

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991547 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.01.17

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

(22) Дата подачи заявки
2017.12.22

(54) ПРИМЕНЕНИЕ CRY14 ДЛЯ БОРЬБЫ С ВРЕДИТЕЛЯМИ НЕМАТОДАМИ

(31) 62/438,420

(32) 2016.12.22

(33) US

(86) PCT/US2017/068070

(87) WO 2018/119336 2018.06.28

(71) Заявитель:

БАСФ АГРИКУЛЬЧУРАЛ
СОЛЮШНС СИД УС ЛЛСи (US)

(72) Изобретатель:

Даум Юлия, Эллинг Аксель (US)

(74) Представитель:

Беляева Е.Н. (BY)

(57) Настоящим изобретением предоставляются композиции и способы придания нематоцидной активности бактериям, растениям, клеткам, тканям и семенам растений. В частности, настоящим изобретением предоставляются способы уничтожения или борьбы с популяцией вредителей нематод, в частности, с видами рода *Pratylenchus*, например с популяцией *Pratylenchus brachyurus*. Эти способы включают контактирование вредителя нематоды с пестицидно-эффективным количеством полипептида, содержащего нематоцидный токсин, в частности, нематоцидный токсин, обладающий активностью в отношении видов рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*. Кроме того, настоящее изобретение касается способов увеличения урожайности растений путем экспрессии токсина согласно изобретению.

A1

201991547

201991547

A1

Применение CRY14 для борьбы с вредителями нематодами

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Для настоящей заявки испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент № 62/438,420, поданной 22 декабря 2016г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, КОТОРЫЙ БЫЛ ПРЕДСТАВЛЕН В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Официальная копия перечня последовательностей представляется в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII в виде файла с именем "APA16-6020WOSEQLIST.txt", дата создания файла: 3 октября 2017 г., размер файла: 40 Кбайт, который предоставляется одновременно с описанием изобретения. Перечень последовательностей, содержащийся в указанном документе в формате ASCII, является частью описания изобретения и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии. Настоящим изобретением предоставляются способы борьбы с вредителями нематодами с использованием Cry14.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Нематоды представляют собой активные, гибкие, удлинённые организмы, которые живут на влажных поверхностях или в жидких средах, включая водяные пленки в почве и влажные ткани в других организмах. В ходе эволюции многие виды нематод стали весьма успешными паразитами растений и животных; они являются причиной значительных экономических потерь в сельском хозяйстве и животноводстве, а также высокой людской заболеваемости и смертности (Whitehead (1998) Plant Nematode Control. CAB International, Нью-Йорк).

Убытки, причиняемые ежегодно паразитическими нематодами садоводству и сельскому хозяйству во всем мире, оцениваются более чем в 78 миллиардов долларов, при этом оценочные средние ежегодные убытки по основным культурам составляют 12%. Например, оценочный ущерб во всем мире при выращивании сои составляет приблизительно 3,2 миллиарда долларов в год (Barker et al. (1994) Plant and Soil Nematodes: Societal Impact and Focus for the Future. The Committee on National Needs and Priorities in Nematology. Cooperative State Research Service, US Department of Agriculture and Society of Nematologists). На рынках с большими посевными площадями наиболее высокий ущерб нематоды приносят посевам сои и хлопка. Тем не менее, существуют десятки других культур, которые страдают от значительного заражения нематодами – такие культуры включают картофель, перец, лук, цитрусовые, кофе, сахарный тростник, оранжерейные декоративные растения и дернообразующие травы для полей для гольфа.

Известно, что нематоды влияют на урожайность, рост и здоровье сельскохозяйственных культур и растений. Физиологические изменения корней зараженного растения, вызванные личинками нематод и/или взрослыми нематодами, могут привести к образованию галлов, в результате чего возникают нарушения сосудистой системы корней растения. Рост корня может прекратиться полностью, что может привести к недостаточному поступлению воды и питательных веществ из-за уменьшения корневой системы, что приведет к хлорозу и/или увяданию листьев, а также к замедлению роста – все это может стать причиной низкой урожайности или гибели растений. Кроме того, нематоды могут вызывать физиологические эффекты, приводящие к увеличению восприимчивости корней растений к воздействию бактерий и/или грибов, в том числе таких бактерий и/или грибов, которым растение в противном случае могло бы противостоять. Такая атака может привести к обширному вторичному гниению.

Среди патогенов сои все более опасной становится корневая нематода *Pratylenchus brachyurus*. Она может селиться в различных видах-хозяевах и имеет широкое распространение в тропических и субтропических регионах, в частности, в Бразилии, Африке и на юге Соединенных Штатов. Среди производителей хлопка и сои в регионе Серрадо в Бразилии заражение *Pratylenchus brachyurus* стало одной из основных проблем, так как она считается основным нематодным патогеном сои в этом регионе. Эта нематода может снижать урожайность сои на 30-50%, причем на песчаных почвах наблюдается еще больший ущерб. До сих пор устойчивых к *P. brachyurus* сортов сои не обнаружено. Несмотря на то, что проводили исследования различных генотипов сои на устойчивость к *Pratylenchus brachyurus*, и было идентифицировано несколько сортов с повышенной устойчивостью, при селекции сортов устойчивых к *P. brachyurus* возникают трудности из-за того, что эта нематода является полифагом и не имеет тесного взаимодействия с растениями-хозяевами (Machado (2014) Current Agricultural Science and Technology 20:26-35; Antonio et al. (2012) Soil productivity losses in area infested by the nematoid of the root lesions in Vera, MT. In: Brazilian Congress of Soy, 6, 2012, Cuiabá. Abstracts. Londrina: Embrapa Soja, 4pp; Rios et al. (2016) Ciência Rural 46:580–584; Lima et al., 2017, Chapter 6 в книге: Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity; Edited by Minobu Kasai, ISBN 978-953-51-3118-2, Print ISBN 978-953-51-3117-5, InTech; Inomoto et al. (2011) Sucessão de culturas sob pivô central para controle de fitonematoides: variação populacional, patogenicidade e estimativa de perdas. Tropical Plant Pathology 36:178-185).

Было предоставлено несколько способов борьбы с заражением нематодами. Во многих случаях были предприняты попытки бороться с нематодами с применением биологических и агротехнических мер, включая фитокарантинные меры борьбы. У некоторых коммерческих сортов (например, сои) наблюдается генетическая устойчивость к определенным нематодам, однако количество таких сортов ограничено, а количество сортов, имеющих одновременно необходимые агрономические характеристики и устойчивость к нематодам, совсем мало. Кроме того, получение устойчивых к нематодам коммерческих сортов путем традиционной селекции растений на основании генетической рекомбинации путем полового скрещивания представляет собой медленный процесс и часто еще более затруднено отсутствием соответствующего генетического материала.

Химические средства борьбы с паразитическими нематодами растений по-прежнему важны для многих культур, которым не хватает необходимой природной устойчивости. Тем не менее, химические агенты зачастую являются неселективными, некоторые из них воздействуют на нецелевые организмы, при этом после применения агента популяции полезных микроорганизмов уничтожаются. Химические агенты могут накапливаться в окружающей среде, и их распад происходит очень медленно.

Таким образом, существует потребность в дополнительных средствах борьбы с популяциями нематод на посевах сельскохозяйственных растений.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящим изобретением предоставляются композиции и способы придания нематоцидной активности растениям, клеткам, тканям и семенам растений. В частности, настоящим изобретением предоставляются способы уничтожения вредителей нематод или борьбы с популяцией вредителей нематод, в частности, с популяцией ранящих нематод, таких как виды рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*. Настоящим изобретением предоставляются способы борьбы с клубеньковой нематодой (виды рода *Meloidogyne*, которые являются вредителями нематодами сои, включая, помимо прочего, *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla* или *Meloidogyne javanica* или любые их комбинации), почковидной нематодой (*Rotylenchulus reniformis*) и копьевидной нематодой (виды рода *Hoplolaimus*, такие как *H. columbus*, *H. galeatus* и *H. magnistylus*). Эти способы включают контактирование вредителя нематоды с пестицидно-эффективным количеством полипептида, содержащего нематоцидный токсин, в частности, нематоцидный токсин, обладающий активностью в отношении видов нематоды рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*, клубеньковой нематоды, почковидной нематоды или копьевидной нематоды. В различных вариантах осуществления изобретения нематоцидный токсин содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2 или ее пестицидно-эффективные варианты или фрагменты. В некоторых вариантах осуществления способ защиты растения или клеток растения от популяции вредителей нематод, в частности, от нематод видов рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*, клубеньковой нематоды, почковидной нематоды или клубеньковой нематоды, включает экспрессию в растении или в клетке растения нуклеиновой кислоты, кодирующей SEQ ID NO: 1 или 2, или ее варианта или фрагмента, при этом такая нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, способным вызывать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке растения.

Кроме того, в объем настоящего изобретения включены способы увеличения урожая в растении, включающие выращивание на поле растения или его семени, в геном которого стабильно встроен ДНК-конструкт, содержащий нуклеотидную последовательность, функционально связанную с промотором, способным вызывать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке растения, при этом нуклеиновая кислота кодирует SEQ ID NO: 1 или 2, или ее пестицидно-эффективный вариант или фрагмент.

Композиции и способы согласно изобретению могут использоваться для получения организмов с повышенной устойчивостью или стойкостью к нематодам, например, к видам нематод рода *Pratylenchus*, к клубеньковой нематоде, к почковидной нематоде или к копьевидной нематоде.

Такие организмы и композиции, содержащие такие организмы, являются востребованными для сельскохозяйственных целей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1. Тепличный анализ к *Pratylenchus* в США

Анализ устойчивости к *Pratylenchus brachyurus* элитных растений сои, содержащих EE-GM4, в теплице в США производили сравнение растений сои с экспрессией SEQ ID NO: 2 (EE-GM4) с другими элитными линиями сои: одной линией группы спелости (MG) 3, чувствительной к соевой цистообразующей нематодой (SCN), (THORNE), одной линией MG3, чувствительной к SCN, одной линией MG 6.2, чувствительной к SCN, и одной линией MG9, чувствительной к SCN (значение Susc WT показывает среднее для этих 3 линий), одной линией MG3, устойчивой к SCN (с аллелем устойчивости rhg1 из PI88788, SCN Res (PI88788)), и одной линией MG 6.2, устойчивой к SCN с аллелем rhg1 и Rhg4 от сорта Peking (SCN Res (Peking)). На графике приведены средние количества *Pratylenchus* в корнях через 30 дней после заражения (5 растений на одну запись) с указанием вариаций, которые наблюдались в разных сортах (в соответствии со стандартной практикой в парниковых анализах). Результаты показывают, что в линиях EE-GM4 наблюдалось ~ 85% снижения зараженности *Pratylenchus*. Для линий сои с нативной устойчивостью к SCN (от сортов Peking или PI88788) снижения зараженности *Pratylenchus brachyurus* не наблюдалось.

Фигура 2. Тепличный анализ устойчивости к *Pratylenchus* в Бразилии

Для растений сои, содержащих EE-GM4 (EE-GM4), зараженность корней сои *Pratylenchus brachyurus* существенно снижена. *Pratylenchus brachyurus* были получены с местных полей в Бразилии. В ходе тепличного анализа производили оценку на устойчивость к *Pratylenchus* растений EE-GM4 (в двух различных элитных линиях из США (обе группы принадлежали группе спелости 6.2, одна группа являлась чувствительной к SCN, а другая – с устойчивостью к SCN от Peking (EE-GM4)) и пяти бразильских линий сои с ограниченной устойчивостью к *Pratylenchus* (далее – «бразильские линии»), одной бразильской линии, обозначенной как линия с низким Rf (репродуктивным фактором) в отношении *Pratylenchus* (BRS 7380 (низкий Rf)), одной элитной линии из США (группа спелости 6.2) с чувствительностью к SCN (SCN Susc) и одной элитной линии из США MG 6.2 с устойчивостью к SCN от Peking (SCN Res (Peking)). На графике приведены средние количества по этим записям с указанием вариаций, которые наблюдались в разных сортах (в соответствии со стандартной практикой в парниковых анализах). Для одной бразильской линии сои (BRS 7380) наблюдалось снижение зараженности *Pratylenchus* на ~ 89%. Для линий EE-GM4 наблюдалось снижение зараженности *Pratylenchus* на ~79%. Для линий сои, имеющих нативную устойчивость к SCN от сорта Peking, снижение зараженности *Pratylenchus brachyurus* не наблюдалось.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам регулирования устойчивости к нематодам в организмах, в частности в растениях или клетках растений. Термин «устойчивость» означает, что нематода погибает при попадании внутрь нее полипептида согласно изобретению, при любом

другом контакте с полипептидами согласно изобретению при перемещении нематоды, питании, размножении или в ходе другой деятельности нематоды. Борьба в растении или в семени растения с популяцией нематод, паразитирующих на растениях, позволит повысить эффективность процессов нодуляции, прорастания, развития корней, всхожести и повысить здоровье растений, включая устойчивость к болезням или защиту от заболеваний, в том числе от бактериальных или грибковых заболеваний, что является важным преимуществом способов, описанных в настоящем изобретении. Таким образом, способы, описанные в настоящем изобретении, могут использоваться для борьбы с популяциями нематод, в частности, популяциями видов нематоды рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*, клубеньковой нематоды, почковидной нематоды или копьевидной нематоды, что обеспечит улучшение общего здоровья растений, повышение эффективности процессов питания и/или повышение агрономической полезности растения и/или семени. Агрономическим преимуществом настоящего изобретения может являться любое преимущество, связанное с борьбой с популяцией нематод, такое как, например, уменьшение общего количества нематод/площади, зараженной нематодами, уменьшение яиц нематод/площади, зараженной яйцами нематод, или уменьшение повреждения растения. Вторичные преимущества борьбы с популяциями нематод включают, помимо прочего, улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков), улучшенную урожайность, более быстрое прорастание, улучшенное управление стрессом у растений, включая повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса, большую механическую стойкость, улучшенную устойчивость к засухе, повышенную стойкость к грибковым инфекциям и улучшенное здоровье растений. Кроме того, настоящим изобретением могут также обеспечиваться комбинации любых из этих преимуществ.

Способы по настоящему изобретению включают трансформацию организмов или использование организмов, содержащих гетерологичную нуклеотидную последовательность, кодирующую нематоцидный белок согласно изобретению. Описанные в настоящем документе способы могут использоваться для борьбы с популяциями вредителей нематод или для их уничтожения и для получения композиций с нематоцидной активностью в отношении вредителей нематод.

Термины «пестицидный токсин» или «пестицидный белок» или «нематоцидная активность» или «нематоцидный токсин» означают токсин, который обладает активностью в отношении одного или нескольких вредителей нематод, в том числе, помимо прочего, в отношении видов рода *Pratylenchus*, включая *Pratylenchus alleni*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus coffeae*, *Pratylenchus crenatus*, *Pratylenchus dulscus*, *Pratylenchus fallax*, *Pratylenchus flakkensis*, *Pratylenchus goodeyi*, *Pratylenchus hexincisus*, *Pratylenchus loosi*, *Pratylenchus minutus*, *Pratylenchus mulchandi*, *Pratylenchus musicola*, *Pratylenchus neglectus*, *Pratylenchus penetrans*, *Pratylenchus pratensis*, *Pratylenchus reniformia*, *Pratylenchus scribneri*, *Pratylenchus thornei*, *Pratylenchus vulnus* и *Pratylenchus zaeae*. Нематоцидные белки включают аминокислотные последовательности, полученные из полноразмерных нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, и аминокислотные последовательности, которые короче последовательностей полной длины из-за использования альтернативного нижележащего стартового сайта или из-за

процессинга, в результате которого получен белок меньшей длины, обладающий нематоцидной активностью. Процессинг может происходить в организме, в котором белок экспрессируется, или во вредном организме после попадания белка внутрь.

В частных вариантах осуществления изобретения нематоцидный белок содержит белок Cry14. В различных вариантах осуществления белок Cry14 представляет собой Cry14Aa1 (номер доступа GENBANK AAA21516) или Cry14Ab1 (номер доступа GENBANK KC156652). В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cry14Aa1 включает аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, а также ее варианты и фрагменты. В других вариантах осуществления изобретения белок Cry14Ab1 включает аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, а также ее варианты и фрагменты. Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих SEQ ID NO: 1, представлены SEQ ID NO: 3 и 5. Примеры нуклеотидных последовательностей, кодирующих SEQ ID NO: 2, представлены SEQ ID NO: 4 и 6.

Таким образом, настоящим изобретением предоставляются способы уничтожения вредителей нематод или борьбы с популяцией вредителей нематод, например, с видами рода *Pratylenchus*, например, *Pratylenchus brachyurus*, клубеньковой нематодой, почковидной нематодой или копьевидной нематодой, которые включают контактирование вредителя нематоды с композицией, содержащей нематоцидный токсин согласно изобретению, или обработку вредителей нематод такой композицией. В частных вариантах осуществления изобретения нематоцидный белок содержит белок Cry14, представленный SEQ ID NO: 1 или 2, а также его варианты и фрагменты.

Изолированные молекулы нуклеиновой кислоты и их варианты и фрагменты

Один аспект изобретения относится к изолированным, рекомбинантным или химерным молекулам нуклеиновых кислот, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие нематоцидные белки и полипептиды или их биологически активные части, а также к молекулам нуклеиновых кислот, которые могут использоваться в качестве гибридационных зондов для идентификации молекул нуклеиновых кислот, кодирующих белки с областями гомологии последовательностей. Кроме того, в объем настоящего изобретения входят нуклеотидные последовательности, способные гибридизировать с нуклеотидными последовательностями согласно изобретению в жестких условиях гибридизации в соответствии с определением в настоящем документе. При использовании в настоящем документе термин «молекула нуклеиновой кислоты» также включает молекулы ДНК (например, рекомбинантную ДНК, кДНК или геномную ДНК) и молекулы РНК (например, мРНК) и аналоги ДНК или РНК, созданные с использованием аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, предпочтительно она является двухцепочечной. Термин «рекомбинантный» включает полинуклеотиды или полипептиды, в отношении которых производили изменения относительно нативного полинуклеотида или полипептида, в результате чего полинуклеотид или полипептид имеет отличия (например, по химическому составу или структуре) от природного полинуклеотида или полипептида. При использовании по тексту настоящего документа термины «изолированная нуклеиновая кислота (последовательность/молекула)» или «изолированная ДНК (последовательность/молекула)» относятся к нуклеиновой кислоте или ДНК

(последовательности/молекуле), которые более не находятся в природной среде, из которой они были изолированы, например, к последовательности нуклеиновой кислоты в другом бактериальном хозяине или в геноме растения, или к нуклеиновой кислоте или ДНК (последовательности/молекуле), у которых произошло слияние с ДНК или нуклеиновой кислотой (последовательностью/молекулой) другого происхождения, например, когда они содержатся в химерном гене под контролем (гетерологичного) промотора, экспрессируемого в растениях. Любой нуклеиновой кислотой или ДНК по настоящему изобретению, включая любой праймер, также может быть неприродной, такой как нуклеиновая кислота или ДНК с последовательностью, идентичной природной последовательности, но имеющей метку (отсутствующую в природном аналоге), или с последовательностью, имеющей, по меньшей мере, одно добавление или замену нуклеотида или, по меньшей мере, одно внутреннее удаление нуклеотида по сравнению с природным нуклеотидом, или с последовательностью, имеющей идентичность последовательности менее 100% (с неидентичной последовательностью) по сравнению с природной нуклеиновой кислотой или ДНК или ее фрагментом, или нуклеиновая кислота или ДНК с последовательностью, состоящей из нуклеотидных последовательностей различного происхождения, которые не встречаются вместе в природе (химерная или гибридная ДНК), или искусственная синтетическая нуклеиновая кислота или ДНК с последовательностью, отличной от природной нуклеиновой кислоты или ДНК или ее фрагмента.

При использовании в настоящем документе термин «изолированная, рекомбинантная или химерная нуклеиновая кислота (или ДНК)» означает нуклеиновую кислоту (или ДНК), которая более не находится в своем природном окружении, например, находится *in vitro* или в рекомбинантной клетке-хозяине бактерии или растения. В некоторых вариантах осуществления изобретения изолированная, рекомбинантная или химерная нуклеиновая кислота свободна от последовательностей (предпочтительно последовательностей, кодирующих белок), которые обычно примыкают к данной нуклеиновой кислоте (то есть, последовательностей, расположенных на концах 5' и 3' нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого данная нуклеиновая кислота была получена. Для целей настоящего изобретения термин «изолированный», когда его используют для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, исключает изолированные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления изобретения изолированный дельта-эндотоксин, кодирующий молекулу нуклеиновой кислоты, может содержать менее чем примерно 5 т. п. н., 4 т. п. н., 3 т. п. н., 2 т. п. н., 1 т. п. н., 0,5 т. п. н. или 0,1 т. п. н. нуклеотидных последовательностей, которые обычно примыкают к молекуле нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой данная нуклеиновая кислота была получена. В различных вариантах осуществления изобретения, термин «белок дельта-эндотоксин, практически не содержащий клеточного материала» включает препараты из белка менее чем приблизительно с 30%, 20%, 10% или 5% (сухого веса) белка дельта-эндотоксина (также именуемого в настоящем документе «загрязняющий белок»). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота согласно изобретению содержит одну или более нуклеотидных замен относительно SEQ ID NO: 3-6 или ее варианта или фрагмента.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие белки по настоящему изобретению, включают последовательность, представленную SEQ ID NO: 3-6, и/или ее варианты, фрагменты и комплементарные последовательности. Термин «комплементарная последовательность» означает нуклеотидную последовательность, которая является в значительной степени комплементарной по отношению к определенной нуклеотидной последовательности таким образом, что она может гибридизировать с такой определенной нуклеотидной последовательностью с образованием стабильного дуплекса. Соответствующие аминокислотные последовательности для нематоцидных белков, кодируемых этими нуклеотидными последовательностями, представлены SEQ ID NO: 1 и 2.

Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами этих нуклеотидных последовательностей, кодирующих нуклеотидные белки, также входят в объем настоящего изобретения. Термин «фрагмент» означает часть нуклеотидной последовательности, кодирующей нематоцидный белок. Фрагмент нуклеотидной последовательности может кодировать биологически активную часть нематоцидного белка, или он может представлять собой фрагмент, который можно использовать в качестве зонда для гибридизации или праймера для ПЦР с использованием способов, описанных ниже. Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами нуклеотидной последовательности, кодирующей нематоцидный белок, содержат, по меньшей мере, приблизительно 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1350, 1400 смежных нуклеотидов, вплоть до всего количества нуклеотидов, присутствующих в нуклеотидной последовательности полной длины, кодирующей нематоцидный белок, описанный в настоящем документе, в зависимости от предполагаемого применения. Термин «смежные нуклеотиды» означает нуклеотидные остатки, которые расположены непосредственно рядом друг с другом. Фрагменты нуклеотидных последовательностей по настоящему изобретению кодируют белковые фрагменты, которые сохраняют биологическую активность нематоцидного белка и, следовательно, сохраняют пестицидную активность против вредителя нематоды. Таким образом, настоящее изобретение также включает биологически активные фрагменты полипептидов, описанных в настоящем документе. Термин «сохранение активности» означает, что такой фрагмент имеет, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 70%, 80%, 90%, 95% или более пестицидной активности нематоцидного белка. Специалистам известны способы измерения нематоцидной активности, они также описаны по тексту настоящего документа.

Фрагмент нуклеотидной последовательности, кодирующей нематоцидный белок, который кодирует биологически активную часть белка согласно изобретению, будет кодировать, по меньшей мере, приблизительно 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 или 1150 смежных аминокислот, вплоть до всего количества аминокислот, присутствующих в нематоцидном белке полной длины по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения такой фрагмент представляет собой фрагмент, полученный в результате протеолитического расщепления. Например, фрагмент, полученный в результате протеолитического расщепления, может иметь усечение на N- или C-конце, составляющее, по меньшей мере, приблизительно 30 аминокислот, по меньшей мере, приблизительно 40 аминокислот, по меньшей мере, приблизительно 50, по меньшей мере,

приблизительно 100 аминокислот, приблизительно 120, приблизительно 130, приблизительно 140, приблизительно 150 или приблизительно 160 аминокислот относительно SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления фрагменты, которые входят в объем настоящего изобретения, могут быть получены в результате удаления домена кристаллизации на С-конце, например, путем протеолиза или путем вставки стоп-кодона в кодирующую последовательность. В других вариантах осуществления фрагменты, которые входят в объем настоящего изобретения, содержат усечение на N-конце, при этом усечение на N-конце может содержать метиониновый остаток у усеченного N-конца.

В различных вариантах осуществления нуклеиновая кислота согласно изобретению содержит вырожденную нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 3-6, при этом указанная вырожденная нуклеотидная последовательность кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и SEQ ID NO: 1 или 2.

Предпочтительные нематоцидные белки по настоящему изобретению кодируются нуклеотидной последовательностью, достаточно идентичной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 3-6, или нематоцидные белки являются достаточно идентичными аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или 2. Термин «достаточно идентичный» означает аминокислотную или нуклеотидную последовательность, которая имеет, по меньшей мере, приблизительно 60% или 65% идентичности последовательности, приблизительно 70% или 75% идентичности последовательности, приблизительно 80% или 85% идентичности последовательности, приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности последовательности по сравнению с эталонной последовательностью при выравнивании с использованием одной из программ выравнивания, описанных в настоящем документе с использованием стандартных параметров. Специалисту будет понятно, что эти значения могут соответствующим образом корректироваться для определения соответствующей идентичности белков, кодируемых двумя нуклеотидными последовательностями, с учетом вырожденности кодонов, сходства аминокислот, расположения рамки считывания и других подобных факторов.

Для определения процента идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот, осуществляется выравнивание последовательностей для их оптимального сравнения. Процент идентичности между двумя последовательностями находится в функциональной зависимости от количества идентичных положений в этих последовательностях (то есть $\% \text{ идентичности} = \frac{\text{количество идентичных положений}}{\text{общее количество позиций}} \times 100$). В варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. В другом варианте осуществления процент идентичности рассчитывается по всей длине эталонной последовательности (то есть последовательности, представленной в настоящем документе как любая последовательность из SEQ ID NO: 1-6). Процент идентичности между двумя последовательностями может быть определен с использованием методик, аналогичных описанным ниже, с учетом или без учета гэпов. При расчете процента идентичности обычно учитываются точные совпадения. Гэп, то есть положение в выравнивании,

где в одной последовательности какой-либо остаток присутствует, а в другой отсутствует, рассматривается как положение с неидентичными остатками.

Определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть выполнено с использованием математического алгоритма. Неограничивающий пример математического алгоритма для сравнения двух последовательностей – это алгоритм *Карлина-Альтшуля* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 87:2264, модифицированные как в Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы BLASTN и BLASTX Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Поиск в базе данных нуклеотидов BLAST может осуществляться с помощью программы BLASTN, счет выравнивания = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных пестицидоподобным молекулам нуклеиновой кислоты согласно изобретению. Поиск в базе данных белков BLAST может осуществляться с помощью программы BLASTX, счет выравнивания = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных нематоцидным молекулам белка согласно изобретению. Для получения выравниваний с учетом гэпов для сравнения можно использовать Gapped BLAST (в BLAST 2.0) в соответствии с описанием в Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. В качестве альтернативы, для выполнения итеративного поиска и обнаружения отдаленных отношений между молекулами, может использоваться PSI-Blast. Смотрите Altschul *et al.* (1997) *выше*. При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, могут использоваться параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN). Выравнивание также может быть выполнено вручную путем осмотра.

Еще одним неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм ClustalW (Higgins *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). С помощью ClustalW осуществляется сравнение последовательностей и выравнивание всей аминокислотной последовательности или последовательности аминокислот, или ДНК и, таким образом, с его помощью могут быть получены данные о консервативности по всей аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW используют в нескольких коммерчески доступных программных пакетах для анализа ДНК/аминокислот, таких как модуль ALIGNX из набора программ Vector NTI (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния). После выравнивания аминокислотных последовательностей с помощью ClustalW можно оценить процент идентичности аминокислот. В качестве неограничивающего примера программного обеспечения, которое может использоваться для анализа выравниваний ClustalW, можно привести GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) позволяет проводить оценку сходства аминокислот (или ДНК) и идентичности между несколькими белками. Еще одним неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета GCG Wisconsin Genetics, версия 10 (доступный из Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, США). При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов замен остатков PAM120 со штрафом за продление гэпа 12 и штрафом за открытие гэпа 4.

Если не указано иное, для определения идентичности или сходства последовательностей применяется GAP Version 10, где используют алгоритм Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, со следующими параметрами: для % идентичности и % сходства для нуклеотидной последовательности штраф за открытие гэпа составляет 50, штраф за продолжение гэпа составляет 3, матрица замен – nwsgapdna.cmp; для % идентичности и % сходства для аминокислотной последовательности штраф за открытие гэпа составляет 8, штраф за продолжение гэпа составляет 3, матрица замен – BLOSUM62. Также могут быть использоваться другие аналогичные программы. Под «аналогичной программой» подразумевается любая программа для сравнения последовательностей, с помощью которой можно осуществить выравнивание любых двух последовательностей с совпадениями нуклеотидных остатков и определить процент идентичности последовательностей, аналогично соответствующему выравниванию, полученному с помощью программы GAP, версия 10. Настоящее изобретение также включает варианты молекул нуклеиновой кислоты. «Варианты» нуклеотидных последовательностей, кодирующих нематоцидный белок, включают в себя последовательности, кодирующие нематоцидные белки, описанные в настоящем документе, однако которые консервативно отличаются в результате дегенерации генетического кода, а также последовательности, которые являются достаточно идентичными в соответствии с описанием выше. Природные аллельные варианты могут быть идентифицированы при помощи известных методов молекулярной биологии таких как, например, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метод гибридизации в соответствии с описанием ниже. Вариантные нуклеотидные последовательности также включают нуклеотидные последовательности, полученные синтетическим методом, например, последовательности, полученные путем сайт-направленного мутагенеза, но которые все равно кодируют нематоцидные белки, описанные в настоящем изобретении в соответствии с описанием ниже. Вариантные белки, которые входят в объем настоящего изобретения, являются биологически активными, т.е. они сохраняют целевую биологическую активность нативного белка, т.е. пестицидную активность в отношении вредителя нематоды. Термин «сохранение активности» означает, что вариант имеет, по меньшей мере, приблизительно 30%, по меньшей мере, приблизительно 50%, по меньшей мере, приблизительно 70% или, по меньшей мере, приблизительно 80% пестицидной активности нативного белка. Способы измерения пестицидной активности против вредителей нематод известны специалистам и описаны по тексту настоящего документа.

Кроме того, специалист сможет также оценить то, что в нуклеотидные последовательности согласно изобретению могут быть введены изменения путем мутации, в результате чего аминокислотная последовательность кодируемых белков будет изменена без изменения биологической активности белков. Таким образом, варианты изолированные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть созданы путем одной или нескольких нуклеотидных замен, добавлений или удалений в соответствующей нуклеотидной последовательности, таким образом, в кодированном белке будет одна или более аминокислотных замен, добавлений или удалений. Мутации могут быть введены с использованием стандартных методов, таких как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие варианты нуклеотидные последовательности также входят в объем настоящего изобретения.

Например, консервативные аминокислотные замены могут быть в одном или нескольких определенных заменимых аминокислотных остатках. «Заменимый» аминокислотный остаток – это остаток в последовательности нематоцидного белка дикого типа, который может быть изменен без изменения биологической активности, в то время как «незаменимый» аминокислотный остаток – это остаток необходимый для биологической активности. Под «консервативной аминокислотной заменой» понимается замена, в которой аминокислотный радикал заменяется на аминокислотный радикал, имеющий схожую боковую цепочку. Семейства аминокислотных радикалов, имеющих схожие боковые цепочки, были описаны в литературе по данной теме. Данные семейства включают аминокислоты с боковыми цепочками оснований (например, лизин, аргинин, гистидин), боковыми цепочками кислот (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепочки (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистин), неполярные боковые цепочки (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепочки (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепочки (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Дельта-эндотоксины обычно имеют пять доменов с консервативными последовательностями и три консервативных структурных домена (смотрите, например, de Maagd *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). Первый консервативный структурный домен состоит из семи альфа-спиралей и участвует во вставке мембраны и порообразовании. Домен II состоит из трех бета-листов, расположенных в конфигурации «греческий ключ», а домен III состоит из двух антипараллельных бета-листов в конфигурации «рулет» (de Maagd *et al.*, 2001, выше). Домены II и III участвуют в распознавании и связывании рецепторов и поэтому считаются детерминантами специфичности токсина.

Аминокислотные замены могут быть сделаны в неконсервативных областях, которые сохраняют функцию. В целом, такие замены не осуществляются для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве, если такие остатки являются незаменимыми для активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть незаменимыми для белковой активности, включают, например, остатки, которые идентичны для всех белков, содержащихся в выравнивании токсинов, которые являются подобными или родственными последовательностям согласно изобретению (например, остатки, которые идентичны при выравнивании гомологичных белков). Примеры остатков, которые могут обеспечивать консервативные аминокислотные замены, и которые могут сохранять активность включают, например, остатки, которые имеют лишь консервативные замены между всеми белками, содержащимися в выравнивании токсинов, которые являются подобными или родственными последовательностям согласно изобретению (например, остатки, которые имеют только консервативные замены между всеми белками, которые содержатся в выравнивании гомологичных белков). Тем не менее, специалисту будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения в консервативных остатках.

В качестве альтернативы, варианты нуклеотидные последовательности могут быть получены путем введения мутаций случайным образом вдоль всей кодирующей последовательности или ее части, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и может осуществляться скрининг полученных мутантов в отношении способности придавать пестицидную активность в отношении вредителей нематод для идентификации мутантов, сохраняющих активность. После мутагенеза кодированный белок может быть экспрессирован рекомбинантным образом, а активность белка может определяться с использованием стандартных методов анализа.

С использованием таких методов, как ПЦР, гибридизация и других подобных методов, могут быть идентифицированы соответствующие пестицидные последовательности, которые имеют существенную идентичность последовательности с последовательностями согласно изобретению (например, по меньшей мере, приблизительно 70%, по меньшей мере, приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более идентичности последовательности относительно всей длины эталонной последовательности), и которые имеют пестицидную активность против вредителя нематоды или обеспечивают такую активность. Смотрите, например, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) и Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

В ходе гибридизации вся пестицидная нуклеотидная последовательность или ее часть может быть использована для скрининга кДНК или геномных библиотек. Способы конструирования таких кДНК и геномных библиотек известны специалистам и раскрыты в работе Sambrook and Russell, 2001, см. выше. Так называемые гибридизационные зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды и могут быть помечены детектируемой группой, например, ^{32}P , или любым другим обнаруживаемым маркером, таким как другие радиоизотопы, флуоресцентное соединение, фермент, или ферментативный кофактор. Зонды для гибридизации могут быть получены путем мечения синтетических олигонуклеотидов на основе известной нуклеотидной последовательности, кодирующей нематоцидный белок, описанный в настоящем документе. Дополнительно могут использоваться вырожденные праймеры, сконструированные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в нуклеотидной последовательности или кодированной аминокислотной последовательности. Зонд, как правило, содержит область нуклеотидной последовательности, которая гибридизует в строгих условиях, по меньшей мере, приблизительно с 12, по меньшей мере, приблизительно с 25, по меньшей мере, приблизительно с 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 смежными нуклеотидами нуклеотидной последовательности, кодирующей нематоцидный белок согласно изобретению или его фрагмент или вариант. Способы конструирования зондов для гибридизации, как правило, известны специалистам и раскрыты в работе Sambrook and Russell, 2001, см. выше, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Например, полная нематоцидная последовательность, описанная в настоящем документе, или одна или более ее частей, может использоваться в качестве зонда, способного специфически гибридизовать с соответствующими нематоцидными белкоподобными последовательностями и РНК-мессенджерами. Для обеспечения специфической гибридизации в различных условиях такие

зонды включают в себя последовательности, которые являются уникальными и предпочтительно имеют длину, по меньшей мере, приблизительно 10 нуклеотидов или, по меньшей мере, приблизительно 20 нуклеотидов. Такие зонды могут использоваться для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма или образца путем ПЦР. Этот метод может быть использован для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из соответствующего организма или в качестве диагностического анализа для определения наличия кодирующих последовательностей в организме. Методы гибридизации включают гибридизационный скрининг библиотек платированных ДНК (бляшек или колоний, см., например, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк).

Таким образом, в объем настоящего изобретения входят зонды для гибридизации, а также нуклеотидные последовательности, способные гибридизовать со всей нуклеотидной последовательности или ее частью согласно изобретению (например, по меньшей мере, приблизительно 300 нуклеотидов, по меньшей мере, приблизительно 400, по меньшей мере, приблизительно 400, 450). 500, 1000, 1200, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, вплоть до нуклеотидной последовательности полной длины, описанной в настоящем документе). Гибридизация таких последовательностей может осуществляться в жестких условиях. Под «жесткими условиями» или «жесткими условиями гибридизации» подразумеваются условия, при которых зонд будет гибридизовать с целевой последовательностью в заметно большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере, в 2 раза относительно фонового уровня). Жесткость условий зависит от определенной последовательности и в различных случаях будет различной. Контролируя жесткость условий гибридизации и/или отмывки, можно идентифицировать целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гомологичное зондирование). В качестве альтернативы, условия жесткости могут корректироваться таким образом, чтобы допускалось некоторое несоответствие в последовательностях для детекции более низких степеней сходства (гетерологичное зондирование). Как правило, длина зонда составляет менее 1000 нуклеотидов, предпочтительно менее 500 нуклеотидов.

Как правило, жесткие условия – это такие условия, в которых концентрация соли составляет менее чем приблизительно 1,5 М иона Na, как правило, концентрация составляет приблизительно 0,01–1,0 М иона Na (или других солей) при pH 7,0–8,3, а температура составляет, по меньшей мере, приблизительно 30 °C для коротких зондов (например, длиной 10–50 нуклеотидов) и, по меньшей мере, приблизительно 60 °C для длинных зондов (например, длиной более 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть обеспечены путем добавления дестабилизирующих агентов, таких как формамид. Примерные условия низкой жесткости включают гибридизацию с использованием буферного раствора, содержащего 30 - 35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфата натрия) при 37°C, и промывку в 1X–2X SSC (20X SSC = 3,0 М NaCl/0,3 М тринатриевого цитрата) при 50 - 55°C. Примерные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40 - 45% формамида, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывку в 0,5X – 1X SSC при 55 - 60°C. Примерные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамида,

1 M NaCl, 1% SDS при 37°C, и промывку в 0,1X SSC при 60 - 65°C. При необходимости, промывочные буферы могут содержать приблизительно 0,1% - 1% SDS. Продолжительность гибридизации обычно составляет менее приблизительно 24 ч., как правило, приблизительно 4 - 12 ч.

Специфичность, как правило, находится в функциональной зависимости от промывок после гибридизации, критическими факторами являются ионная сила и температура конечного промывочного раствора. Для гибридов ДНК-ДНК приблизительный расчет T_m может осуществляться из уравнения Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$; где M – молярность одновалентных катионов, %GC – процент нуклеотидов гуанозина и цитозина в ДНК, % form – процент формамида в растворе гибридизации, а L – длина гибрида в парах оснований. T_m – это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизирует с подобранным зондом. T_m уменьшается приблизительно на 1°C за каждый 1% несоответствия; таким образом, T_m , условия гибридизации и/или промывки могут регулироваться для гибридизации с последовательностями с необходимой идентичности. Например, если целевыми являются последовательности с идентичностью $\geq 90\%$, T_m может быть уменьшена на 10°C. Как правило, жесткие условия означают следующее: температура составляет на 5°C ниже температуры плавления (T_m) для определенной последовательности при определенной ионной силе и pH. Тем не менее, в условиях особенно высокой жесткости может использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже температуры плавления (T_m); в условиях умеренной жесткости может использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже температуры плавления (T_m); в условиях низкой жесткости может использоваться гибридизация и/или промывка при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже температуры плавления (T_m). Специалистам понятно, что, по существу, описаны вариации в жесткости гибридизации и/или растворов промывки с использованием приведенного уравнения, сочетания условий для гибридизации и промывки и соответствующей T_m . Если желаемая степень несоответствия приводит к тому, что T_m составляет менее 45 °C (водный раствор) или 32 °C (раствор формамида), предпочтительно увеличить концентрацию SSC, чтобы можно было использовать более высокую температуру. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в работе Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Часть I, глава 2 (Elsevier, Нью-Йорк); и Ausubel *et al.*, изд. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, глава 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, Нью-Йорк). Смотрите Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ое изд., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк).

Изолированные белки и их варианты и фрагменты

Нематотидные белки также входят в объем настоящего изобретения. Термин «нематотидный белок» означает белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2. Также настоящим изобретением предоставляются их фрагменты, биологически активные части и варианты, они могут применяться в способах по настоящему изобретению. Термин «изолированный белок» или «рекомбинантный белок» означает белок, который более не находится в своем природном окружении, например, находится *in vitro* или в рекомбинантной

клетке-хозяине бактерии или растения. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный белок представляет собой вариант SEQ ID NO: 1 или 2, который включает, по меньшей мере, одну аминокислотную замену, удаление или вставку относительно SEQ ID NO: 1 или 2.

«Фрагменты» или «биологически активные части» включают фрагменты полипептидов, содержащие аминокислотные последовательности, достаточно идентичные аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или 2, и которые демонстрируют пестицидную активность в отношении вредителя нематоды. Биологической активной частью нематоцидного белка может быть полипептид длиной, например, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 аминокислот. Такие биологически активные части могут быть получены методами рекомбинации, и может осуществляться оценка их пестицидной активности в отношении вредителя нематоды. Способы измерения пестицидной активности против вредителей нематод известны специалистам (см., например, публикацию заявки на патент США № US 20160066584) и описаны по тексту настоящего документа. В соответствии с настоящим изобретением фрагмент содержит, по меньшей мере, 8 смежных аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2. Тем не менее, в объем настоящего изобретения входят и другие фрагменты, например, любой фрагмент в белке с длиной, превышающей приблизительно 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350 или более аминокислот.

Термин «варианты» означает белки или полипептиды с аминокислотной последовательностью, имеющей, по меньшей мере, приблизительно 60%, 65%, приблизительно 70%, 75%, приблизительно 80%, 85%, приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или более идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1 или 2. Варианты также включают полипептиды, кодируемые молекулой нуклеиновой кислоты, которая гибридизует с молекулой нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3-6 или с ее комплементарной последовательностью в жестких условиях. Варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Вариантные белки, которые входят в объем настоящего изобретения, являются биологически активными, т.е. они сохраняют целевую биологическую активность нативного белка, т.е. сохраняют пестицидную активность в отношении вредителя нематоды. В некоторых вариантах осуществления изобретения варианты имеют улучшенную активность относительно нативного белка. Способы измерения пестицидной активности против вредителей нематод известны специалистам (см., например, публикацию заявки на патент США № US 20160066584) и описаны по тексту настоящего документа.

Зачастую бактериальные гены имеют несколько стартовых кодонов метионина возле начала открытой рамки считывания. Зачастую инициация трансляции в одном или нескольких из этих стартовых кодонов приводит к образованию функционального белка. Эти стартовые кодоны могут включать кодоны ATG. Тем не менее, такие бактерии, как *Bacillus sp.* также распознают кодон GTG в качестве стартового кодона, а белки, которые иницируют трансляцию в кодонах GTG, содержат метионин в первой аминокислоте. В редких случаях трансляция в бактериальных системах может иницироваться в кодоне TTG, хотя в этом событии TTG кодирует метионин.

Кроме того, то, какой из этих кодонов естественным образом используется в бактерии, заранее определяют не часто. Таким образом, понятно, что использование одного из альтернативных кодонов метионина может также привести к образованию нематоцидных белков. Эти нематоцидные белки входят в объем настоящего изобретения и могут использоваться в способах по настоящему изобретению. Понятно, что при экспрессии в растениях для правильной трансляции необходимо будет изменить альтернативный стартовый кодон на ATG.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения нематоцидные белки включают аминокислотные последовательности, полученные из полноразмерных нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, и аминокислотные последовательности, которые короче последовательностей полной длины из-за использования альтернативного нижележащего стартового сайта.

В объем настоящего изобретения также входят антитела к полипептидам согласно изобретению или к их вариантам или фрагментам. Способы получения антител известны специалистам (например, см. Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; патент США № 4,196,265).

Таким образом, один аспект изобретения относится к антителам, одноцепочечным молекулам связывания антигена, или к другим белкам, которые специфически связывают одну или более молекул белка или пептидов по предлагаемому изобретению и их гомологи, слияния или фрагменты. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения антитело специфически связывается с белком, имеющим аминокислотную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1 или 2, или с его фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения, антитело специфически связывается с гибридным белком, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1 или 2, или ее фрагмент. В различных вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с белком согласно изобретению или с белком слияния, содержащим белок согласно изобретению, представляет собой неприродное антитело.

Антитела согласно изобретению могут использоваться для количественной или качественной детекции молекул белка или пептидов согласно изобретению или для детекции посттрансляционных модификаций белков. При использовании по тексту настоящего документа антитело или пептид «специфически связывает» молекулу белка или пептида по предлагаемому изобретению, если такое связывание конкурентно не ингибируется присутствием молекул других веществ.

Антитела согласно изобретению могут содержаться в наборе, который используется для детекции молекул белка или пептидов согласно изобретению. Изобретение также включает способ обнаружения молекулы белка или пептида согласно изобретению (в частности, белка, кодируемого аминокислотной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1 или 2, включая ее варианты или фрагменты, который способен специфически связываться с антителом согласно изобретению), который включает контактирование образца с антителом согласно изобретению и определение того, содержит ли этот образец молекулу белка или пептида согласно изобретению. Способы использования антител для обнаружения целевого белка или пептида известны специалистам.

Измененные или улучшенные варианты

Понятно, что последовательности ДНК нематоцидного белка могут быть изменены различными способами, и что в результате этих изменений могут быть получены последовательности ДНК, кодирующие белки с аминокислотными последовательностями, отличными от тех, которые кодируются нематоцидным белком по настоящему изобретению. Такой белок может быть изменен различными способами, включая аминокислотные замены, удаления, усечения и вставки одной или нескольких аминокислот SEQ ID NO: 1 или 2, количество таких аминокислотных замен, удалений или вставок может составлять приблизительно 2 или менее, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 20, приблизительно 25, приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60, приблизительно 65, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85, приблизительно 90, приблизительно 100, приблизительно 105, приблизительно 110, приблизительно 115, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 135, приблизительно 140, приблизительно 145, приблизительно 150, приблизительно 155 или более аминокислотных замен, удалений или вставок. Способы таких манипуляций хорошо известны специалистам. Например, варианты аминокислотных последовательностей нематоцидного белка могут быть получены путем мутаций в ДНК. Это также может обеспечиваться одной из нескольких форм мутагенеза и/или направленной эволюции. В соответствии с некоторыми аспектами изменения, кодируемые в аминокислотной последовательности, не будут существенно влиять на функцию белка. Такие варианты будут обладать целевой пестицидной активностью в отношении вредителей нематод. Тем не менее, очевидно, что при использовании таких методов в композициях по настоящему изобретению способность нематоцидного белка придавать пестицидную активность в отношении вредителя нематоды может быть улучшена. Например, можно экспрессировать нематоцидный белок в клетках-хозяевах, которые демонстрируют высокие уровни ошибок включения оснований во время репликации ДНК, такие как XL-1 Red (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния). После размножения в таких штаммах можно выделить ДНК (например, путем получения плазмидной ДНК или путем амплификации с использованием ПЦР и клонирования полученного фрагмента ПЦР в вектор), культивировать мутации нематоцидного белка в немутагенном штамме и идентифицировать мутантные гены, обладающие пестицидной активностью в отношении вредителя нематоды, например, путем анализа для тестирования пестицидной активности в отношении вредителя нематоды. Такие анализы могут включать контактирование растений с одним или несколькими вредителями и определение способности растения выживать и/или вызывать гибель вредителей. Смотрите, например, Публикацию заявки на патент США № US 20160066584).

В качестве альтернативы, в последовательности многих белков на amino- или карбокси-конце могут быть внесены изменения, не оказывающие существенного влияния на активность. Такие изменения могут включать вставки, удаления или изменения, введенные современными молекулярными методами, такими как ПЦР, включая ПЦР-амплификации, которые изменяют или расширяют кодирующую последовательность белка за счет включения аминокислотных

кодирующих последовательностей в олигонуклеотиды, используемые при амплификации ПЦР. В качестве альтернативы, добавленные белковые последовательности могут включать полные последовательности, кодирующие белок, например, последовательности, обычно используемые в данной области для получения белков слияния. Такие белки слияния зачастую используются для (1) увеличения экспрессии целевого белка, (2) для введения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа, чтобы обеспечить очистку белка, обнаружение белка или для других экспериментальных целей, известных специалистам, (3) нацеливания секрета или трансляции белка в субклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, при этом нацеливание в эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток зачастую приводит к гликозилированию белка.

Вариантные нуклеотидные и аминокислотные последовательности по настоящему изобретению также включают последовательности, полученные в результате мутагенных и рекомбиногенных процедур, таких как шаффлинг ДНК. Для такой процедуры можно использовать одну или более различных областей, кодирующих нематоцидный белок, для создания нового нематоцидного белка, обладающего целевыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов создаются из популяции полинуклеотидов связанных последовательностей, содержащих области последовательности, которые имеют существенную идентичность последовательности, и в отношении которых может осуществляться гомологичная рекомбинация *in vitro* или *in vivo*. Например, с использованием этого подхода мотивы последовательности, кодирующие целевой домен, могут быть перетасованы между пестицидным геном согласно изобретению и другими известными пестицидными генами для получения нового гена, кодирующего белок с улучшенными целевыми свойствами, например, с улучшенной инсектицидной активностью. Стратегии такого шаффлинга ДНК известны специалистам. Смотрите, например, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) *Nature Biotech.* 15:436-438; Moore *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 272:336-347; Zhang *et al.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 94:4504-4509; Cramer *et al.* (1998) *Nature* 391:288-291; и патенты США №№ 5,605,793 и 5,837,458.

Перестановка или шаффлинг доменов – еще один механизм получения измененных нематоцидных белков. Может осуществляться перестановка доменов между нематоцидными белками, в результате чего получают гибридные или химерные токсины с улучшенной пестицидной активностью в отношении вредителя нематоды или целевого круга вредителей. Способы получения рекомбинантных белков и тестирования их пестицидной активности в отношении вредителей нематод известны специалистам (смотрите, например, Naimov *et al.* (2001) *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5328-5330; de Maagd *et al.* (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543; Ge *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958; Schnepf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang *et al.* (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

В еще одном варианте осуществления варианты нуклеотидные и/или аминокислотные последовательности могут быть получены с использованием одной или более ПЦР сниженной точности, олигонуклеотид-направленного мутагенеза, сборочной ПЦР, мутагенеза путем ПЦР с

имитацией полового размножения, мутагенеза *in vivo*, кассетного мутагенеза, рекурсивного множественного мутагенеза, экспоненциального множественного мутагенеза, сайт-специфического мутагенеза, вторичной сборки генов, насыщающего мутагенеза участка гена, перестановочного мутагенеза, искусственной перестройка с лигированием (SLR), рекомбинации, рекомбинации рекурсивных последовательностей, мутагенеза фосфоротиоат-модифицированной ДНК, мутагенеза с использованием урацилсодержащей матрицы, мутагенеза с использованием гетеродуплекса, мутагенез по механизму репарации неспаренных оснований, мутагенез, связанный с недостаточностью функционирования системы репарации в хозяйском штамме, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез на основе системы рестрикции-селекции, мутагенез на основе системы рестрикции-очистки, синтез искусственного гена, множественный мутагенез, создание мультимера химерной молекулы нуклеиновой кислоты или с использованием других подобных способов.

Векторы

Пестицидная последовательность согласно изобретению может быть предоставлена в кассете экспрессии для экспрессии в целевой клетке-хозяине, например, в клетке растения или в бактерии. Термин «растительная кассета экспрессии» означает конструктор ДНК, который способен вызвать экспрессию белка из открытой рамки считывания в клетке растения. Как правило, они содержат промотор и кодирующую последовательность. Зачастую такие конструкторы могут также содержать 3' нетранслируемую область. Такие конструкторы могут содержать «сигнальную последовательность» или «лидерную последовательность», чтобы способствовать ко-трансляционному или посттрансляционному транспорту пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или в другую пластиду), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

Термин «сигнальная последовательность» означает последовательность, которая, как известно или предположительно, приводит к ко-трансляционному или посттрансляционному транспорту пептидов через клеточную мембрану. У эукариотических организмов это обычно связано с секрецией в аппарат Гольджи с некоторым гликозилированием, которое происходит вследствие этого. Инсектицидные токсины бактерий часто синтезируются в виде протоксинов, которые протолитически активируются в кишечнике целевого вредителя (Chang (1987) *Methods Enzymol.* 153:507-516). В некоторых вариантах осуществления изобретения сигнальная последовательность расположена в нативной последовательности, или она может быть получена из последовательности согласно изобретению. Термин «лидерная последовательность» означает последовательность, при трансляции которой получают аминокислотную последовательность, достаточную для запуска ко-трансляционного транспорта пептидной цепи в субклеточную органеллу. Таким образом, термин включает лидерные последовательности, нацеленные на транспорт и/или гликозилирование путем прохождения в эндоплазматический ретикулум, прохождения к вакуолям, пластыди, включая хлоропласты, митохондрии и другие подобные органеллы. Таким образом, настоящим изобретением также предоставляется полипептид, содержащий аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, которая функционально связана с гетерологичной лидерной или сигнальной последовательностью.

Термин «вектор для трансформации растений» означает молекулу ДНК, которая необходима для эффективной трансформации клетки растения. Такая молекула может состоять из одной или нескольких растительных кассет экспрессии и может быть организована несколько «векторных» молекул ДНК. Например, бинарные векторы представляют собой векторы трансформации растений, которые используют два несмежных вектора ДНК для кодирования всех необходимых цис-действующих и транс-действующих функций для трансформации клеток растений (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Термин «вектор» относится к конструктору нуклеиновой кислоты, предназначенному для переноса между различными клетками-хозяевами. Термин «вектор экспрессии» относится к вектору, который обладает способностью включать, интегрировать и экспрессировать гетерологичные последовательности ДНК или фрагменты ДНК в чужеродной клетке. Кассета будет включать регуляторные 5' и/или 3' последовательности, функционально связанные с последовательностью согласно изобретению. Под «функционально связан» подразумевается функциональная связь между промотором и второй последовательностью, причем последовательность промотора иницирует и способствует транскрипции последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Обычно, «функционально связан» означает, что нуклеотидные последовательности, будучи связанными, являются смежными и, при необходимости, объединяют два участка кодирования белка, смежных и в одной рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность функционально связана с гетерологичным промотором, способным вызвать экспрессию указанной нуклеотидной последовательности в клетке-хозяине, такой как микробная клетка-хозяин или растительная клетка-хозяин. Кассета может также содержать, по меньшей мере, один дополнительный ген для котрансформации в организм. В альтернативном случае, дополнительный ген(ы) может быть представлен в нескольких кассетах экспрессии.

В различных вариантах осуществления нуклеотидная последовательность согласно изобретению функционально связана с гетерологичным промотором, например, с растительным промотором. Термин «промотор» относится к нуклеотидной последовательности, функцией которой является прямая транскрипция нижележащей кодирующей последовательности. Промотор вместе с другими транскрипционными и трансляционными регуляторными последовательностями нуклеиновых кислот (которые также именуется «контрольными последовательностями») необходим для экспрессии целевой последовательности ДНК.

Такая кассета экспрессии предусмотрена со множеством сайтов рестрикции для вставки пестицидной последовательности, которая будет подвержена транскрипционной регуляции регуляторных участков.

Кассета экспрессии будет включать по направлению транскрипции от 5'- к 3'-концу, область инициации трансляции или транскрипции (т.е. промотор), последовательность ДНК по настоящему изобретению и участок терминации транскрипции или трансляции (т.е. участок терминации), являющийся функциональным в растениях. Промотор может быть нативным или аналогическим, инородным или гетерологическим, по отношению к растению-хозяину и/или последовательности ДНК согласно изобретению. Также промотор может представлять собой природную последовательность или, альтернативно, синтетическую последовательность. Когда промотор

является «нативным» или «гомологическим» по отношению к растению-хозяину, подразумевается, что промотор присутствует в нативном растении, в которое его ввели. Когда промотор является «инородным» или «гетерологическим» по отношению к последовательности ДНК по настоящему изобретению, подразумевается, что промотор не является нативным или природным промотором для функционально связанной последовательности ДНК по настоящему изобретению. Промотор может быть индуцируемым или конститутивным. Он может быть природным или состоять из частей различных природных промоторов или может быть частично или полностью синтетическим. Способы создания промоторов описаны в исследованиях структуры промоторов, например, в работе Harley and Reynolds (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:2343-2361. Кроме того, может быть оптимизировано местоположение промотора относительно начала транскрипции. Смотрите, например, Roberts *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. США*, 76:760-764. Многие применимые промоторы для использования в растениях известны специалистам.

Например, применимые конститутивные промоторы для использования в растениях включают следующие промоторы: промоторы из вирусов растений, такие как промотор колимовируса хлоротичной полосатости арахиса (PCISV) (патент США № 5,850,019); промотор 35S вируса мозаичности цветной капусты (CaMV) (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313:810-812); промотор 35S, описанный в Kay *et al.* (1987) *Science* 236: 1299-1302; промоторы вируса генов метилтрансферазы *Chlorella* (патент США № 5,563,328) и промотор первичного транскрипта вируса мозаики норичника (FMV) (патент США № 5,378,619); промоторы из таких генов, как рисовый актин (McElroy *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:163-171 и патент США № 5,641,876); убиквитин (Christensen *et al.* (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 и Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689) и Grefen *et al.* (2010) *Plant J.* 64:355-365; pEMU (Last *et al.* (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730 и патент США № 5,510,474); H3 гистон кукурузы (Lepetit *et al.* (1992) *Mol. Gen. Genet.* 231:276-285 и Atanassova *et al.* (1992) *Plant J.* 2(3):291-300); ALS3 *Brassica napus* (заявка согласно PCT WO97/41228); ген малой субъединицы растительной рибулозобискарбоксилазы/оксигеназы (RuBisCO); цирковир (AU 689 311) или вирус мозаики жилок виноградного листа маниока (CsVMV, US 7,053,205); промоторы из сои (Pbdc6 или Pbdc7, описанные в WO/2014/150449 или промотор убиквитина 3, описанный в патенте США № 7393948 и патенте США № 8395021); и промоторы различных генов *Agrobacterium* (смотрите патенты США №№ 4,771,002; 5,102,796; 5,182,200; и 5,428,147).

Применимые индуцируемые промоторы для использования в растениях включают следующие промоторы: промотор из системы ACE1, соответствующий меди (Mett *et al.* (1993) *PNAS* 90:4567-4571); промотор гена In2 кукурузы, соответствующий антидотам гербицидов группы бензолсульфонамида (Hershey *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genetics* 227:229-237 и Gatz *et al.* (1994) *Mol. Gen. Genetics* 243:32-38); и промотор Tet репрессора из Tn10 (Gatz *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 227:229-237). Еще одним типом индуцируемых промоторов для использования в растениях является промотор, реагирующий на индуцирующий агент, на который растения обычно не реагируют. Примером индуцируемого промотора такого типа является индуцируемый промотор из гена стероидного гормона, транскрипционная активность которого индуцируется глюкокортикостероидным гормоном (Schena *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 88:10421) или

недавнее применение химерного активатора транскрипции, XVE, в индуцибельной системе экспрессии растений на основе рецепторов эстрогена, активированной эстрадиолом (Zuo *et al.* (2000) *Plant J.*, 24:265-273). Другие индуцируемые промоторы для использования в растениях описаны в EP 332104, PCT WO 93/21334 и PCT WO 97/06269, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Также могут использоваться промоторы, состоящие из частей других промоторов, и частично или полностью синтетические промоторы. Смотрите, например, Ni *et al.* (1995) *Plant J.* 7:661-676 и PCT WO 95/14098, где описаны такие промоторы для использования в растениях.

В соответствии с одним из вариантов осуществления настоящего изобретения, промоторная последовательность, специфическая для определенных областей или тканей растений, может использоваться для экспрессии нематоцидного белка по предлагаемому изобретению, такая как промоторы специфические для семян (Datla, R. *et al.*, 1997, *Biotechnology Ann. Rev.* 3, 269-296), в частности, промотор напина (EP 255 378 A1), промотор фазеолина, промотор глютеина, промотор гелиантинина (WO92/17580), промотор альбумина (WO98/45460), промотор олеозина (WO98/45461), промотор SAT1 или промотор SAT3 (PCT/US98/06978).

Можно также использовать индуцируемый промотор, предпочтительно выбранный из фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), HMG-CoA редуктазы (HMG), хитиназы, глюканазы, ингибитора протеиназы (PI), семейного гена PR1, нопалин синтазы (nos) и *vspB* промоторов (US 5 670 349, Таблица 3), HMG2 промотора (US 5 670 349), промотора бета-галактозидазы из яблок (ABG1) и промотора аминокислотопропан карбоксилат синтазы из яблок (ACC синтаза) (WO98/45445). В конструктах согласно изобретению может использоваться несколько промоторов, в том числе, несколько последовательных промоторов.

Промотор может включать один или более энхансерных элементов или может быть модифицирован таким образом, чтобы включать один или более энхансерных элементов. В некоторых вариантах осуществления изобретения промотор может включать несколько энхансерных элементов. Промотор, включающие энхансерные элементы, обеспечивают более высокие уровни транскрипции по сравнению с промоторами, которые не включают энхансерные элементы. Соответствующие энхансерные элементы для использования в растениях включают энхансерный элемент PCISV (патент США № 5,850,019), энхансерный элемент CaMV 35S (патенты США №№ 5,106,739 и 5,164,316) и энхансерный элемент FMV (Maiti *et al.* (1997) *Transgenic Res.* 6:143-156); активатор трансляции вируса табачной мозаики (TMV), описанный в заявке WO 87/07644, или вирус гравировки табака (TEV), описанный Carrington & Freed 1990, *J. Virol.* 64: 1590-1597, например, или интроны, такие как интрон кукурузы *adh1* или интрон актина риса 1. Смотрите также PCT WO96/23898, WO2012/021794, WO2012/021797, WO2011/084370, и WO2011/028914.

Зачастую такие конструкты могут содержать 5' и 3' нетранслируемые области. Такие конструкты могут содержать «сигнальную последовательность» или «лидерную последовательность», чтобы способствовать ко-трансляционному или посттрансляционному транспорту целевого пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или в другую пластиду), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи, или для секреции. Например, конструкт может быть создан таким образом, чтобы он содержал сигнальный пептид,

чтобы способствовать переносу пептида в эндоплазматический ретикулум. Термин «сигнальная последовательность» означает последовательность, которая, как известно или предположительно, приводит к котрансляционному или посттрансляционному транспорту пептидов через клеточную мембрану. У эукариотических организмов это обычно связано с секрецией в аппарат Гольджи с некоторым гликозилированием, которое происходит вследствие этого. Термин «лидерная последовательность» означает последовательность, при трансляции которой получают аминокислотную последовательность, достаточную для запуска котрансляционного транспорта пептидной цепи в субклеточную органеллу. Таким образом, термин включает лидерные последовательности, нацеленные на транспорт и/или гликозилирование путем прохождения в эндоплазматический ретикулум, прохождения к вакуолям, пластидам, включая хлоропласты, митохондрии и другие подобные органеллы. Также может быть предпочтительно сконструировать растительную экспрессионную кассету таким образом, чтобы она содержала интрон, чтобы для экспрессии требовался мРНК-процессинг интрона.

Термин «3'-нетранслируемая область» означает полинуклеотид, который расположен далее в 5' - 3' направлении от кодирующей последовательности. Сигнальные последовательности полиаденилирования и другие последовательности, кодирующие регуляторные сигналы, способные влиять на добавление путей полиадениловой кислоты к 3'-концу прекурсора мРНК, представляют собой 3'-нетранслируемые области. Термин «5'-нетранслируемая область» означает полинуклеотид, который расположен перед кодирующей последовательностью в 5' - 3' направлении.

Другие ниже- или вышележащие нетранслируемые элементы включают энхансеры. Энхансеры — это полинуклеотиды, которые увеличивают экспрессию промоторной области. Энхансеры известны специалистам и включают, помимо прочего, энхансерную область SV40 и энхансерный элемент 35S.

Участок терминации может быть нативным с участком инициации транскрипции, нативным с функционально связанной последовательностью ДНК, нативным с растением-хозяином или может быть получен из другого источника (т.е. может быть инородным или гетерологическим к промотору, целевой последовательности ДНК, растению-хозяину или их комбинации). Подходящие участки терминации можно получить из Ti-плазмиды бактерий *A. tumefaciens*, такие как участки терминации октопин-синтазы и нопалин-синтазы. Смотрите также Guerinneau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.* (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al.* (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903; и Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

При необходимости ген или гены могут быть оптимизированы для повышенной экспрессии в трансформированной клетке-хозяине (синтетическая последовательность ДНК). Другими словами, гены можно синтезировать с помощью кодонов, предпочтительных для клеток-хозяев, для улучшения экспрессии или с использованием кодонов с частотой использования, предпочтительной для хозяев. В результате экспрессия открытой рамки считывания синтетической последовательности ДНК в клетке получают полипептид согласно изобретению. Последовательности синтетической ДНК могут использоваться для простого удаления нежелательных сайтов рестрикционных эндонуклеаз, для упрощения стратегий клонирования ДНК,

для изменения или удаления любого потенциального предпочтения кодонов, для изменения или улучшения содержания GC, для удаления или изменения альтернативных рамок считывания и/или для изменения или удаления сайтов узнавания точек сплайсинга, сайтов полиаденилирования, последовательностей Шайна-Дальгарно, нежелательных промоторных элементов и подобных элементов, которые могут присутствовать в нативной последовательности ДНК. Как правило, GC-содержание в гене будет увеличенным. Смотрите, например, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11, где приводится обсуждение использования кодонов, предпочтительных для организма-хозяина. Существуют методы для синтеза растительно-предпочтительных генов. Смотрите, например, патенты США №№ 5,380,831 и 5,436,391, Публикацию патента США № 20090137409, и Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, включенные в настоящую заявку посредством ссылки.

Возможно, синтетические последовательности ДНК могут использоваться для введения других улучшений в последовательность ДНК, таких как введение последовательности интрона, создание последовательности ДНК, которая экспрессируется в виде слияния белка с последовательностями, нацеленными на органеллы, такими как транзитные пептиды хлоропласта, пептиды, нацеленные на апопласт/вакуоль, или пептидные последовательности, которые приводят к удержанию полученного пептида в эндоплазматической сети. Таким образом, в одном из вариантов осуществления нематоцидный белок направлен в хлоропласт для экспрессии. Таким образом, в случае если нематоцидный белок не вставляется непосредственно в хлоропласт, кассета экспрессии будет дополнительно содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую транзитный пептид, направляющий нематоцидный белок в хлоропласты. Такие транзитные пептиды хорошо известны специалистам. Смотрите, например, Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; и Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

Целевой пестицидный ген, нацеливаемым в хлоропласт, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте, для учета разницы в использовании кодона между ядром растения и этой органеллой. Таким образом, целевые нуклеиновые кислоты можно синтезировать с помощью хлоропласт-предпочтительных кодонов. Смотрите, например, патент США № 5,380,831, включенный в настоящую заявку посредством ссылки.

Трансформация растений

Способы согласно изобретению включают введение нуклеотидного конструкта в растение. Термин «введение» означает внедрение нуклеотидного конструкта в растение таким образом, что конструкт получает доступ к внутренней части клетки растения. Способы согласно изобретению не требуют использования определенного метода введения нуклеотидного конструкта в растение, при условии того, нуклеотидный конструкт получает доступ к внутренней части, по меньшей мере, одной клетки растения. Способы введения нуклеотидных конструктов в растения известны специалистам и включают, помимо прочего, способы стабильной трансформации, транзientной трансформации и вирус-опосредованные способы.

Термин «растение» относится к целому растению, органам растения (например, листьям, стеблям, корням и т.д.), семенам, клеткам растения, росткам, зародышам и потомству растений. Клетки растения могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, каллюсы, клетки суспензионной культуры, протопласты, клетки листьев, клетки корня, клетки лубяной ткани, пыльца).

Термины «трансгенные растения» или «трансформированные растения» или «стабильно трансформированные» растения или клетки или ткани относятся к растениям, в которые включены или интегрированы экзогенные нуклеотидные последовательности или фрагменты ДНК в клетке растения. Эти нуклеотидные последовательности включают последовательности, которые являются экзогенными или которые не присутствуют в нетрансформированной растительной клетке, а также те, которые могут быть эндогенными или присутствовать в нетрансформированной растительной клетке. Термин «гетерологичный», как правило, относится к нуклеотидным последовательностям, которые не являются эндогенными для клетки или части нативного генома, в котором они присутствуют, и были добавлены в клетку путем инфицирования, трансфекции, микроинъекции, электропорации, бомбардировки микрочастицами и другими подобными способами.

Трансгенные растения согласно изобретению экспрессируют одну или более новых последовательностей токсина, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения белковая или нуклеотидная последовательность согласно изобретению предпочтительно комбинируется в растениях с другими генами, которые кодируют белки или РНК, придающие полезные агрономические свойства таким растениям. Среди генов, кодирующих белки или РНК, которые сообщают полезные агрономические свойства трансформированным растениям, можно упомянуть последовательности ДНК, кодирующие белки, которые сообщают устойчивость к одному или нескольким гербицидам, и другие, которые сообщают устойчивость к определённым насекомым, которые сообщают устойчивость к определённым заболеваниям, ДНК, кодирующие РНК, которые обеспечивают возможность борьбы с нематодами или насекомыми, и другие подобные гены. Такие гены описаны, в частности, в Международных заявках на патент WO91/02071 и WO95/06128 и в патенте США № 7,923,602 и Публикации заявки на патент США № 20100166723, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. В различных вариантах осуществления трансгенное растение дополнительно содержит один или более дополнительных генов устойчивости к насекомым (например, Cry1, такие как элементы семейств Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E и Cry1F; Cry2, такие как элементы семейства Cry2A; Cry9, такие как элементы семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F; и т.д.). Специалистам в данной области будет понятно, что трансгенное растение может содержать любой ген, придающий целевые агрономические свойства.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, которые сообщают трансформированным растениям или клеткам растений устойчивость к определённым гербицидам, можно указать bar-ген или PAT-ген или ген *Streptomyces coelicolor*, описанный в документе WO2009/152359 сообщаящий устойчивость к гербицидам класса глюофосината, ген, кодирующий соответствующую EPSPS, сообщаящий устойчивость к гербицидам, которые используют EPSPS в качестве целевого фермента, таким как глифосат и его соли (US 4,535,060, US 4,769,061, US

5,094,945, US 4,940,835, US 5,188,642, US 4,971,908, US 5,145,783, US 5,310,667, US 5,312,910, US 5,627,061, US 5,633,435), ген, кодирующий глифосат-н-ацетилтрансферазу (например, US 8,222,489, US 8,088,972, US 8,044,261, US 8,021,857, US 8,008,547, US 7,999,152, US 7,998,703, US 7,863,503, US 7,714,188, US 7,709,702, US 7,666,644, US 7,666,643, US 7,531,339, US 7,527,955, и US 7,405,074), ген, кодирующий глифосат оксидоредуктазу (например, US 5,463,175), или ген, кодирующий белок, устойчивый к ингибиторам HPPD (например, гены устойчивости к ингибиторам HPPD, описанные в WO 2004/055191, WO 199638567, US 6791014, WO2011/068567, WO2011/076345, WO2011/085221, WO2011/094205, WO2011/068567, WO2011/094199, WO2011/094205, WO2011/145015, WO2012/056401 и WO2014/043435).

Среди последовательностей ДНК, кодирующих соответствующую EPSPS, которая сообщает устойчивость к гербицидам, которые используют EPSPS в качестве целевого фермента, следует особо упомянуть ген, кодирующий EPSPS из растений, в частности EPSPS из кукурузы, в особенности EPSPS из кукурузы, которая содержит две мутации, в частности, мутацию в аминокислотном положении 102 и мутацию в аминокислотном положении 106 (WO2004/074443), описанную в заявке на патент США US 6566587, здесь и далее – «EPSPS из кукурузы, содержащая двойную мутацию», или «2mEPSPS», либо ген, кодирующий EPSPS, выделенную из *Agrobacterium*, которая описывается последовательностью ID NO: 2 и последовательностью ID NO: 3 патента США 5,633,435, также именуемый CP4.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих соответствующую EPSPS, которая сообщает устойчивость к гербицидам, которые используют EPSPS в качестве целевого фермента, следует особо упомянуть ген, кодирующий EPSPS GRG23 из *Arthrobacter globiformis*, а также мутанты GRG23 ACE1, GRG23 ACE2 или GRG23 ACE3, в частности мутанты или варианты GRG23, описанные в документе WO2008/100353, такие как GRG23(ace3)R173K последовательности SEQ ID NO: 29 в WO2008/100353.

В случае последовательностей ДНК, кодирующих EPSPS, и, более конкретно, кодирующих описанные выше гены, перед последовательностью, кодирующей эти ферменты, предпочтительно, расположена последовательность, кодирующая транзитный пептид, в особенности, «оптимизированный транзитный пептид», описанный в патентах США №№ 5,510,471 или 5,633,448.

Примеры характеристик устойчивости к гербицидам, которые можно комбинировать с нуклеотидной последовательностью согласно изобретению, дополнительно включают, по меньшей мере, один ингибитор ALS (ацетолактатсинтазы) (WO2007/024782); мутантный ген ALS/AHAS *Arabidopsis* (патент США № 6,855,533); гены, кодирующие 2,4-D-монооксигеназы, придающие устойчивость к 2,4-D (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоте) путем метаболизации (патент США № 6,153,401); и гены, кодирующие дикамба монооксигеназы, придающие устойчивость к дикамба (3,6-дихлор-2-метоксibenзойной кислоте) путем метаболизации (US 2008/0119361 и US 2008/0120739).

В различных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению пакетируют с одним или несколькими генами, устойчивыми к гербицидам, включая один или более генов, устойчивых к гербицидам-ингибиторам HPPD, и/или один или более генов, устойчивых к глифосату и/или глюфосинату.

Среди последовательностей ДНК, кодирующих белки, которые имеют отношение к устойчивости к насекомым, необходимо упомянуть белки Bt, которые широко описаны в литературе и хорошо известны специалистам. Необходимо упомянуть также белки, выделенные из бактерий, таких как *Photobacterium* (WO97/17432 и WO98/08932).

Среди таких последовательностей ДНК, кодирующих целевые белки, которые сообщают новые свойства устойчивости к насекомым, необходимо упомянуть белки Bt, Cry, или VIP, которые широко описаны в литературе и хорошо известны специалистам. Сюда входят: белок Cry1F или гибриды, полученные из белка Cry1F (например, гибридные белки Cry1A-Cry1F, описанные в US 6,326,169; US 6,281,016; US 6,218,188, либо их токсичные фрагменты), белки типа Cry1A, либо их токсичные фрагменты, предпочтительно, белок Cry1Ac или гибриды, полученные из белка Cry1Ac (например, гибридный белок Cry1Ab-Cry1Ac, описанный в US 5,880,275) или белок Cry1Ab или Bt2 или его инсектицидные фрагменты, как описано в EP451878, белки Cry2Ac, Cry2Af или Cry2Ag, как описано в WO2002/057664, или их токсичные фрагменты, белок Cry1A.105, описанный в WO 2007/140256 (SEQ ID NO: 7) или его токсичный фрагмент, белок VIP3Aa19 доступа NCBI - ABG20428, белок VIP3Aa20 доступа NCBI - ABG20429 (SEQ ID NO: 2 в WO 2007/142840), белки VIP3A, производимые в хлопковых событиях COT202 или COT203 (WO2005/054479 и WO2005/054480, соответственно), белки Cry, как описано в WO2001/47952, белок VIP3A или его токсичный фрагмент, как описано в Estruch et al. (1996), Proc Natl Acad Sci U S A. 28;93(11):5389-94 и US 6,291,156, инсектицидные белки из *Xenorhabdus* (описанные в документе WO98/50427), *Serratia* (особенно, из *S. entomophila*) или из группы видов *Photobacterium*, такие как Tc-белки из *Photobacterium*, описанные в документе WO98/08932 (например, Waterfield et al., 2001, Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24; French-Constant and Bowen, 2000, Cell Mol Life Sci., 57(5):828-33). Предлагаемое изобретение включает также любые варианты или мутанты любого из этих белков, которые отличаются несколькими (1-10, предпочтительно, 1-5) аминокислотами в указанных выше последовательностях, в особенности, в последовательности токсичного фрагмента, или которые сливаются с транзитным пептидом, таким как плазмидный транзитный пептид, либо с другим белком или пептидом.

В различных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту согласно изобретению можно комбинировать в растениях с одним или несколькими генами, придающими целевую характеристику, такую как устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, устойчивость к засухе, устойчивость к нематодам, эффективность водопользования, эффективность использования азота, повышенная питательная ценность, устойчивость к болезням, улучшенный фотосинтез, улучшенное качество клетчатки, стрессоустойчивость, улучшенная эффективность репродукции и другие подобные характеристики.

Особенно применимые трансгенные события, которые можно комбинировать с генами по настоящему изобретению в растениях того же вида (например, путем скрещивания или повторной трансформации растения, содержащего другое трансгенное событие, с химерным геном согласно изобретению), включают Событие BPS-CV127-9 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как NCIMB № 41603, описанное в WO2010/080829); Событие DAS21606-3 / 1606 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как PTA-11028, описанное в WO2012/033794), Событие DAS-44406-6 /

pDAB8264.44.06.1 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как PTA-11336, описанное в WO2012/075426), Событие DAS-14536-7 /pDAB8291.45.36.2 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как PTA-11335, описанное в WO2012/075429), Событие DAS68416 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как ATCC PTA-10442, описанное в WO2011/066384 или WO2011/066360); Событие DP-305423-1 (соя, качественные характеристики, не внесенное, описанное в US-A 2008-312082 или WO2008/054747); Событие DP-356043-5 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как ATCC PTA-8287, описанное в US-A 2010-0184079 или WO2008/002872); Событие FG72 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как PTA-11041, описанное в WO2011/063413), Событие LL27 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как NCIMB41658, описанное в WO2006/108674 или US-A 2008-320616); Событие LL55 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как NCIMB 41660, описанное в WO 2006/108675 или US-A 2008-196127); Событие MON87701 (соя, борьба с насекомыми, внесенное как ATCC PTA-8194, описанное в US-A 2009-130071 или WO2009/064652); Событие MON87705 (соя, качественные характеристики - устойчивость к гербицидам, внесенное как ATCC PTA-9241, описанное в US-A 2010-0080887 или WO2010/037016); Событие MON87708 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как ATCC PTA-9670, описанное в WO2011/034704); Событие MON87712 (соя, урожайность, внесенное как PTA-10296, описанное в WO2012/051199), Событие MON87754 (соя, качественные характеристики, внесенное как ATCC PTA-9385, описанное в WO2010/024976); Событие MON87769 (соя, качественные характеристики, внесенное как ATCC PTA-8911, описанное в US-A 2011-0067141 или WO2009/102873); Событие MON89788 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как ATCC PTA-6708, описанное в US-A 2006-282915 или WO2006/130436); Событие SYHT0H2 / SYN-000H2-5 (соя, устойчивость к гербицидам, внесенное как PTA-11226, описанное в WO2012/082548), событие EE-GM3 / FG72 (соя, устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC PTA-11041), при необходимости, в сумме с событием EE-GM1/LL27 или событие EE-GM2/LL55 (WO2011/063413A2); Событие DAS-68416-4 (соя, устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC PTA-10442, WO2011/066360A1); Событие DAS-68416-4 (соя, устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC PTA-10442, WO2011/066384A1); Событие DAS-21606-3 (соя, устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC PTA-11028, WO2012/033794A2); Событие MON-87712-4 (соя, качественные характеристики, № Доступа ATCC. PTA-10296, WO2012/051199A2); Событие DAS-44406-6 (соя, суммарная устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC. PTA-11336, WO2012/075426A1); Событие DAS-14536-7 (соя, суммарная устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC. PTA-11335, WO2012/075429A1); Событие SYN-000H2-5 (соя, устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC. PTA-11226, WO2012/082548A2); Событие 8264.44.06.1 (соя, суммарная устойчивость к гербицидам, Accession N PTA-11336, WO2012075426A2); Событие 8291.45.36.2 (соя, суммарная устойчивость к гербицидам, № Доступа PTA-11335, WO2012075429A2); Событие SYHT0H2 (соя, № Доступа ATCC. PTA-11226, WO2012/082548A2); Событие pDAB8264.42.32.1 (соя, суммарная устойчивость к гербицидам, № Доступа ATCC PTA-11993, WO2013/010094A1).

Кроме того, настоящим изобретением представляется способ получения растений или семян сои, содержащих нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 1 или 2, в комбинации с другим локусом/геном устойчивости к SCN, например, путем комбинации растения

или семени сои, содержащих нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ. ID NO: 1 или 2 с другим локусом/геном устойчивости к SCN, которые встречаются в том же растении/семени сои, и посадки семени, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 1 или 2, и указанный другой локус/ген устойчивости к SCN. В одном варианте осуществления растения, клетки или семена согласно изобретению содержат один или более других локусов/генов устойчивости к SCN, которые встречаются в сое, для получения комбинации различных источников устойчивости к SCN в растениях, клетках или семенах сои согласно изобретению. Известны несколько локусов или генов сои, обеспечивающих устойчивость к SCN, при этом один или несколько из них могут комбинироваться с растением, содержащим SEQ ID NO: 1 или 2, в одном и том же растении, клетке или семени, например, любой из генов/локусов устойчивости к SCN из источников устойчивости PI 88788, PI 548402 (Peking), PI 437654 (Hartwig или CystX®) или любая их комбинация, или один или более нативных локусов/генов устойчивости к SCN *rhg1*, *rhg1-b*, *rhg2*, *rhg3*, *Rhg4*, *Rhg5*, qSCN11, cqSCN-003, cqSCN-005, cqSCN-006, cqSCN-007 или любой из локусов устойчивости к SCN, идентифицированных в любой из хромосом сои 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или любая их комбинация (Kim et al. 2016, Theor. Appl. Genet. 129(12):2295-2311; Kim and Diers 2013, Crop Science 53:775-785; Kazi et al. 2010, Theor. Appl. Gen. 120(3):633-644; Glover et al. 2004, Crop Science 44(3):936-941; www.soybase.org; Concibido et al. 2004, Crop Science 44:1121-1131; Webb et al. 1995, Theor. Appl. Genet. 91:574-581). Кроме того, в одном варианте осуществления растения или семена согласно изобретению комбинируются с одним или несколькими локусами устойчивости к SCN в сое, полученными из любого из источников устойчивости к SCN PI 548316, PI 567305, PI 437654, PI 90763, PI 404198B, PI 88788, PI 468916, PI 567516C, PI 209332, PI 438489B, PI 89772, Peking, PI 548402, PI 404198A, PI 561389B, PI 629013, PI 507471, PI 633736, PI 507354, PI 404166, PI 437655, PI 467312, PI 567328, PI 22897 или PI 494182.

Трансформация клеток растений может осуществляться с использованием одной или нескольких методов, известных специалистам. Пестицидный ген согласно изобретению может быть модифицирован для получения или усиления экспрессии в растительных клетках. Как правило, конструкт, который экспрессирует такой белок, будет содержать промотор для транскрипции гена, а также 3'-нетранслируемый участок для обеспечения терминации транскрипции и полиаденилирования. Строение таких конструктов известно специалистам. В некоторых случаях может быть полезно сконструировать ген таким образом, чтобы полученный пептид секретировался или иным образом был нацелен в растительную клетку. Например, ген может быть создан таким образом, чтобы он содержал сигнальный пептид, чтобы способствовать переносу пептида в эндоплазматический ретикулум. Также может быть предпочтительно сконструировать растительную экспрессионную кассету таким образом, чтобы она содержала интрон, чтобы для экспрессии требовался мРНК-процессинг интрона.

Как правило, такая «растительная кассета экспрессии» будет вставляться в «вектор для трансформации растений». Такой вектор трансформации растения может состоять из одного или нескольких векторов ДНК, необходимых для трансформации растения. Например, для специалистов в этой области техники обычной практикой является использование векторов для трансформации растений, которые состоят более, чем из одного непрерывного сегмента ДНК. Эти

векторы зачастую именуются в этой области «двоичными векторами». Бинарные векторы, а также векторы с хелперными плазмидами чаще всего используются для агробактериальной трансформации, где сегменты ДНК, необходимые для достижения эффективной трансформации, имеют довольно большой размер и сложность, поэтому предпочтительно разделять функции на отдельные молекулы ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, который содержит цис-действующие последовательности, необходимые для переноса Т-ДНК (такие как левый и правый пограничный район), селективируемый маркер, который спроектирован таким образом, чтобы он был способен экспрессировать в растительной клетке, и «целевой ген» (ген, сконструированный таким образом, чтобы он был способен экспрессировать в растительной клетке, для которой необходимо получение трансгенных растений). На этом плазмидном векторе также присутствуют последовательности, необходимые для бактериальной репликации. Цис-действующие последовательности расположены таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос в клетки растений и экспрессию в них. Например, между левым и правым пограничным районом расположены ген селективируемого маркера и ген пестицида. Зачастую второй плазмидный вектор содержит транс-действующие факторы, которые обеспечивают перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* в растительные клетки. Эта плазида зачастую содержит функции вирулентности (гены Vir), которые обеспечивают возможность инфицирования клеток растений *Agrobacterium* и переноса ДНК путем расщепления в пограничных последовательностях, а также vir-опосредованного переноса ДНК, как понятно специалистам (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Для трансформации растений могут использоваться несколько типов *Agrobacterium* strains (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.д.). Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений другими методами, такими как бомбардировка микрочастицами, микроинъекция, электропорация, полиэтиленгликоль и т.д.

Как правило, методы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые клетки растений (например, незрелые или зрелые эмбрионы, суспензионные культуры, недифференцированные каллюсы, протопласты и т.д.), после чего следует отбор на максимальном пороговом уровне (в зависимости от селективируемого маркерного гена) для получения трансформированных клеток растений из группы нетрансформированной клеточной массы. Как правило, эксплантаты переносятся в свежий объем той же среды и культивируются в соответствии с обычным порядком. Затем трансформированные клетки дифференцируют в побеги после помещения их в среду для регенерации с добавлением селективного агента на максимальном пороговом уровне. Затем побеги переносят в селективную среду для укоренения для получения укорененного побега или проростка. Затем трансгенный росток превращается в зрелое растение и производит плодородные семена (например, Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Как правило, эксплантаты переносятся в свежий объем той же среды и культивируются в соответствии с обычным порядком. Общее описание методов и способов получения трансгенных растений можно найти в работе Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 и Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит много клеток, в любом фрагменте соответствующего целевого каллуса или ткани или группы клеток присутствуют как трансформированные, так и

нетрансформированные клетки. Из-за того, что нетрансформированные клетки погибают, а трансформированные клетки могут размножаться, получают трансформированные культуры растений. Зачастую способность удалять нетрансформированные клетки является ограничением для быстрого восстановления трансформированных растительных клеток и успешного получения трансгенных растений.

Протоколы трансформации, а также протоколы для введения нуклеотидных последовательностей в растения могут варьироваться в зависимости от типа растения или растительной клетки, то есть от типа однодольных или двудольных растений, которые должны быть трансформированы. Генерация трансгенных растений может быть осуществлена одним из нескольких способов, включая, но не ограничиваясь этим, микроинъекцию, электропорацию, прямой перенос генов, введение гетерологичной ДНК *Agrobacterium* в клетки растения (агробактериальная трансформация), бомбардировка клеток растения гетерологичной инородной ДНК, которая нанесена на частицы, ускорение баллистических частиц, преобразование аэрозольного пучка (Опубликованная заявка США № 20010026941; патент США № 4,945,050; Международная Публикация № WO 91/00915; Опубликованная заявка США № 2002015066), трансформация *Lec1*, и различные другие способы переноса ДНК, не опосредованные направлением частиц.

Методы трансформации хлоропластов хорошо известны специалистам. Смотрите, например, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. Метод основывается на внедрении с помощью генной пушки ДНК, содержащей селективируемый маркер, и нацеливании ДНК в пластидный геном путем гомологической рекомбинации. Также пластидную трансформацию можно осуществить с помощью трансаактивации нефункционирующего трансгена, находящегося в пластиде, путем тканеспецифической экспрессии РНК полимеразы, закодированной в ядре и направленной в пластиду. О такой системе сообщается в McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 91:7301-7305.

После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растения затем применяют соответствующий отбор на максимальном пороговом уровне в среде для уничтожения нетрансформированных клеток и сепарации и размножения предположительно трансформированных клеток, которые выживут после такой селекционной обработки путем планомерного переноса в свежую среду. Путем непрерывного засева культур и соответствующего отбора может осуществляться идентификация и размножение клеток, которые трансформированы плазмидным вектором. Затем для подтверждения присутствия целевого интегрированного гетерологичного гена в геноме трансгенного растения могут использоваться молекулярные и биохимические методы.

Трансформированные клетки могут развиваться в растения в соответствии с обычными способами. Смотрите, например, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Затем такие растения могут выращиваться и либо опыляться с использованием такой же трансформированной линии или других линий, после чего может идентифицироваться гибрид с конститутивной экспрессией целевой фенотипической характеристикой. Могут быть выращены два или более

поколений для того, чтобы обеспечить сохранение и наследование целевой фенотипической характеристики, а затем может производиться сбор семян для того, чтобы обеспечить достижение экспрессии целевой фенотипической характеристики. Таким образом, настоящим изобретением предоставляется трансформированное семя (также именуемое «трансгенное семя»), которое содержит нуклеотидный конструкт согласно изобретению, например, кассету экспрессии согласно изобретению, стабильно включенную в геном.

Оценка трансформации растений

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в клетки растений осуществляется проверка трансформации или интеграции гетерологичного гена в геном растения с использованием различных методов, таких как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ — это быстрый метод скрининга трансформированных клеток, тканей или отростков на наличие встроенного гена на более ранней стадии перед трансплантацией в почву (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР осуществляется с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных для целевого гена или фонового вектора *Agrobacterium* и т.д.

Трансформация растений может подтверждаться с помощью Саузерн-блоттинга геномной ДНК (Sambrook and Russell, 2001, *выше*). В целом, из трансформанта извлекается вся ДНК, расщепляется соответствующими рестрикционными ферментами, фракционируется в агарозном геле и переносится на нитроцеллюлозную или нейлоновую мембрану. Затем мембрану или блот зондируют, например, целевым фрагментом ДНК, меченным радиоактивным изотопом ^{32}P , чтобы подтвердить интеграцию гена в геном растения в соответствии со стандартными методиками (Sambrook and Russell, 2001, *выше*).

В ходе нозерн-блоттинга РНК изолируют из специфических тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и блоттируют на нейлоновом фильтре в соответствии со стандартными процедурами, которые обычно используются в данной области (Sambrook and Russell, 2001, *выше*). Экспрессия РНК, кодируемой пестицидным геном, затем тестируется путем гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из пестицидного гена, способами, известными специалистам (Sambrook and Russell, 2001, *выше*).

Для подтверждения присутствия белка, кодируемого пестицидным геном, в отношении трансгенных растений может производиться вестерн-блоттинг, биохимические анализы и другие подобные стандартные процедуры (Sambrook and Russell, 2001, *см. выше*) с использованием антител, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими на нематоцидном белке.

Пестицидная активность в растениях

В соответствии с еще одним аспектом изобретения могут быть получены трансгенные растения, экспрессирующие нематоцидный белок, обладающий пестицидной активностью в отношении вредителя нематоды. Способы, описанные выше в качестве примера, могут использоваться для получения трансгенных растений, однако способ получения трансгенных

клеток растений не является критическим для сути настоящего изобретения. По усмотрению экспериментатора могут использоваться способы, известные специалистам или описанные в литературе, такие как агробактериальная трансформация, биолистическая трансформация и способы, не опосредованные частицами. Растения, экспрессирующие нематоцидный белок, могут быть изолированы обычными способами, описанными в данной области, например, путем трансформации каллуса, отбора трансформированного каллуса и регенерации плодородных растений из такого трансгенного каллуса. В таком процессе в качестве селективируемого маркера может использоваться любой ген, если его экспрессия в клетках растений придает возможность идентифицировать или выбирать трансформированные клетки.

Для использования с клетками растений был разработан ряд маркеров, таких как маркеры устойчивости к хлорамфениколу, аминогликозиду G418, гигромицину и т.д. Также в качестве селективируемых маркеров могут использоваться другие гены, которые кодируют продукт, участвующий в метаболизме хлоропластов. В частности, например, могут использоваться гены, придающие устойчивость к гербицидам растений, таким как глифосат, бромоксинил или имидазолинон. Такие гены описаны в литературе (Stalker *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (ген нитрилазы, придающий устойчивость к бромоксинилу); и Sathasivan *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (ген AHAS, придающий устойчивость к имидазолинону). Кроме того, описанные в настоящем документе гены могут использоваться в качестве маркеров для оценки трансформации клеток бактерий или растений. Способы детекции присутствия трансгена в растении, органе растения (например, в листьях, стеблях, корнях и т.д.), семени, клетке растения, ростке, зародыше или потомстве растений известны специалистам. В одном варианте осуществления присутствие трансгена определяют путем тестирования пестицидной активности в отношении вредителя нематоды.

Может осуществляться тестирование плодородных растений, экспрессирующих нематоцидный белок, на пестицидную активность в отношении вредителей нематод, и отбор растений, демонстрирующих оптимальную активность, для дальнейшего размножения. Метод анализа пестицидной активности известен специалистам. Как правило, белок смешивается с кормом и используется в анализах, когда он скармливается вредителям. Смотрите, например, Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

Настоящее изобретение может использоваться для трансформации любых видов растений, включая, помимо прочего, однодольные и двудольные растения. Примеры целевых растений включают, помимо прочего, кукурузу (маис), сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные растения, перец, картофель, хлопок, рис, сою, сахарную свеклу, сахарный тростник, табак, ячмень и масличный рапс, виды рода *Brassica*, люцерну, рожь, просо, сафлор, арахис, сладкий картофель, маниок, кофе, кокос, ананас, цитрусовые деревья, какао, чай, банан, авокадо, инжир, гуаву, манго, оливки, папайю, кешью, макадамиию, миндаль, овес, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

Применение для пестицидного контроля

Специалистам известны общие способы применения штаммов, содержащих нуклеотидную последовательность по настоящему изобретению или ее вариант, для борьбы с вредителями или для

конструирования других организмов, которые могут использоваться в качестве пестицидных агентов. Смотрите, например, патент США № 5,039,523 и EP 0480762A2.

Микроорганизмы могут быть генетически изменены таким образом, чтобы они содержали нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 1 или 2, или их нематично-активные варианты или фрагменты, и соответствующий белок может быть использован для защиты сельскохозяйственных культур и продуктов от вредителей. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения целые, то есть нелизированные, клетки организма, продуцирующего токсин (пестицид), обрабатывают реагентами, которые продлевают активность токсина, продуцируемого в клетке, когда клетка попадает в среду обитания целевых вредителей.

В качестве альтернативы, пестицид получают путем введения пестицидного гена в клетку-хозяина. Экспрессия пестицидного гена прямо или косвенно приводит к вырабатыванию и сохранению пестицида внутри клетки. В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения эти клетки затем подвергаются обработке в условиях, которые продлевают активность токсина, продуцируемого в клетке, когда клетка попадает в среду обитания целевых вредителей. Полученный продукт сохраняет токсическую активность. Такие пестициды, защищенные от внешних воздействий в природных условиях, могут быть затем приготовлены в соответствии с обычными способами для обработки среды обитания целевых вредителей, например, почвы, воды и листья растений. См., например, EPA 0192319 и указанные в нем ссылки. В качестве альтернативы, клетки, экспрессирующие ген согласно изобретению, могут быть включены в состав препарата, который может применяться в качестве пестицида.

Активные ингредиенты по настоящему изобретению, как правило, применяются в виде композиций, ими могут обрабатываться посевные площади или соответствующие растения, одновременно с обработкой другими соединениями, или такие соединения могут применяться по очереди. Такие соединения могут представлять собой удобрения, средства борьбы с сорняками, криопротекторы, поверхностно-активные вещества, детергенты, пестицидные мыла, масла для опрыскивания растений в период покоя, полимеры и/или препараты с модифицированным высвобождением или препараты, содержащие биоразлагаемый носитель, которые обеспечивают длительное сохранение активности активных ингредиентов на целевых площадях после однократной обработки препаратом. Они также могут представлять собой селективные гербициды, химические инсектициды, вируциды, микробициды, амебициды, пестициды, фунгициды, бактериоциды, нематоциды, моллюскоциды или смеси нескольких из этих препаратов, при необходимости, вместе с другими агрономически приемлемыми носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными средствами, способствующими нанесению, обычно используемыми для получения препаратов. Соответствующие носители и адъюванты могут быть твердыми или жидкими и соответствовать веществам, которые обычно используются при приготовлении препаратов, например, природные или регенерированные минеральные вещества, растворители, диспергаторы, смачивающие агенты, вещества для повышения клейкости, связующие вещества или удобрения. Аналогичным образом, составы могут быть приготовлены в виде съедобных приманок или преобразованы в ловушки для вредителей, чтобы целевые вредители проглотили пестицидный состав или питались пестицидным составом.

Способы применения активного ингредиента по настоящему изобретению или агрохимической композиции по настоящему изобретению, которая содержит, по меньшей мере, один из нематоцидных белков, которые описаны в настоящем документе как SEQ ID NO: 1 или 2, или их нематодцидно-эффективных вариантов или фрагментов, включают обработку листьев, нанесение покрытия на семена и внесение в почву. Количество обработок и дозировка зависят от степени заражения соответствующим вредителем.

Композиция может быть приготовлена в виде порошка, пылевидного препарата, микрогранул, гранул, спрея, эмульсии, раствора, в том числе коллоидного раствора, и других подобных форм и с использованием обычных способов, таких как высушивание, лиофилизация, гомогенизация, экстракция, фильтрация, центрифугирование, седиментация или концентрирование культуры клеток, содержащей полипептид. Во всех таких композициях, которые содержат, по меньшей мере, один такой пестицидный полипептид, полипептид может присутствовать в концентрации приблизительно от 1% до приблизительно 99% по массе.

При применении способов согласно изобретению могут уничтожаться вредители нематоды или их количество на определенной площади может быть уменьшено или они могут профилактически применяться в отношении среды обитания для предотвращения заражения чувствительным вредителем. Предпочтительно пестицидно-эффективное количество полипептида попадает внутрь вредителя, или вредитель контактирует с пестицидно-эффективным количеством полипептида. Термины «пестицидно-эффективное количество» или «нематодцидно-эффективное количество» означают такое количество пестицида или нематоцида, которое способно привести к гибели, по меньшей мере, одного вредителя или заметно уменьшить рост популяции вредителей, нарушить механизм кормления или нормальное физиологическое развитие вредителя или растения-хозяина, которое заражено вредителем. Такое количество будет варьироваться в зависимости от таких факторов, как, например, конкретный вид целевого вредителя, с которым проводится борьба, конкретная среда, место, растение, конкретная сельскохозяйственная культура или сельскохозяйственный участок, подлежащий обработке, окружающие условия, а также способ обработки, дозировка, концентрация, стабильность и количество применяемой нематодцидно-эффективной полипептидной композиции. Составы также могут варьироваться в зависимости от климатических условий, экологических факторов и/или частоты применения и/или степени заражения вредителями.

Описанные пестицидные композиции могут быть получены путем включения в препарат бактериальной клетки, кристалла и/или суспензии спор или изолированного белкового компонента вместе с соответствующим агрономически приемлемым носителем. Приготовление композиций могут осуществляться перед их применением с использованием соответствующих способов, таких как получение лиофилизата, сублимационная сушка, удаление влаги или добавление водного носителя, среды или соответствующего разбавителя, такого как солевой раствор или другой буфер. Приготовленные композиции могут иметь форму пылевидного препарата или гранулированного материала, или суспензии в масле (растительном или минеральном), или эмульсий типа «вода в масле» или «масло в воде», смачиваемого порошка, или они могут применяться в комбинации с любым другим носителем, приемлемым с точки зрения сельского хозяйства. Применимые

агрономические носители могут быть твердыми или жидкими и хорошо известны специалистам. Термин «агрономически приемлемый носитель» включает все адъюванты, инертные компоненты, дисперсанты, поверхностно-активные вещества, вещества, повышающие клейкость, связующие вещества и т.д., которые обычно используются для приготовления пестицидов; эти вещества известны специалистам. Препараты могут смешиваться с одним или несколькими твердыми или жидкими адъювантами, а затем процесс приготовления может осуществляться различными способами, например, путем смешивания до однородности, вымешивания и/или измельчения пестицидной композиции с соответствующими адъювантами с использованием обычных методик. Применимые препараты и способы обработки описаны в патенте США № 6,468,523, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Способы увеличения урожайности растений

Настоящим изобретение предоставляются способы увеличения урожайности растений. Такие способы включают получение растения или клетки растения, которые экспрессируют полинуклеотид, кодирующий нематоцидную полипептидную последовательность, описанную в настоящем документе, и выращивание растения или его семени в поле, зараженном (или подверженном заражению) вредителем нематодой, в отношении которого указанный полипептид обладает нематоцидной активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид Cgyl4, описанный в настоящем документе, обладает нематоцидной активностью в отношении видов рода *Pratylenchus*, и указанное поле заражено указанными видами рода *Pratylenchus*. В некоторых вариантах осуществления таким видом рода *Pratylenchus* является *Pratylenchus brachyurus*. В дополнительных вариантах осуществления нематодой является клубеньковая нематода, ранящая нематода или копьевидная нематода. Согласно определению в настоящем документе термин «урожайность» растения относится к качеству и/или количеству биомассы, которое продуцируется растением. Термин «биомасса» означает любой измеримый продукт растения. Увеличение производства биомассы — это любое увеличение выхода измеримого продукта растения. Увеличение урожайности растений полезно с коммерческой точки зрения в нескольких аспектах. Например, при увеличении биомассы листьев растений может увеличиваться урожай листовых овощей, которые употребляются человеком или животными в пищу. Кроме того, увеличение биомассы листьев может быть использовано для увеличения производства растительных фармацевтических или промышленных продуктов. Увеличение урожайности может включать любое статистически значимое увеличение, в том числе, помимо прочего, увеличение урожая, по меньшей мере, на 1%, увеличение, по меньшей мере, на 3%, увеличение, по меньшей мере, на 5%, увеличение, по меньшей мере, на 10%, увеличение, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 70%, увеличение, по меньшей мере, на 100% или большее увеличение урожая по сравнению с растением, не экспрессирующим пестицидный белок, описанный в настоящем документе. В соответствии с определенными способами урожайность растений повышается в результате улучшения устойчивости растений, экспрессирующих нематоцидный белок, описанный в настоящем документе, к нематодам. В результате экспрессии нематоцидного белка обеспечивается меньшее заражение вредителями или обеспечивается поедание вредителями меньшего количества растений. В различных вариантах

осуществления экспрессия нематоцидного белка обеспечивает улучшенное развитие корней (например, улучшенный рост корней или корневых волосков), улучшенную урожайность, более быстрое прорастание, улучшенное управление стрессом у растений, включая повышенную устойчивость к стрессу и/или улучшенное восстановление после стресса, большую механическую стойкость, улучшенную устойчивость к засухе, повышенную стойкость к грибковым инфекциям и улучшенное здоровье растений по сравнению с растениями без экспрессии нематоцидного белка согласно изобретению.

Растения также могут обрабатываться одной или несколькими химическими композициями, в том числе одним или несколькими гербицидами, инсектицидами или фунгицидами. Примеры химических композиций включают следующие композиции: Гербициды для обработки фруктов/овощей: атразин, бромасил, диурон, глифосат, линурон, метрибузин, симазин, трифлуралин, флуазифоп, глюфосинат, галосульфурон гован, паракват, пропизамид, сетоксидим, бутафенацил, галосульфурон, индазифлам; инсектициды для обработки фруктов/овощей:

алдикарб, *Bacillus Thuriengensis*, карбарил, карбофуран, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, цифлутрин/бета-цифлутрин, эсфенвалерат, лямбда-цигалотрин, ацехиноцил, бифеназат, метоксифенозид, новалурон, хромафенозид, тиаклоприд, динотефуран, флуаكريпирим, спиродеклофен, гамма-цигалотрин, спиромезифен, спиносад, ринаксипир, циазипир, трифлумурон, спиротетрамат, имидаклоприд, флубендиамид, тиодикарб, метафлумизон, сульфоксафлор, цифлуметофен, цианопирафен, клотианидин, тиаметоксам, спиноторам, тиодикарб, флоникамид, метиокарб, эмаектин-бензоат, индоксакарб, фенамифос, пирипроксифен, фенбутатин-оксид; фунгициды для обработки фруктов/овощей: аметоктрадин, азоксистробин, бентиаваликарб, боскалид, каптан, карбендазим, хлороталонил, медь, циазофамид, цифлуфенамид, цимоксанил, ципроконазол, ципродинил, дифеноконазол, диметоморф, дитианон, фенамидон, фенгексамид, флуазилам, флудиоксонил, флуопиколоид, флуопирам, флуоксастробин, флуксапироксад, фолпет, фосетил, ипродион, ипроваликарб, изопиразам, крезоксим-метил, манкоцеб, мандипропамид, металаксил/мефеноксам, метирам, метрафенон, миклобутанил, пенконазол, пентиопирад, пикоксистробин, пропамокарб, пропиконазол, пропинеб, проквиназид, протиоконазол, пираклостробин, пириметанил, квиноксифен, спирокамин, сера, тебуконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для обработки зерновых культур:

2,4-D, амидосульфурон, бромоксинил, карфентразон-Е, хлоротолурон, хлоросульфурон, клодинафоп-Р, клопиралид, дикамба, диклофоп-М, дифлуфеникан, феноксапроп, флорасулам, флукарбазон-NA, флуфенацет, флупиросульфурон-м, флуороксибир, флуртамон, глифосат, йодосульфурон, иоксинил, изопротурон, МСРА, мезосульфурон, метосульфурон, пендиметалин, пиноксаден, пропоксикарбазон, просульфокарб, пироксулам, сульфосульфурон, тифенсульфурон, тралкоксидит, триосульфурон, трибенурон, трифлуралин, тритосульфурон; фунгициды для обработки зерновых культур: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлорталонил, цифлуфенамид, ципроконазол, ципродинил, димоксистробин, эпоксиконазол, фенпропидин, фенпропиморф, флуопирам, флуоксастробин, флуквинконазо, флуксапироксад, изопиразам, крезоксим-метил, метконазол, метрафенон, пентиопирад, пикоксистробин, прохлораз,

пропиконазол, проквиназид, протиоконазол, пираклостробин, квиноксифен, спироксамин, тебуконазол, тиюфанат-метил, трифлуксистробин; инсектициды для обработки зерновых культур: диметоат, лямбда-цигалотрин, дельтаметрин, альфа-циперметрин, β -цифлутрин, бифентрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, хлорпирифос, пиримикарб, метиокарб, сульфоксафлор; гербициды для обработки кукурузы: атразин, алахлор, бромоксинил, ацетохлор, дикамба, клопиралид, (S-)диметенамид, глюфосинат, глифосат, изоксафлутол, (S-)метолахлор, мезотрион, никосульфурон, примисульфурон, римсульфурон, сулькотрион, форамсульфурон, топрамезон, темботрион, сафлуфенацил, тиенкарбазон, флуфенацет, пироксасульфурон; инсектициды для обработки кукурузы: карбофуран, хлорпирифос, бифентрин, фипронил, имидаклоприд, лямбда-цигалотрин, тефлутрин, тербуфос, тиаметоксам, клотианидин, спиромезифен, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, дельтаметрин, Тиодикарб, β -цифлутрин, циперметрин, бифентрин, луфенурон, тебупиримфос, этипрол, циазипир, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, авермектин; фунгициды для обработки кукурузы: азоксистробин, биксафен, боскалид, ципроконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, фенитропан, флуопирам, флуоксастробин, флукаспироксад, изопиразам, метконазол, пентиопирад, пикоксистробин, пропиконазол, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, трифлуксистробин; гербициды для обработки риса: бутахлор, пропанил, азимсульфурон, бенсульфурон, цигалофоп, даимурон, фентразамид, имазосульфурон, мефенацет, оксазикломефон, пиразосульфурон, пирибутикарб, квинклолак, тиобенкарб, инданофан, флуфенацет, фентразамид, галосульфурон, оксазикломефон, бензобициклон, пирифталид, пенокулам, биспирибак, оксадиаргил, этокисульфурон, претилахлор, мезотрион, тефурилтрион, оксадиазон, феноксапроп, пиримисульфурон; инсектициды для обработки риса: диазинон, фенобукарб, бенфуракарб, бупрофезин, динотефуран, фипронил, имидаклоприд, изопрокарб, тиаклоприд, хромафенозид, клотианидин, этипрол, флубендиамид, ринаксипир, дельтаметрин, ацетамиприд, тиаметоксам, циазипир, спиносад, спиноторам, эмаектин-бензоат, циперметрин, хлорпирифос, этофенпрокс, карбофуран, бенфуракарб, сульфоксафлор; фунгициды для обработки риса: азоксистробин, карбендазим, карпропамид, диклоцимет, дифеноконазол, эдифенфос, феримзон, гентамицин, гексаконазол, гимексазол, ипробенфос (IBP), изопропиолан, изотианил, касугамицин, манкоцеб, метоминостробин, оризастробин, пенцикурон, пробеназол, пропиконазол, пропинеб, тебуконазол, тиюфанат-метил, тиадинил, трициклазол, трифлуксистробин, валидамицин; гербициды для обработки хлопка: диурон, флуометурон, MSMA, оксифлуорфен, прометрин, трифлуралин, карфентразон, клетодим, флуазифоп-бутил, глифосат, норфлуразон, пендиметалин, пиритиобак-натрий, трифлуксисульфурон, тепралоксидим, глюфосинат, флумиоксазин, тидиазурон; инсектициды для обработки хлопка: ацефат, алдикарб, хлорпирифос, циперметрин, дельтаметрин, абамектин, ацетамиприд, эмаектин бензоат, имидаклоприд, индоксакарб, лямбда-цигалотрин, спиносад, тиодикарб, гамма-цигалотрин, спиромезифен, пиридалил, флониамид, флубендиамид, трифлумурон, ринаксипир, бета-цифлутрин, спиротетрамат, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, динетофуран, флубендиамид, циазипир, спиносад, спиноторам, гамма-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тиодикарб, авермектин, флониамид, пиридалил, спиромезифен, сульфоксафлор; фунгициды для обработки

хлопка: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлороталонил, медь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, фенамидон, флуазинам, флуопирам, флуоксастробин, флуксапироксад, ипродион, изопиразам, изотианил, манкоцеб, манеб, метоминостробин, пентиопирад, пикоксистробин, пропинеб, протиоконазол, пираклостробин, квинтоцен, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для обработки сои: алахлор, бентазон, трифлуралин, хлоримурон-этил, клорансулам-метил, феноксапроп, фомесафен, флуазифоп, глифосат, имазамокс, имазахин, имазетапир, (S-)метолахлор, метрибузин, пендиметазид, тепралоксидим, глюфосинат; инсектициды для обработки сои: лямбда-цигалотрин, метомил, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, спиносад, спиноторам, эмаметин-бензоат, фипронил, этипрол, дельтаметрин, β -цифлутрин, гамма и лямбда цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил) метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, спиротетрамат, спинодифлофен, трифлумурон, флониамид, тиодикарб, бета-цифлутрин; фунгициды для обработки сои: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, хлорталонил, медь, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, флуазинам, флуопирам, флуоксастробин, флутриафол, флуксапироксад, изопиразам, ипродион, изотианил, манкоцеб, манеб, метконазол, метоминостробин, миклобутанил, пентиопирад, пикоксистробин, пропиконазол, пропинеб, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, тетраконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин; гербициды для обработки сахарной свеклы: хлоридазон, десмедифам, этофумесат, фенмедифам, триаллат, клопиралид, флуазифоп, ленацил, метамитрон, квинмерак, циклоксидим, трифлусульфурон, тепралоксидим, квизалофоп; инсектициды для обработки сахарной свеклы: имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, тиаклоприд, ацетамиприд, динетофуран, дельтаметрин, β -цифлутрин, гамма/лямбда-цигалотрин, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он, тефлутрин, ринаксипир, циаксипир, фипронил, карбофуран; гербициды для обработки канолы: клопиралид, диклофоп, флуазифоп, глюфосинат, глифосат, метазахлор, трифлуралин, этаметсульфурон, квинмерак, квизалофоп, клетодим, тепралоксидим; фунгициды для обработки канолы: азоксистробин, биксафен, боскалид, карбендазим, ципроконазол, дифеноконазол, димоксистробин, эпоксиконазол, флуазинам, флуопирам, флуоксастробин, флусилазол, флуксапироксад, ипродион, изопиразам, мепикват-хлорид, метконазол, метоминостробин, паклобутразол, пентиопирад, пикоксистробин, прохлораз, протиоконазол, пираклостробин, тебуконазол, тиофанат-метил, трифлуксистробин, винклозолин; инсектициды для обработки канолы: карбофуран, тиаклоприд, дельтаметрин, имидаклоприд, клотианидин, тиаметоксам, ацетамиприд, динетофуран, β -цифлутрин, гамма и лямбда цигалотрин, тау-флувалериат, этипрол, спиносад, спиноторам, флубендиамид, ринаксипир, циазипир, 4-[[[(6-хлорпиридин-3-ил)метил](2,2-дифторэтил)амино]фуран-2(5H)-он.

Следующие примеры приведены исключительно в качестве примера и не являются ограничительными.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспрессия Cry14Aa1 в сое

События сои, экспрессирующие Cry14Aa1 (SEQ ID NO: 3), были разработаны посредством агробактериальной трансформации растений сои Thorne с использованием конструкта, содержащего ген, кодирующий ген, устойчивый к гербицидам-ингибиторам белка 4-гидроксифенилпируват диоксигеназы (HPPD) (описано в WO2014043435) и Cry14Aa1. Соя Thorne дикого типа служила в качестве контрольных растений без устойчивости к нематод. Cry14Aa1, экспрессируемый в растениях сои, уменьшает количество *Pratylenchus brachyurus*, размножающихся в корнях, по сравнению с растениями дикого типа. Один и тот же результат был неизменно получен для трех независимых линий событий – при нескольких повторных тестированиях наблюдалось снижение количества нематод. Для всех трех событий количество нематод уменьшалось на 60-85%.

Пример 2. Экспрессия Cry14Ab1 в сое

События сои EE-GM4, экспрессирующие Cry14Ab1 (SEQ ID NO: 4), были разработаны посредством агробактериальной трансформации растений сои Thorne с использованием конструкта, содержащего ген, кодирующий ген, устойчивый к гербицидам-ингибиторам белка 4-гидроксифенилпируват диоксигеназы (HPPD) (описано в WO2014043435) и Cry14Ab1. Соя Thorne дикого типа служила в качестве контрольных растений без устойчивости к нематод. Cry14Ab1, экспрессируемый в растениях сои, уменьшает количество *Pratylenchus brachyurus*, размножающихся в корнях, по сравнению с растениями дикого типа. Осуществляли проращивание нетрансформированных семян Thorne и EE-GM4, затем они были посажены в теплице для проверки эффективности борьбы с ранящей нематодой, *Pratylenchus brachyurus*. Нематоды *Pratylenchus brachyurus* переносили на растения в возрасте 2 недель (1500 нематод на растение, на различных стадиях развития). Через тридцать дней после их перенесения нематоды *Pratylenchus* извлекали из корней и подсчитывались. Среднее количество нематод, обнаруженных в корнях растений, содержащих EE-GM4, сравнивали со средним количеством нематод *Pratylenchus*, обнаруженных в корнях растения Thorne дикого типа. В среднем количество нематод *Pratylenchus*, обнаруженных в корнях растений, содержащих EE-GM4, было приблизительно на 80-90% меньше по сравнению с количеством нематод, обнаруженных в корнях контрольного растения Thorne, что свидетельствует о значительной эффективности борьбы с ранящими нематодами для события сои EE-GM4.

На Фиг. 1 показаны результаты тепличного анализа устойчивости к *Pratylenchus brachyurus* в США, в котором сравниваются 5 элитных линий сои с EE-GM4 (одна линия чувствительная к SCN (MG1), одна линия устойчивая к SCN (PI88788, MG 3), одна линия чувствительная к SCN (MG 6.2), одна линия устойчивая к SCN (Пекин, MG 6.2) и одна линия чувствительная к SCN (MG 9) с американскими линиями сои как чувствительными к SCN, так и устойчивыми к SCN. Растения сои выращивали в маленьких конических горшочках в теплицах с температурой 25 - 32 ° C. Нематоды *Pratylenchus brachyurus*, полученные из Южной Каролины и выращенные в теплице, использовали для инокуляции растений на стадии развития V2-V3. Осуществляли инокуляцию приблизительно 1500 яиц + взрослых особей на растение, и каждая запись включала 5 растений. Через тридцать дней

после заражения нематоды и яйца извлекали из корней и подсчитывались. Для каждой записи проводили два независимых эксперимента. В то время как для американских линий сои восприимчивых к SCN и устойчивых к SCN уменьшения зараженности *Pratylenchus* не наблюдалось, для растений с EE-GM4 наблюдалось уменьшение зараженности *Pratylenchus* приблизительно на 85%.

На Фиг. 2 показаны результаты тепличного анализа *Pratylenchus brachyurus* в Бразилии, в котором сравниваются растения сои с EE-GM4 с бразильскими линиями сои без устойчивости и 1 линией с низким Rf, а также с растениями, чувствительными и устойчивыми к SCN. Линии сои выращивали в маленьких конических горшочках в теплицах с температурой 25 - 32 ° C. Нематоды *Pratylenchus brachyurus*, полученные из Бразилии и выращенные в теплице, использовали для инокуляции растений на стадии развития V2-V3. Осуществляли инокуляцию приблизительно 1000 яиц + взрослых особей на растение, и каждая запись включала 5 растений. Через тридцать дней после заражения нематоды и яйца извлекали из корней и подсчитывались. Ниже представлены результаты одного эксперимента. Для одной бразильской линии сои (BRS 7380), которая была обозначена как линия с низким репродуктивным фактором для *Pratylenchus*, наблюдалось снижение зараженности *Pratylenchus* приблизительно на ~ 89%. Для растений с EE-GM4 наблюдалось снижение зараженности *Pratylenchus* приблизительно на ~97%. Для линий сои, имеющих нативную устойчивость к SCN (*rhg1* + *Rhg4*), снижение зараженности *Pratylenchus brachyurus* не наблюдалось.

Кроме того, растения, содержащие EE-GM4, могут использоваться для борьбы с клубеньковыми нематодами (RKN), такими как *Meloidogyne incognita*. Несмотря на то, что степень заражения сои Thorne дикого типа популяцией *Meloidogyne incognita* является невысокой, растения Thorne с EE-GM4 в среднем показывают дополнительное снижение количества яиц RKN относительно массы корня по сравнению с нетрансформированными растениями Thorne.

Пример 3. Векторизация генов для экспрессии в растениях

Кодирующие области согласно изобретению связаны с соответствующими промоторными и терминаторными последовательностями для экспрессии в растениях. Такие последовательности известны специалистам. Методы получения и проверки промоторных, генных и терминаторных конструктов также известны специалистам.

В соответствии с одним аспектом изобретения осуществляется конструирование и получение синтетических последовательностей ДНК. Эти синтетические последовательности имеют измененную нуклеотидную последовательность относительно родительской последовательности, но кодируют белки, которые существенно идентичны родительской последовательности. В некоторых вариантах осуществления синтетическая последовательность ДНК содержит SEQ ID NO: 3 или 4.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения модифицированные версии синтетических генов сконструированы таким образом, что полученный пептид нацелен в органеллу растения, такую как эндоплазматическая сеть или апопласт. Специалистам известны пептидные последовательности, обеспечивающие нацеливание белков слияния в органеллы растений.

Например, специалистам известно, что N-концевая область гена кислой фосфатазы из люпина белого *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller *et al.* (2001) *Plant Physiology* 127: 594-606) обеспечивает нацеливание гетерологичных белков в эндоплазматический ретикулум. Если полученный белок слияния также содержит последовательность удержания в эндоплазматическом ретикулуме, содержащую пептид N-конец-лизин-аспарагиновая кислота-глутаминовая кислота-лейцин (то есть мотив «KDEL», SEQ ID NO: 7) на С-конце, белок слияния будет нацелен в эндоплазматический ретикулум. Если в белке слияния отсутствует последовательность нацеливания в эндоплазматический ретикулум на С-конце, белок слияния будет нацелен в эндоплазматический ретикулум, однако окончательно он будет секвестрирован в апопласте.

Таким образом, этот ген кодирует белок слияния, который содержит N-концевую последовательность длиной 31 аминокислот гена кислой фосфатазы из White Lupin *Lupinus albus* (GENBANK® ID GI:14276838, Miller *et al.*, 2001, *выше*), которая слита с N-концом аминокислотной последовательности согласно изобретению, а также с последовательностью KDEL (SEQ ID NO: 7) на С-конце. Таким образом, предполагается, что полученный белок будет нацелен в эндоплазматический ретикулум растения при экспрессии в клетке растения.

Кассеты экспрессии растений, описанные выше, комбинируют с соответствующим селективируемым маркером растений, чтобы способствовать отбору трансформированных клеток и тканей, и лигируют в векторы для трансформации растений. Такие векторы могут включать бинарные векторы для агробактериальной трансформации или простые плазмидные векторы для аэрозольной или биолистической трансформации.

В настоящем изобретении кассета экспрессии, включающая синтетический ген, кодирующий Cry14A (SEQ ID NO: 1 или 2), функционально связана с областью промотора гена сахарозсинтазы 1 *Oryza sativa* (Wang *et al.* (1992) *Plant Molecular Biology*, 19, 881-885) или с промоторной областью транскрипта вируса мозаики цветной капусты 35S (Odell *et al.* (1985) *Nature* 313, 810-812) и лидерной последовательностью гена связывающего хлорофилл a/b белка *Petunia hybrid* (Harpster *et al.* (1988) *Molecular and General Genetics* 212, 182-190). Кассеты экспрессии также содержали 3'-нетранслируемую область гена нопалинсинтазы из Т-ДНК pTiT37 (Depicker *et al.* (1982) *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1, 561-573), функционально связанную с 3'-концом последовательности Cry14.

Пример 4: Трансформация сои

Трансформация растений сои достигается с использованием способов, известных специалистам, таких как трансформация с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и эксплантов (половинчатых семян сои), в основном, с помощью способа, описанного Paz *et al.* (2006), *Plant cell Rep.* 25:206. Трансформанты идентифицируются с использованием темботриона в качестве маркера отбора. При появлении молодых ростков производили их визуальное обследование, а результаты были документально зафиксированы в качестве показателя устойчивости к гербициду изоксафлютолу или темботриону. Ростки устойчивых трансгенных растений будут иметь нормальный зеленый цвет, сравнимый с необработанными изоксафлютолом или темботрионом ростками растений сои дикого типа, в то время как обработанные таким же количеством изоксафлютола или темботриона ростки растений сои дикого типа будут полностью

обесцвеченными. Это указывает на то, что присутствие белка HPPD придаст устойчивость к гербицидам-ингибиторам HPPD, таким как изоксафлютол или темботрион.

Молодые ростки растений с устойчивостью затем пересаживаются в среду для укоренения или прививаются. После акклиматизационного периода укорененные всходы растений пересаживаются в теплицу. Затем производили опрыскивание растений, содержащих трансген, гербицидом-ингибитором HPPD, таким как, например, темботрион, при дозе внесения 100 г активного вещества/га или мезотрионом при дозе внесения 300 г активного вещества/га с добавлением сульфата аммония и метилового эфира рапсового масла. По прошествии десяти дней после обработки, производили оценку симптомов, вызванных обработкой гербицидом, и сравнение с симптомами, наблюдаемыми на растениях дикого типа в таких же условиях.

Пример 5: Получение и отбор T0 растений хлопка.

Трансформация растений хлопка достигается с использованием способов, известных в технологии, особенно предпочтительным является способ, описанный в опубликованной патентной заявке согласно PCT WO 00/71733. Регенерированные растения переносятся в теплицу. После акклиматизационного периода достаточно развитые растения проходили обработку гербицидами-ингибиторами HPPD, такими как, например, эквивалент темботриона, при дозе внесения 100 г активного вещества/га или 200 г активного вещества/га с добавлением сульфата аммония и метилового эфира рапсового масла. По прошествии семи дней после опрыскивания, симптомы, вызванные обработкой гербицидом, оценивали и сравнивали с симптомами, наблюдаемыми на растениях хлопка дикого типа, прошедшими такую же обработку в таких же условиях.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение. Все патентные заявки и публикации, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и отдельно указано, что каждая патентная заявка и публикация отдельно и независимо друг от друга включены в настоящий документ посредством ссылки.

Несмотря на то, что для изобретения приведено иллюстративное описание в качестве примера и для ясности понимания, очевидно, что в рамках объема прилагаемой формулы изобретения могут вноситься определенные изменения и модификации.

Формула изобретения

1. Способ борьбы с популяцией вредителей нематод рода *Pratylenchus*, включающий контактирование указанной популяции с нематоцидно-эффективным количеством полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, причем указанный полипептид обладает нематоцидной активностью в отношении популяции вредителей нематод рода *Pratylenchus*.

2. Способ по п. 1, причем вредителями рода *Pratylenchus* являются *Pratylenchus brachyurus*.

3. Способ по п. 1 или 2, причем указанным растением является соя.

4. Способ защиты растения от популяции вредителей нематод рода *Pratylenchus*, включающий экспрессию в растении или в клетке растения нуклеотидной последовательности, функционально связанной с промотором, способным вызывать экспрессию нуклеотидной последовательности в клетке растения, причем указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из:

- a) нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 или 4; и
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, причем указанный полипептид обладает нематоцидной активностью в отношении вредителей нематод рода *Pratylenchus*.

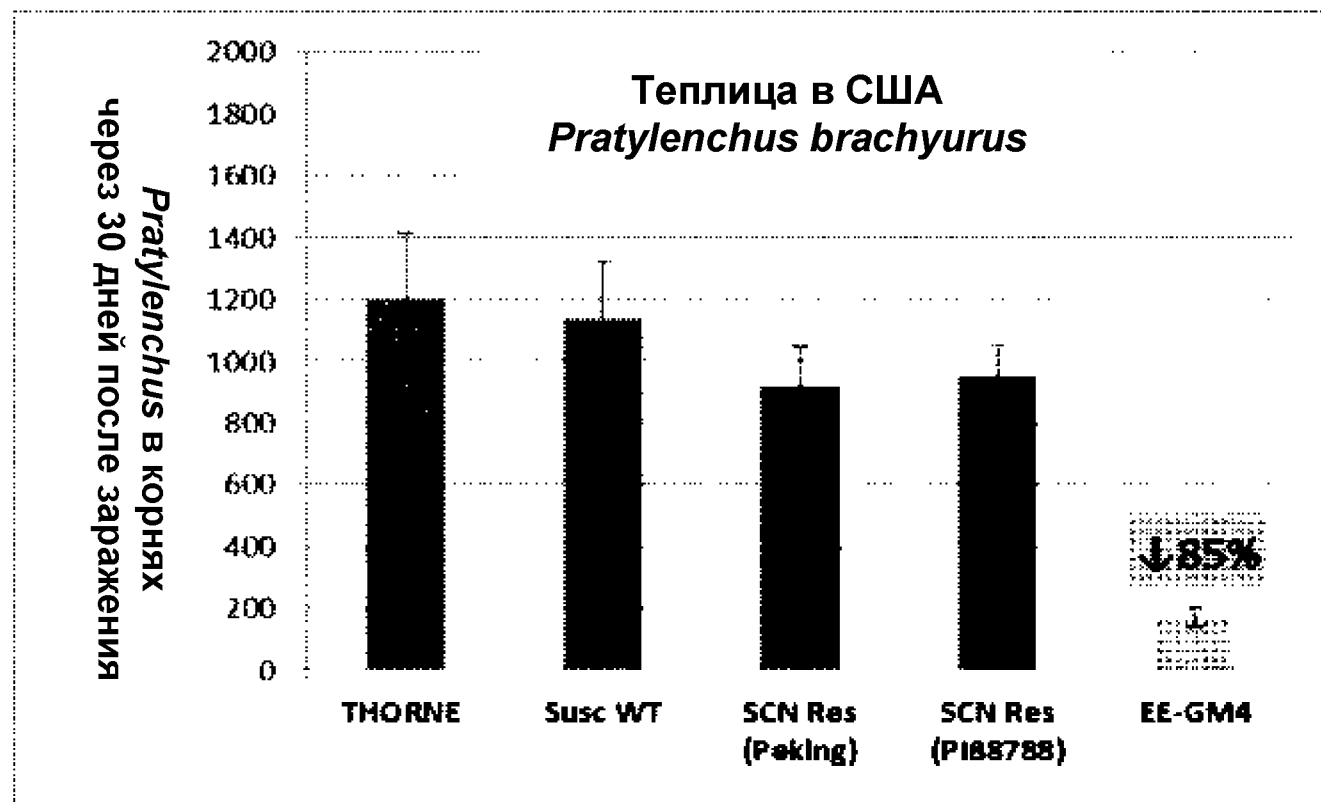
5. Способ увеличения урожайности растений, включающий выращивание на поле растения или его семени, в геном которого стабильно встроен ДНК-конструкт, содержащий нуклеотидную последовательность, функционально связанную с промотором, способным вызывать экспрессию нуклеотидной последовательности в клетке растения, причем указанную нуклеотидную последовательность выбирают из группы, состоящей из:

- a) нуклеотидной последовательности, представленной SEQ ID NO: 3 или 4; и
- b) нуклеотидной последовательности, которая кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 95 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или 2, причем указанный полипептид обладает нематоцидной активностью в отношении вредителей нематод рода *Pratylenchus*;

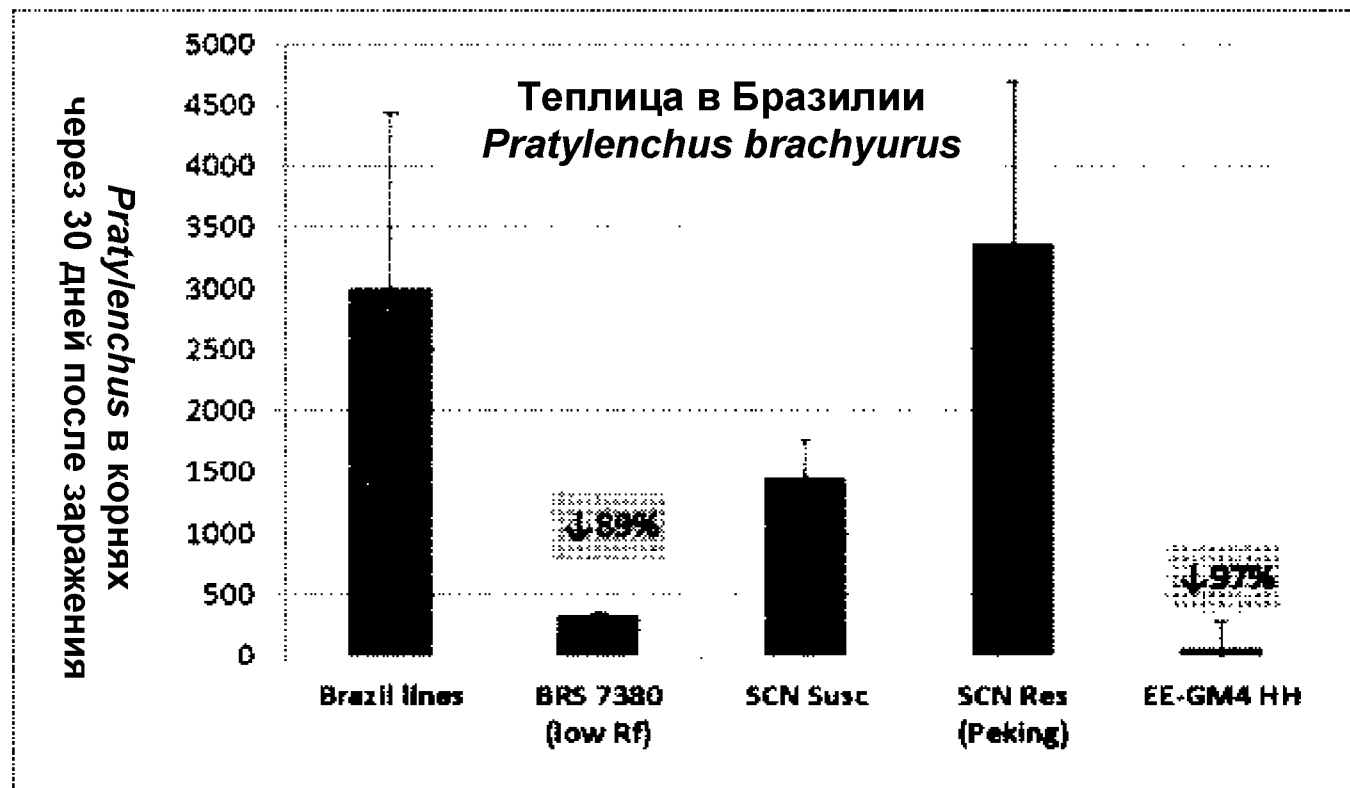
причем указанное поле заражено вредителями нематодами рода *Pratylenchus*.

6. Способ по п. 5, причем вредителями рода *Pratylenchus* являются *Pratylenchus brachyurus*.

7. Способ по пп. 4 - 6, причем указанное растение дополнительно содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих один или более инсектицидных токсинов.



Фиг. 1



Фиг. 2