (CRISPR/Cas12a), системы CRISPR/MAD2, системы CRISPR/Cas9, системы CRISPR/CasX, системы CRISPR/CasY, системы CRISPR/Cas13, или системы CRISPR/Csm, или где по меньшей мере одна система редактирования генома выбрана из системы нуклеазы цинкового пальца, или системы нуклеазы подобной активаторам транскрипции, или системы мегануклеазы, или любой комбинации, варианта или активного фрагмента этих систем.

16. Клетка, ткань, орган, растение или семя кукурузы, или масличного рапса (OSR), содержащие экспрессионную конструкцию, или вектор, кодирующий ее, или конструкцию шпильки РНК-интерференции (RNAi), или вектор, кодирующий ее, в соответствии с любым из пунктов 13-15.

17. Использование по меньшей мере одной конструкции для подавления экспрессии генов и/или по меньшей мере одной системы редактирования генома и/или по меньшей мере одной системы модификации генома, определенных в любом из пунктов 1-11 или 13-15, что приводит к целенаправленному нокауту или нокдауну эндогенного гена *Lox3*, для придания растениям кукурузы (*Zea mays*) или растениям масличного рапса OSR (*Brassica napus*) устойчивости или толерантности или повышения их устойчивости или толерантности к патогенным насекомым, предпочтительно к гусенице кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) и, необязательно, к грибковым патогенам.

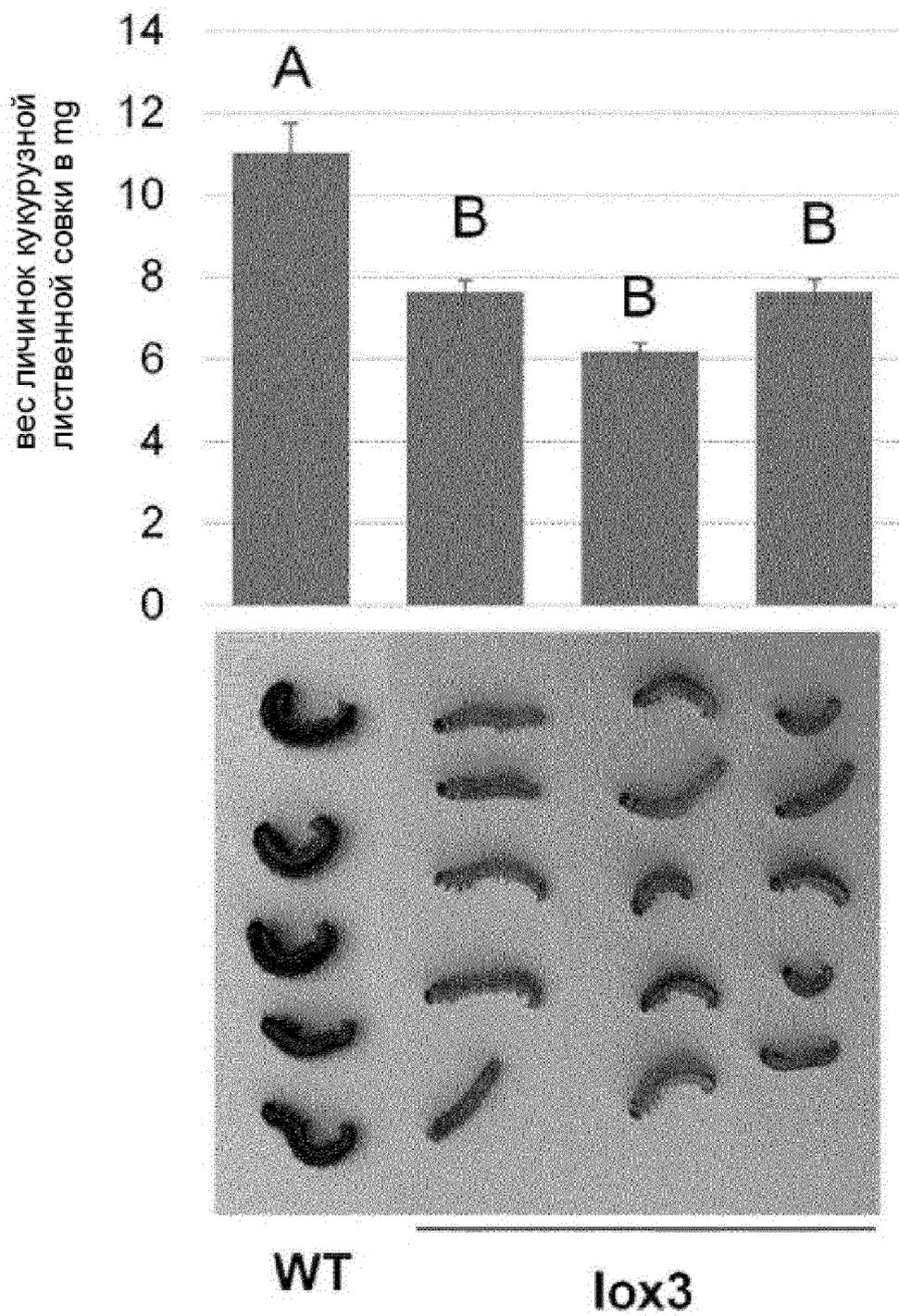


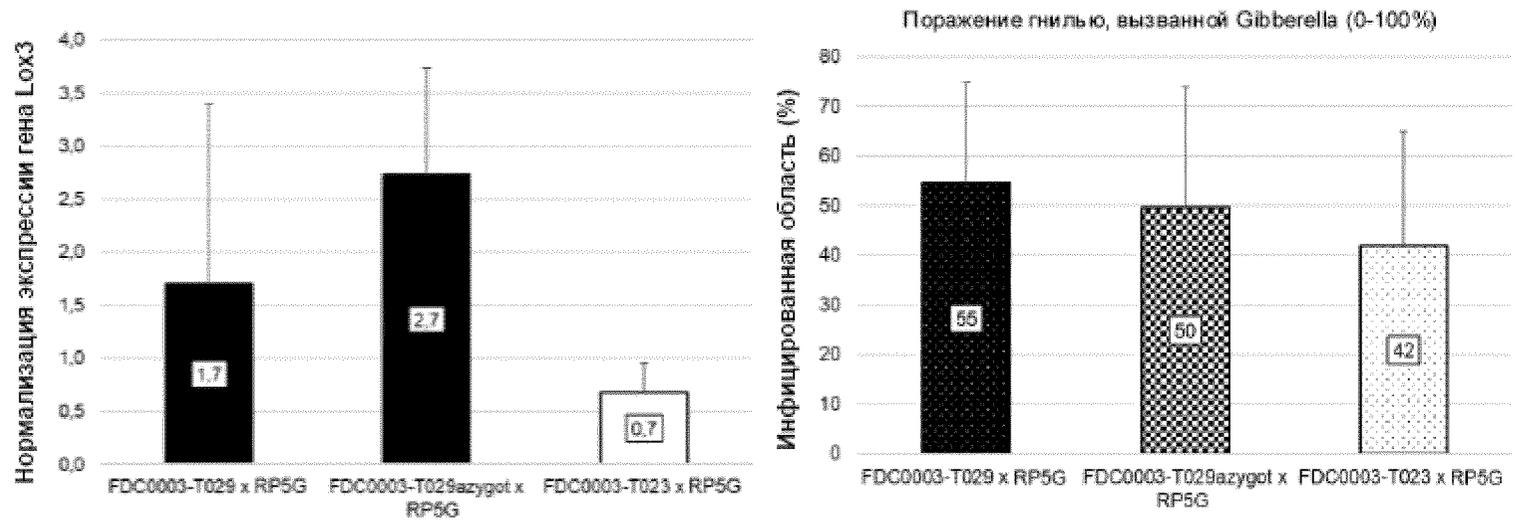
Фигура 1:



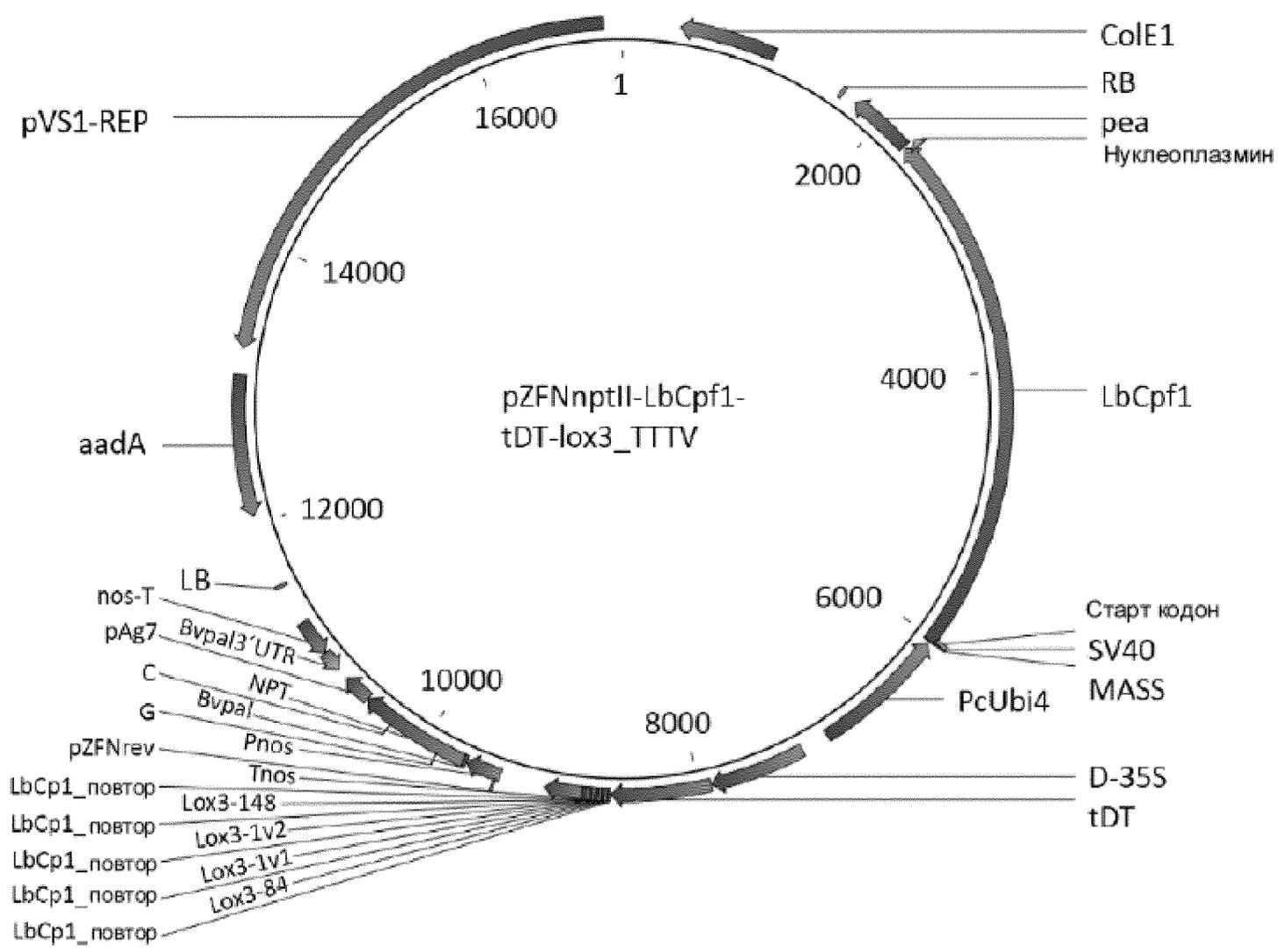
Фигура 2:

Фигура 3:



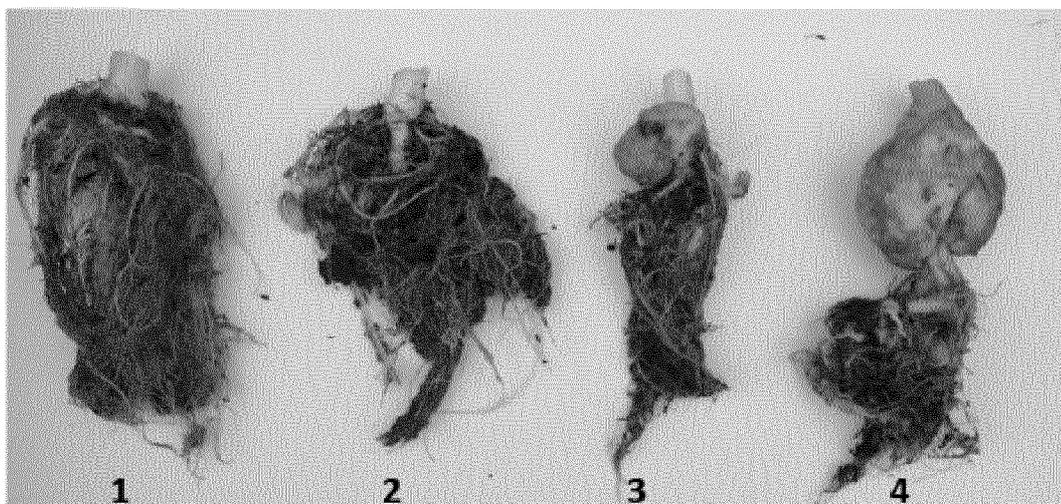


Фигура 4:

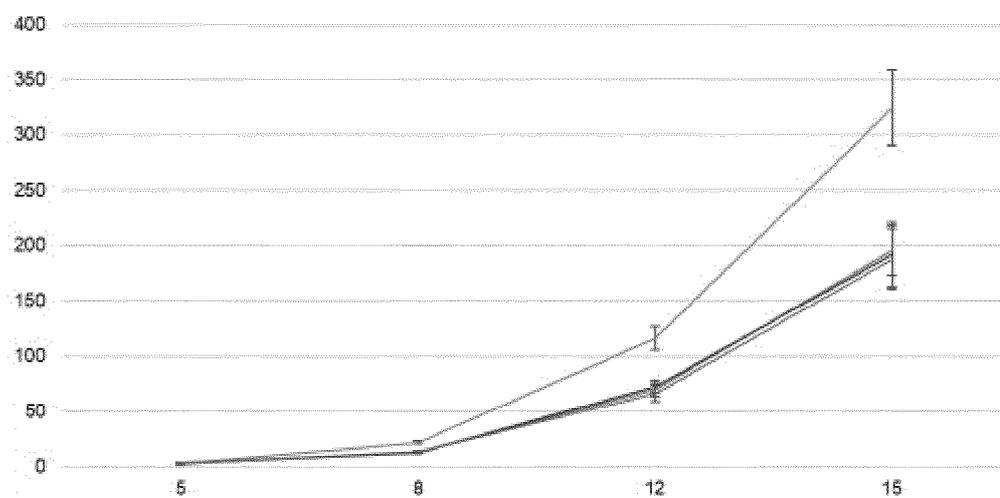


Фигура 5:

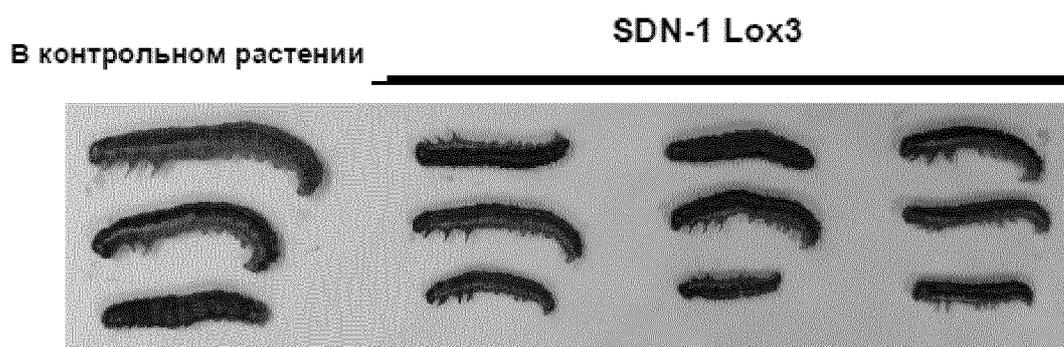
Фигура 6:



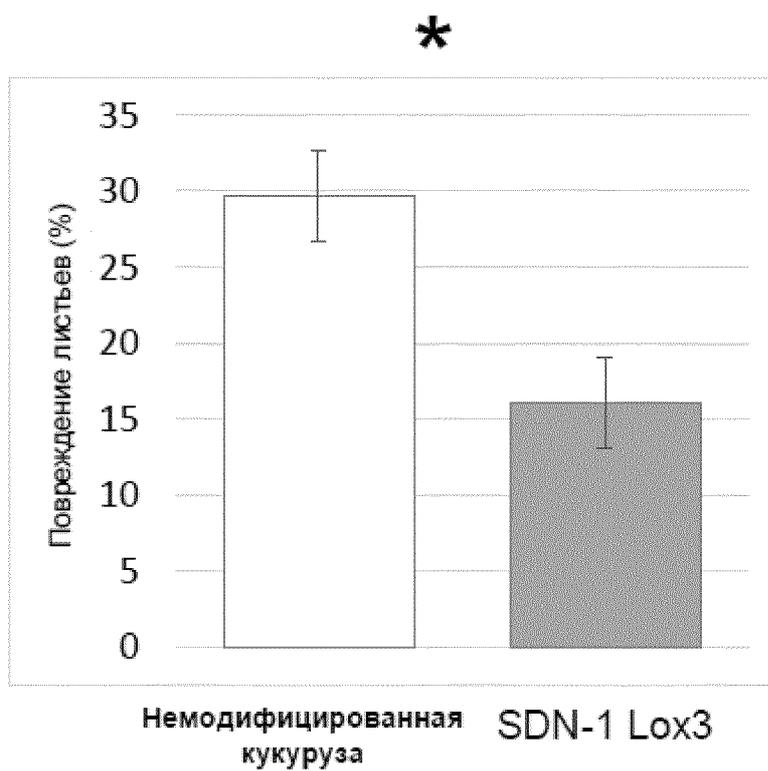
Фигура 7:



Фигура 8:



Фигура 9:



Фигура 10:

