

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037539**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.09**

**(21)** Номер заявки  
**201890136**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.04.27**

**(51)** Int. Cl. **C07K 14/325** (2006.01)  
**C12N 15/32** (2006.01)  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12N 5/04** (2006.01)  
**A01H 5/00** (2006.01)

---

**(54) МОЛЕКУЛА НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ИНСЕКТИЦИДНЫХ СВОЙСТВ У РАСТЕНИЙ**

---

**(31)** 62/184,227

**(32)** 2015.06.24

**(33)** US

**(43)** 2018.06.29

**(86)** PCT/US2016/029424

**(87)** WO 2016/209360 2016.12.29

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЗИНГЕНТА ПАРТИСИПЕЙШНС АГ  
(CH)**

**(56)** US-A1-20120174267

US-A1-20050039226

US-A1-20110151441

HIBBARD et al., Mortality impact of Bt transgenic maize roots expressing eCry3.1Ab, mCry3A and eCry3.1Ab plus mCry3A on western corn rootworm larvae in the field J Econ Entomol. October 2011, Vol 104, No 5, pp 1584-91 Especially abstract

WO-A1-2015056080

**(72)** Изобретатель:  
**Митгендорф Фолькер, Конвилл  
Джаред, Хипскинд Джон Даниел,  
Азхаканандам Касималай, Ноэ  
Эндрью, Фэй Сяонь, Донахью  
Кевин В. (US)**

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

---

**(57)** Изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая при введении в клетку обеспечивает экспрессию инсектицидных белков mCry3A и eCry3.1Ab.

---

**B1**

**037539**

**037539**

**B1**

### Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент № 62/184227, поданной 24 июня 2015 г. и включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### Заявление об электронной подаче перечня последовательностей

Перечень последовательностей в текстовом формате ASCII, предоставленный в соответствии с 37 C.F.R. § 1.821, под названием "80823\_ST25.txt", размером 30 килобайт, созданный 21 апреля 2016 г. и поданный с помощью EFS-Web, представлен вместо бумажной копии. Данный перечень последовательностей тем самым включен посредством ссылки в описание данного документа для его раскрытия.

### Область техники изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая при введении в клетку обеспечивает экспрессию инсектицидных белков mCry3A и eCry3.1Ab.

### Предпосылки изобретения

Вредители растений являются главным фактором потери урожая важных мировых сельскохозяйственных культур. Виды кукурузных жуков рассматриваются как наиболее пагубные вредители кукурузы. Важные виды кукурузных жуков-вредителей включают *Diabrotica virgifera virgifera*, западный кукурузный жук; *D. longicornis barberi*, северный кукурузный жук, *D. undecimpunctata howardi*, южный кукурузный жук, и *D. virgifera zeaе*, мексиканский кукурузный жук.

С кукурузным жуком борются, главным образом, путем интенсивного внесения химических пестицидов. Таким образом, можно достичь хорошего контроля кукурузного жука, но эти химикаты также могут иногда действовать на полезные организмы. Другой проблемой, возникающей в результате широкого применения химических пестицидов, является возникновение устойчивых видов насекомых. Это частично ослаблялось с помощью различных практик управления устойчивостью, но существует возрастающая необходимость в альтернативных стратегиях контроля вредителей. Одна такая альтернатива включает экспрессию чужеродных генов, кодирующих инсектицидные белки в трансгенных растениях. Этот подход обеспечил эффективные средства защиты против выбранных насекомых-вредителей, и были запущены в производство трансгенные растения, экспрессирующие инсектицидные токсины, позволяя фермерам уменьшить применение химических инсектицидов.

Cry-белки *Bacillus thuringiensis* (Bt) (также называемые 5-эндотоксины) представляют собой белки, которые формируют кристаллический матрикс в *Bacillus*, которые, как известно, обладают инсектицидной активностью при поглощении определенными насекомыми. Гены, кодирующие Cry-белки, были выделены, а их экспрессия в сельскохозяйственных культурах, как было показано, обеспечивала другой инструмент для контроля важных с экономической точки зрения насекомых-вредителей. Такие трансгенные растения, экспрессирующие Cry-белки, были коммерциализированы, давая возможность фермерам уменьшать или увеличивать применения химических средств контроля насекомых. Активные в отношении жесткокрылых Cry-белки, пригодные для трансгенных растений, включают, например, Cry3A, Cry3B и комплекс Cry34/Cry35.

Хотя применение трансгенных растений, экспрессирующих Cry-белки, является другим инструментом в комплексе мер по контролю насекомых, оно все еще подвержено нарушению устойчивости. Известны насекомые-вредители, которые в настоящее время характеризуются устойчивостью к Cry-белкам, экспрессируемым в определенных трансгенных растениях. Стратегия по снижению шансов нарушения устойчивости представляет собой "пакетирование" трансгенных признаков с различными механизмами действия в отношении некоторых видов насекомых-вредителей в отдельном растении. В настоящее время трансгенные признаки часто "пакетируют" путем селекции и последующего скрининга с целью получения нескольких трансгенных признаков в одной коммерческой идиоплазме. Эти стадии селекции и скрининга требуются для каждой разновидности идиоплазмы, в которую необходимо ввести эти два признака. Для многих агрономически важных культур, таких как кукуруза, эти два признака необходимо поддерживать в виде гибридов для десятков разновидностей идиоплазмы. Кроме того, факторы, такие как сцепление генов нежелательных признаков или генетическая рекомбинация, могут осложнять введение двух признаков из двух различных локусов в одну разновидность идиоплазмы. Таким образом, было бы предпочтительным получить молекулу нуклеиновой кислоты, которая несет несколько инсектицидных признаков и которую можно ввести в один локус в геноме трансгенного растения.

### Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 1. В настоящем изобретении также предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, химерная молекула нуклеиновой кислоты и/или конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектор, которые содержат, состоят из или состоят главным образом из SEQ ID NO: 1. В настоящем изобретении также предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, химерная молекула нуклеиновой кислоты и/или конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектор, которые содержат, состоят из или состоят главным образом из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на

98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предусмотрено применение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанной в данном документе, где экспрессия указанной молекулы нуклеиновой кислоты в клетке обеспечивает улучшенные инсектицидные свойства.

В настоящем изобретении также предусмотрена трансгенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанную в данном документе. Трансгенная клетка-хозяин, описанная выше, может представлять собой любую подходящую прокариотическую или эукариотическую клетку, например бактериальную клетку или растительную клетку. В иллюстративных вариантах осуществления трансгенная бактериальная клетка может представлять собой клетку *Escherichia coli*, *Bacillus* (например, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*; *B. cereus* и т.п.), *Agrobacterium ssp.* или *Pseudomonas ssp.* Трансгенная растительная клетка может находиться в трансгенном растении, части растения, ткани растения или культуре растительных клеток. Трансгенное растение может быть однодольным или двудольным растением. Трансгенное растение может представлять собой виды растений, в том числе без ограничения маис, сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные, овес, газонную траву, пастбищную траву, разновидности перца, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарный тростник, сахарную свеклу, табак, ячмень или масличный рапс.

В настоящем изобретении также предусмотрено потомство трансгенного растения любого поколения, где указанное трансгенное растение содержит молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанную в данном документе. В настоящем изобретении также предусмотрены трансгенное семя и трансгенная пропaгула из указанного трансгенного растения.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий введение в растение молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанной в данном документе, с получением таким образом трансгенного растения, где молекула нуклеиновой кислоты способна экспрессировать гены *mCry3A* и *eCry3.1Ab* в количестве, которое обеспечивает улучшенную инсектицидную активность.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии (a) получения молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанной в данном документе; (b) введения в растение, культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты из стадии (a) с получением трансформированного растения, культуры трансформированных тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и (c) выращивания указанного трансформированного растения или обеспечения регенерации трансформированного растения из культуры трансформированных тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом растения с улучшенными инсектицидными свойствами. В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения трансгенного семени из трансгенного растения, описанного выше, где растение культивируют или выращивают в подходящих условиях с получением семени потомства, которое является трансгенным.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения потомства фертильного трансгенного растения любого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии (a) получения фертильного трансгенного растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанную в данном документе; (b) сбора трансгенного семени от указанного трансгенного растения; (c) посадки собранного трансгенного семени и (d) выращивания трансгенных растений, являющихся потомством, из указанного семени, где указанное потомство характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами по сравнению с нетрансформированным растением.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии (a) полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где указанное первое или второе родительское растение представляет собой трансгенное растение, содержащее молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанную в данном документе; и (b) отбора растения-потомка первого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами. В иллюстративных вариантах осуществления способ получения растения с улучшенными инсектицидными свойствами предусматривает стадии (a) и (b), описанные выше, и необязательно стадию (c) обеспечения самоопыления растения-потомка первого поколения с получением таким образом множества растений-потомков второго поколения; и стадию (d) отбора из растений-потомков второго поколения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, где растения-потомки второго поколения содержат молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанную в данном документе.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлен бинарный вектор 17629, последовательность нуклеиновой кислоты которого представляет собой SEQ ID NO: 2.

#### **Краткое описание последовательностей в перечне последовательностей**

SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты трансгена и содержит кассеты экспрессии, содержащие последовательности, кодирующие *mCry3A* и *eCry3.1Ab*.

SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты бинарного вектора 17629.

### Подробное описание изобретения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной методикой, протоколами, линиями клеток, видами или родами растений, конструкциями и реагентами как таковыми, описанными в данном документе. Следует также понимать, что терминология, применяемая в данном документе, представлена исключительно с целью описания конкретных вариантов осуществления, а не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который будет ограничиваться лишь прилагаемой формулой изобретения. Необходимо отметить, что, как используется в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "растение" является ссылкой на одно или несколько растений и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области, и т.д. Как используется в данном документе, слово "или" означает любой элемент из конкретного перечня, а также включает любую комбинацию элементов из такого перечня (то есть включает также "и").

Применяемый в данном документе термин "приблизительно" означает примерно, ориентировочно, около или в районе. Если термин "приблизительно" применяется в сочетании с числовым диапазоном, он модифицирует этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных численных значений. В целом, применяемый в данном документе термин "приблизительно" модифицирует численное значение выше и ниже указанного значения путем отклонения на 20%, предпочтительно 10% вверх или вниз (больше или меньше). Что касается температуры, термин "приблизительно" означает  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Если термин "приблизительно" применяется в контексте настоящего изобретения (например, в комбинациях с температурой или значениями молекулярной массы), предпочтительным является точное значение (то есть без "приблизительно").

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

Единицы, префиксы и символы могут обозначаться в их форме, принятой в SI. Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записаны слева направо в ориентации 5'-3'; аминокислотные последовательности записаны слева направо в ориентации от amino- к карбоксиконцу соответственно. Числовые диапазоны включают числа, определенные в диапазоне. Аминокислоты в данном документе могут быть обозначены либо их общеизвестными трехбуквенными символами, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогичным образом, нуклеотиды могут быть обозначены по их общепринятым однобуквенным кодам. Термины, определенные ниже, более полно определены посредством ссылки на описание изобретения в целом.

"сDNA" относится к однонитевой или двунитевой ДНК, которая происходит из mRNA и комплементарна ей. Термины "матричная РНК" или "mRNA" относятся к РНК, которая не содержит интронов и которая может транслироваться клеткой в белок.

Термины "белок", "пептид" и "полипептид" применяются в данном документе взаимозаменяемо.

"Контрольное растение" или "контроль", как используется в данном документе, могут представлять собой в данном документе нетрансгенное растение родительской линии, применяемое для получения трансгенного растения. Контрольное растение в некоторых случаях может представлять собой трансгенную растительную линию, содержащую пустой вектор или маркерный ген, но не содержащую рекомбинантный полинуклеотид по настоящему изобретению, который экспрессируется в трансгенном растении, подлежащем оценке. В других случаях контрольное растение представляет собой трансгенное растение, экспрессирующее ген с конститутивным промотором. Как правило, контрольное растение представляет собой растение той же линии или сорта, что и трансгенное растение, подлежащее тестированию, не содержащее придающей признак специфической рекомбинантной ДНК, характеризующей трансгенное растение. Такое исходное растение, не содержащее такой придающей признак специфической рекомбинантной ДНК, может представлять собой встречающееся в природе растение, растение дикого типа, элитное, нетрансгенное растение или трансгенное растение без придающей признак специфической рекомбинантной ДНК, характеризующей трансгенное растение. Исходное растение, не содержащее придающей признак специфической рекомбинантной ДНК, может представлять собой сибс трансгенного растения, содержащего придающую признак специфическую рекомбинантную ДНК. Такой сибс исходного растения может содержать другую рекомбинантную ДНК.

Как используется в данном документе, термин "кукуруза" означает *Zea mays* или маис и включает все сорта растений, которые можно скрещивать с кукурузой, включая виды дикого маиса.

"Доставлять" или "доставка" композиции или токсина означает, что композиция или токсин вступает в контакт с насекомым, что приводит к токсическому действию и контролю насекомого. Данную композицию или токсин можно доставлять многими признанными способами, например орально путем по-

глощения насекомым при посредстве экспрессии в трансгенном растении, составленной белковой композиции(ий), распыляемой белковой композиции(ий), матрицы с приманкой или любой другой признанной в настоящем уровне техники системы доставки токсина.

"Контролировать" или "контроль" насекомых означает подавлять посредством токсического действия способность насекомых-вредителей выживать, расти, питаться и/или размножаться или ограничивать связанное с насекомыми повреждение или потерю сельскохозяйственных культур. "Контроль" насекомых может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя предпочтительно означает уничтожение насекомых.

"Эффективное для контроля насекомых количество" означает ту концентрацию токсина или токсинов, которая подавляет посредством токсического действия способность насекомых выживать, расти, питаться и/или размножаться или ограничивает связанное с насекомыми повреждение или потерю сельскохозяйственных культур. "Эффективное для контроля насекомых количество" может означать или может не означать уничтожение насекомых, хотя предпочтительно оно означает уничтожение насекомых. "Инсектицидной" называют токсичную биологическую активность, способную к контролю насекомых, предпочтительно путем их уничтожения. Трансгенное растение с "улучшенными инсектицидными свойствами" представляет собой растение, которое экспрессирует белок или белки в эффективном для контроля насекомых количестве, при этом в некоторых вариантах осуществления растение является инсектицидным по отношению к широкому спектру видов насекомых по сравнению с растением того же вида, которое является не трансформированным. Такой широкий спектр видов насекомых включает насекомых-вредителей растений, таких как жесткокрылые насекомые-вредители, в том числе виды кукурузного жука. Важные виды кукурузных жуков-вредителей включают *Diabrotica virgifera virgifera*, западный кукурузный жук; *D. longicornis barberi*, северный кукурузный жук, *D. undecimpunctata howardi*, южный кукурузный жук, и *D. virgifera zeaе*, мексиканский кукурузный жук. Трансгенное растение с улучшенными инсектицидными свойствами может проявлять устойчивость к заражению кукурузным жуком.

Термин "полинуклеотид" включает ссылку на дезоксирибополинуклеотид, рибополинуклеотид или их аналоги, характеризующиеся основным свойством природного рибонуклеотида в том отношении, что они гибридизируются, при жестких условиях гибридизации, с практически такой же нуклеотидной последовательностью, что и встречающиеся в природе нуклеотиды, и/или обеспечивают трансляцию с получением такой(таких) же аминокислоты(аминокислот), что и встречающийся(встречающиеся) в природе нуклеотид(нуклеотиды). Полинуклеотид может быть полноразмерным или представлять собой подпоследовательность нативного или гетерологичного структурного или регуляторного гена. Если не указано иное, термин включает ссылку на определенную последовательность, а также ее комплементарную последовательность. Таким образом, молекулы ДНК или РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам, представляют собой "полинуклеотиды", как подразумевает выражение в данном документе. Более того, применяемый в данном документе термин "полинуклеотиды" включает молекулы ДНК или РНК, содержащие нетипичные основания, как например инозин, или модифицированные основания, такие как триптированные основания, названные в качестве лишь двух примеров. Следует понимать, что большое разнообразие модификаций было произведено в отношении ДНК и РНК, которые служат для многих полезных целей, известных специалистам в данной области. Термин "полинуклеотид" в контексте, используемом в данном документе, охватывает такие химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, а также химически синтезированные формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, включая, среди прочего, простые и сложные клетки.

Термин "рекомбинантный" включает ссылку на клетку или вектор, которые были модифицированы с помощью введения гетерологичной нуклеиновой кислоты, или на то, что клетка происходит от клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в идентичной форме в нативной (нерекомбинантной) форме клетки или экспрессируют нативные гены, которые иным образом аномально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или вообще не экспрессируются в результате преднамеренного вмешательства человека или могут характеризоваться сниженной или устраненной экспрессией нативного гена. Как используется в данном документе, термин "рекомбинантный" не охватывает изменение клетки или вектора посредством естественных событий (например, спонтанной мутации, естественной трансформации/трансдукции/транспозиции), таких как возникающие без преднамеренного вмешательства человека.

Как используется в данном документе, термин "химерная конструкция", "химерный ген", "химерный полинуклеотид" или "химерная молекула нуклеиновой кислоты" (или подобные термины) относится к конструкции или молекуле, содержащей два или более полинуклеотидов разного происхождения, собранных в одну молекулу нуклеиновой кислоты. Термин "химерная конструкция", "химерный ген", "химерный полинуклеотид" или "химерная нуклеиновая кислота" относится к любой конструкции или молекуле, которая содержит (1) полинуклеотиды (например, ДНК), в том числе регуляторные и кодирующие полинуклеотиды, которые вместе не встречаются в природе (то есть по меньшей мере один из полинуклеотидов является гетерологичным по отношению по меньшей мере к одному из его других полинуклеотидов), или (2) полинуклеотиды, кодирующие части белков, не связанные в природе, или (3) части

промоторов, которые не связаны в природе. Кроме того, химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из разных источников, или могут содержать регуляторные полинуклеотиды и кодирующие полинуклеотиды, полученные из одного и того же источника, но расположенные иным способом, чем встречающийся в природе. В предпочтительном аспекте настоящего изобретения химерная конструкция, химерный ген, химерный полинуклеотид или химерная нуклеиновая кислота содержат каскету экспрессии, содержащую полинуклеотиды по настоящему изобретению под контролем регуляторных полинуклеотидов, в частности под контролем регуляторных полинуклеотидов, функционирующих в растениях.

Термин "хромосома" применяется в данном документе в качестве общепризнанного в данной области техники для обозначения самореплицирующейся генетической структуры в клеточном ядре, содержащей клеточную ДНК и несущей линейный массив генов.

"Кодирующий полинуклеотид" представляет собой полинуклеотид, который транскрибируется в РНК, такую как mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, смысловая РНК или антисмысловая РНК. Предпочтительно РНК затем транслируется в организме с продукцией белка. Она может представлять собой "непрерывающийся кодирующий полинуклеотид", т.е. не иметь интрона, такого как в cDNA, или он может содержать один или несколько интронов, связанных при помощи соответствующих границ сплайсинга. "Интрон" представляет собой поли(рибо)нуклеотид, который содержится в первичном транскрипте, но который удаляется посредством расщепления и повторного лигирования РНК в клетке с получением зрелой mRNA, которая может быть транслирована в белок.

Термин "экспрессия" при применении со ссылкой на полинуклеотид, такой как ген, ORF или ее часть, или трансген в растениях, относится к процессу преобразования генетической информации, кодируемой геном, в РНК (например, mRNA, rRNA, tRNA или snRNA) посредством "транскрипции" гена (т.е. за счет ферментативного действия РНК-полимеразы), и в белок, если применимо (например, если ген кодирует белок), посредством "трансляции" mRNA. Экспрессия гена может регулироваться на многих стадиях в ходе этого процесса. Например, в случае антисмысловых конструкций или конструкций dsRNA соответственно экспрессия может относиться к транскрипции только антисмысловой РНК или только dsRNA. В вариантах осуществления "экспрессия" относится к транскрипции и устойчивому накоплению смысловой (mRNA) или функциональной РНК. "Экспрессия" может также относиться к продукции белка.

Как используется в данном документе, термин "касета экспрессии" означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией определенного полинуклеотида или полинуклеотидов в соответствующей клетке-хозяине, содержащую промотор, функционально связанный с представляющими интерес полинуклеотидом или полинуклеотидами, который(которые) функционально связан(связаны) с сигналами терминации. Она также, как правило, содержит полинуклеотиды, необходимые для надлежащей трансляции представляющих интерес полинуклеотида или полинуклеотидов. Касета экспрессии также может содержать полинуклеотиды, которые не требуются для управления экспрессией представляющего интерес полинуклеотида, но которые присутствуют из-за соответствующих сайтов рестрикции для извлечения кассеты из вектора экспрессии. Касета экспрессии, содержащая представляющий(представляющие) интерес полинуклеотид(полинуклеотиды), может быть химерной, что означает, что по меньшей мере один из ее компонентов является гетерологичным по отношению по меньшей мере к одному из ее других компонентов. Касета экспрессии может также представлять собой последовательность, которая встречается в природе, но была получена в рекомбинантной форме, пригодной для гетерологичной экспрессии. Тем не менее, как правило, касета экспрессии является гетерологичной по отношению к хозяину, то есть определенный полинуклеотид кассеты экспрессии не встречается в природе в клетке-хозяине, и его необходимо было ввести в клетку-хозяина или предка клетки-хозяина при помощи процесса трансформации, известного в данной области техники. Экспрессия полинуклеотида(полинуклеотидов) в касете экспрессии обычно находится под контролем промотора. В случае многоклеточного организма, такого как растение, промотор может также быть специфичным или предпочтительным по отношению к конкретной ткани, или органу, или стадии развития. После трансформации в растение касета экспрессии или ее фрагмент также могут называться "вставленным полинуклеотидом" или "полинуклеотидом вставки".

"Ген" определяется в данном документе как единица наследственности, состоящая из полинуклеотида, который занимает определенное местоположение в хромосоме и который содержит генетическую инструкцию для определенной характеристики или признака, свойственных организму или такую единицу наследственности из группы гетерологичных организмов в зависимости от контекста.

Все термины "генная инженерия", "трансформация" и "генетическая модификация" применяются в данном документе в качестве синонимов для переноса выделенных и клонированных генов в ДНК, обычно хромосомную ДНК или геном другого организма.

"Трансген" относится к гену, полинуклеотиду или нуклеиновой кислоте, введенным в геном организма при помощи генетической манипуляции с целью изменения его генотипа. Трансгены могут включать, например, гены, полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, которые являются либо гетерологич-

ными, либо гомологичными определенному растению, подлежащему трансформации. Кроме того, трансгены могут содержать нативные гены, вставленные в ненативный организм, или химерные гены, полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты.

Термин "генотип" относится к генетической структуре клетки или организма. "Генотип по набору генетических маркеров" особи включает специфические аллели для одного или нескольких локусов генетических маркеров, присутствующих у особи. Как известно из данной области техники, генотип может относиться к одному локусу или к нескольким локусам, независимо от того являются ли локусы родственными или неродственными и/или сцепленными или несцепленными. В некоторых вариантах осуществления генотип особи относится к одному или нескольким генам, которые связаны в том плане, что один или несколько генов вовлечены в экспрессию представляющего интерес фенотипа (например, количественного признака, определенного в данном документе). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления генотип предусматривает сумму одного или нескольких аллелей, присутствующих у особи в одном или нескольких генетических локусах, определяющих количественный признак. В некоторых вариантах осуществления генотип экспрессируется в виде гаплотипа (определенного в данном документе ниже).

"Трансформированный", "трансгенный" и "рекомбинантный" применяются взаимозаменяемо и каждое из них относится к организму-хозяину, такому как бактерия или растение, в который ввели гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты. Молекулу нуклеиновой кислоты можно стабильно интегрировать в геном хозяина или же молекула нуклеиновой кислоты также может присутствовать в виде внехромосомной молекулы. Такая внехромосомная молекула может быть автореплицирующейся. Подразумевается, что трансформированные клетки, ткани или растения охватывают не только конечный продукт процесса трансформации, но также и его трансгенное потомство. "Нетрансформированный", "нетрансгенный" или "нерекомбинантный" хозяин относится к организму дикого типа, например бактерии или растению, которые не содержат гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты.

"Дикий тип" относится к нормальному гену, вирусу или организму, встречающемуся в природе без какой-либо мутации или модификации.

Термин "идиоплазма" относится к генетическому материалу особи (например, растения), группы особей (например, линии, сорта или семейства растений) или клона, происходящего из линии, сорта, вида или культуры, или от них. Идиоплазма может представлять собой часть организма или клетки или может быть выделена из организма или клетки. Как правило, идиоплазма обеспечивает генетический материал с определенным молекулярным составом, который обеспечивает физическую основу для некоторых или всех наследственных качеств организма или культуры клеток. Как используется в данном документе, термин "идиоплазма" включает клетки, семя или ткани, из которых могут быть выращены новые растения или части растений, такие как листья, стебли, пыльца или клетки, которые могут быть культивированы в целое растение.

Как используется в данном документе, термины "растительный материал", "часть растения" или "ткань растения" означают растительные клетки, протопласты растений, тканевые культуры растительных клеток, из которых растения могут быть регенерированы, каллюсы растений, скопления растительного материала и растительные клетки, которые являются интактными в растениях или частях растений, такие как зародыши, пыльца, семечки, семена, листья, цветки, ветви, плоды, зерна, колосья, початки, листовые обертки, цветоножки, корни, кончики корней, пыльники, клубни, корневища и т.п.

Как используется в данном документе, термин "пропагула" относится к любому материалу, который применяют для размножения растения, предпочтительно трансгенного растения, более предпочтительно трансгенного растения, содержащего SEQ ID NO: 1. Пропагула может представлять собой семя, черенок или несколько клеток из трансгенного растения, которые можно применять для получения культуры трансгенных растений.

Как используется в данном документе, "образец растения" или "биологический образец" относится либо к интактной, либо к неинтактной (например, молотому семени или ткани растения, порубленной ткани растения, лиофилизированной ткани) ткани растения. Это также может быть экстракт, содержащий интактные или неинтактные семя или ткань растения. Биологический образец или экстракт можно выбрать из группы, состоящей из кукурузной муки, кукурузной муки крупного помола, кукурузной патоки, кукурузного масла, кукурузного крахмала и изделий из злаков, изготовленных целиком или частично с содержанием вторичных продуктов кукурузы.

Термин "гетерологичный" при применении в отношении гена или нуклеиновой кислоты относится к гену, кодирующему фактор, который не находится в его естественном окружении (т.е. который был изменен посредством вмешательства человека). Например, гетерологичный ген может предусматривать ген организма одного вида, введенный в организм другого вида. Гетерологичный ген также может предусматривать ген, нативный по отношению к организму, но который был изменен определенным образом (например, подвергнут мутации, добавлен в виде множества копий, связан с ненативным промоторным или энхансерным полинуклеотидом и т.д.). Гетерологичные гены дополнительно могут предусматривать полинуклеотиды генов растения, которые включают cDNA-формы гена растения; cDNA могут экспрессироваться либо в смысловой (с получением mRNA), либо антисмысловой ориентации (с получе-

нием бессмысленного РНК-транскрипта, комплементарного mRNA-транскрипту). В одном аспекте настоящего изобретения гетерологичные гены отличаются от эндогенных генов растения тем, что полинуклеотид гетерологичного гена, как правило, присоединен к полинуклеотидам, содержащим регуляторные элементы, такие как промоторы, которые в природе не встречаются как ассоциированные с геном белка, кодируемого гетерологичным геном, или с полинуклеотидом гена растения в хромосоме, или ассоциированы с частями хромосомы, в которых они не встречаются в природе (например, гены экспрессируются в локусах, в которых указанный ген в обычных условиях не экспрессируется). Кроме того, в вариантах осуществления "гетерологичный" полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, в естественных условиях не ассоциированный с клеткой-хозяином, в которую его вводят, в том числе не встречающиеся в природе множественные копии полинуклеотида, встречающегося в природе.

"Идентичность" или "процентная идентичность" относится к степени сходства между двумя последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями. При сравнении последовательностей одна последовательность, как правило, выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости задают координаты подпоследовательности и задают программные параметры алгоритма сравнения последовательностей. Затем с помощью алгоритма сравнения последовательностей на основе заданных программных параметров вычисляют процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности(последовательностей) относительно эталонной последовательности. Фраза "в значительной степени идентичный" в контексте двух последовательностей нуклеиновых кислот или двух аминокислотных последовательностей относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые по меньшей мере на приблизительно 50% идентичны по нуклеотидам или аминокислотным остаткам при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, что определяют при помощи одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуальной проверки. В определенных вариантах осуществления в значительной степени идентичные последовательности по меньшей мере на приблизительно 60%, или по меньшей мере на приблизительно 70%, или по меньшей мере на приблизительно 80%, или даже по меньшей мере на приблизительно 90% или 95% идентичны по нуклеотидам или аминокислотным остаткам. В определенных вариантах осуществления значительная степень идентичности имеет место в пределах участка последовательностей, который состоит по меньшей мере из приблизительно 50 остатков в длину, или в пределах участка, состоящего из по меньшей мере приблизительно 100 остатков, или последовательности в значительной степени идентичны в пределах по меньшей мере приблизительно 150 остатков. В дополнительных вариантах осуществления последовательности являются в значительной степени идентичными, если они идентичны по всей длине кодирующих участков.

Термин "гомология" в контексте настоящего изобретения относится к уровню сходства между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями с точки зрения идентичности или сходства нуклеотидов или аминокислот соответственно, т.е. сходства или идентичности последовательностей. Гомология, гомолог или гомологичный также относятся к представлению о сходных функциональных свойствах различных нуклеиновых кислот или белков. Гомологи включают гены, которые являются ортологичными или паралогичными. Гомологи можно определять с применением кодирующей последовательности гена, раскрытой в данном документе или встречающейся в соответствующей базе данных (такой как NCBI или другие) одним из несколькими из следующих способов. В отношении аминокислотной последовательности следует сравнивать при помощи алгоритмов (для примера см. раздел по "идентичности" или "значительной идентичности"). В отношении нуклеотидных последовательностей последовательности одной молекулы ДНК можно сравнивать с последовательностью известного или предполагаемого гомолога приблизительно таким же путем. Гомологи по меньшей мере на 20% идентичны, или по меньшей мере на 30% идентичны, или по меньшей мере на 40% идентичны, или по меньшей мере на 50% идентичны, или по меньшей мере на 60% идентичны, или по меньшей мере на 70% идентичны, или по меньшей мере на 80% идентичны, или по меньшей мере на 88% идентичны, или по меньшей мере на 90% идентичны, или по меньшей мере на 92% идентичны, или по меньшей мере на 95% идентичны в пределах любого значительного участка молекулы (молекулы ДНК, РНК или белка).

Одним примером алгоритма, который подходит для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно благодаря Национальному центру биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Данный алгоритм включает первоначально идентификацию пар последовательностей с наибольшим сходством (HSP) путем идентификации коротких "слов" длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому баллу T при выравнивании со "словом" такой же длины в последовательности из базы данных. T называется пороговым показателем соседнего "слова" (Altschul et al., 1990). Эти исходные совпадения соседних "слов" выступают в качестве затравки для начала поисков с целью обнаружения более длинных HSP, содержащих их. Совпадения "слов" затем продлеваются в обоих направлениях

вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться совокупный показатель выравнивания. Совокупные показатели рассчитывают с применением, в случае нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (балл-вознаграждение, начисляемый за пару совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штрафной балл, начисляемый за несовпадающие остатки; всегда  $<0$ ). В случае аминокислотных последовательностей для расчета совокупного показателя применяют матрицу замен. Продление совпадений "слов" в каждом направлении прекращается, когда совокупный показатель выравнивания снижается на величину  $X$  от его максимального достигнутого значения, при этом совокупный показатель падает до нуля или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными показателями, либо в случае достижения конца одной из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину "слова" ( $W$ ), равную 11, ожидаемое значение ( $E$ ), равное 10, пороговое значение, равное 100,  $M=5, N=4$  и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину "слова" ( $W$ ), равную 3, ожидаемое значение ( $E$ ), равное 10, а также матрицу замен BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 10915 (1989)).

В дополнение к расчету процентной идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). Одной мерой сходства, предоставляемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ( $P(N)$ ), которая предусматривает показатель вероятности, согласно которому совпадения между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будут наблюдаться случайным образом. Например, тестируемая последовательность нуклеиновой кислоты считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой последовательности нуклеиновой кислоты с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

Другой широко используемой и распространенной компьютерной программой для выполнения выравниваний последовательностей является CLUSTALW v1.6 (Thompson, et al. Nuc. Acids Res., 22: 4673-4680, 1994). Число совпадающих оснований или аминокислот делят на общее число оснований или аминокислот и умножают на 100 с получением процентной идентичности. Например, если бы две последовательности из 580 пар оснований совпадали на 145 оснований, то они были бы идентичными на 25%. Если две сравниваемые последовательности имеют разную длину, то число совпадений делят на более короткую из двух длин. Например, если было 100 совпадающих аминокислот между белками из 200 и 400 аминокислот, то они идентичны на 50% по отношению к более короткой последовательности. Если более короткая последовательность составляет менее 150 оснований или 50 аминокислот в длину, то число совпадений делят на 150 (в случае оснований нуклеиновых кислот) или 50 (в случае аминокислот) и умножают на 100 с получением процентной идентичности.

Две нуклеотидные последовательности также могут считаться в значительной степени идентичными, если две последовательности гибридизируются друг с другом при жестких условиях. В иллюстративных вариантах осуществления две нуклеотидные последовательности, которые считаются в значительной степени идентичными, гибридизируются друг с другом при очень жестких условиях.

Две нуклеотидные последовательности также могут считаться в значительной степени идентичными, если две последовательности гибридизируются друг с другом при жестких условиях. В иллюстративных вариантах осуществления две нуклеотидные последовательности, которые считаются в значительной степени идентичными, гибридизируются друг с другом при очень жестких условиях.

Термины "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" включают ссылку на условия, при которых нуклеиновая кислота будет избирательно гибридизоваться с целевой последовательностью до определяемой более высокой степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза более высокой по сравнению с нецелевой последовательностью), и необязательно могут в значительной степени исключать связывание с нецелевыми последовательностями. Жесткие условия являются зависимыми от последовательностей и будут различаться при разных обстоятельствах. При помощи контроля жесткости условий гибридизации и/или отмывки можно идентифицировать целевые последовательности, которые могут быть до 100% комплементарными эталонной нуклеотидной последовательности. Альтернативно, можно применять условия умеренной или даже низкой жесткости для обеспечения некоторого несовпадения последовательностей с тем, чтобы определять меньшие уровни сходства последовательностей. Например, специалистам в данной области техники будет понятно, что для функционирования в качестве праймера или зонда последовательность нуклеиновой кислоты должна быть лишь достаточно комплементарной целевой последовательности для связывания с ней в значительной степени с образованием таким образом стабильной дунитевой структуры в используемых условиях. Таким образом, праймеры или зонды можно применять при условиях высокой, умеренной или даже низкой жесткости. Аналогично, условия низкой или умеренной жесткости могут быть предпочтительными для обнаружения гомологичных, ортологичных и/или паралогичных последовательностей, характеризующихся более низкими степенями идентичности последовательностей, чем те, которые были бы иден-

тифицированы при очень жестких условиях.

Для гибридов ДНК-ДНК  $T_m$  можно приблизительно вычислить из уравнения Meinkoth and Wahl, *Anal. Biochem.*, 138:267-84 (1984):  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ формамида}) - 500/L$ ; где  $M$  представляет собой молярность раствора одновалентных катионов,  $\% \text{ GC}$  представляет собой процентную долю гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК,  $\% \text{ формамида}$  представляет собой процентную долю формамида в растворе для гибридизации, а  $L$  представляет собой длину гибрида в парах оснований.  $T_m$  представляет собой температуру (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% комплементарной целевой последовательности гибридизируется с идеально подходящим зондом.  $T_m$  снижают приблизительно на  $1^\circ\text{C}$  для каждого 1% несовпадения; таким образом,  $T_m$ , условия гибридизации и/или отмывки можно скорректировать для гибридизации с последовательностями с требуемой степенью идентичности. Например, если ищут последовательности с идентичностью  $>90\%$ ,  $T_m$  можно снизить на  $10^\circ\text{C}$ . В целом, жесткие условия выбирают такими, чтобы они были примерно на  $5^\circ\text{C}$  ниже, чем температура плавления ( $T_m$ ) для специфической последовательности и ее комплементарной последовательности при определенных ионной силе и pH. Однако при очень жестких условиях можно использовать гибридизацию и/или отмывку при температуре плавления ( $T_m$ ) или на 1, 2, 3 или  $4^\circ\text{C}$  ниже температуры плавления ( $T_m$ ); при условиях умеренной жесткости можно использовать гибридизацию и/или отмывку при температуре на 6, 7, 8, 9 или  $10^\circ\text{C}$  ниже температуры плавления ( $T_m$ ); при условиях низкой жесткости можно применять гибридизацию и/или отмывку при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или  $20^\circ\text{C}$  ниже температуры плавления ( $T_m$ ). Если необходимая степень несовпадения обуславливает  $T_m$  ниже  $45^\circ\text{C}$  (водный раствор) или  $32^\circ\text{C}$  (раствор формамида), то необязательно концентрацию SSC можно повысить для того, чтобы можно было использовать более высокую температуру. Исчерпывающее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, часть I, глава 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York (1993); *Current Protocols in Molecular Biology*, глава 2, под редакцией Ausubel, et al. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995); и Green & Sambrook в *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 4-е изд., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012).

Как правило, жесткие условия являются такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, как правило, концентрация ионов Na (или других солей) составляет приблизительно 0,01-1,0 М при приблизительно pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно  $30^\circ\text{C}$  для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно  $60^\circ\text{C}$  для более длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Жестких условий можно также достичь при добавлении дестабилизирующих средств, таких как формамид или раствор Денхардта (5 г Ficoll, 5 г поливинилпирролидона, 5 г бычьего сывороточного альбумина в 500 мл воды). Иллюстративные условия низкой жесткости включают гибридизацию с использованием буферного раствора 30-35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфата натрия) при  $37^\circ\text{C}$  и отмывку в 1X-2X SSC (20X SSC=3,0 М NaCl/0,3 М цитрата тринатрия) при 50-55 $^\circ\text{C}$ . Иллюстративные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45%-ном формамиде, 1 М NaCl, 1% SDS при  $37^\circ\text{C}$  и отмывку в 0,5X-1X SSC при 55-60 $^\circ\text{C}$ . Иллюстративные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50%-ном формамиде, 1 М NaCl, 1% SDS при  $37^\circ\text{C}$  и отмывку в 0,1X SSC при 60-65 $^\circ\text{C}$ . Дополнительный неограничивающий пример условий высокой жесткости включает гибридизацию в 4X SSC, 5X растворе Денхардта, 0,1 мг/мл кипяченой ДНК из молок лососевых, 25 мМ фосфата Na при  $65^\circ\text{C}$  и отмывку в 0,1X SSC, 0,1% SDS при  $65^\circ\text{C}$ . Другой пример условий гибридизации высокой жесткости включает гибридизацию в 7% SDS, 0,5 М  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 1 мМ EDTA при  $50^\circ\text{C}$  с отмывкой в 2X SSC, 0,1% SDS при  $50^\circ\text{C}$ , альтернативно, с отмывкой в IX SSC, 0,1% SDS при  $50^\circ\text{C}$ , альтернативно, с отмывкой в 0,5X SSC, 0,1% SDS при  $50^\circ\text{C}$  или, альтернативно, с отмывкой в 0,1X SSC, 0,1% SDS при  $50^\circ\text{C}$  или еще с отмывкой в 0,1X SSC, 0,1% SDS при  $65^\circ\text{C}$ . Специалистам в данной области будет понятно, что специфичность, как правило, зависит от отмывок после гибридизации, при этом важными факторами являются ионная сила и температура конечного раствора для отмывки.

Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизируются друг с другом в жестких условиях, все еще являются в значительной степени идентичными, если белки, которые они кодируют, в значительной степени идентичны (например, в связи с вырожденностью генетического кода).

Еще одним показателем того, что две нуклеиновые кислоты или белка являются в значительной степени идентичными, является то, что белок, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, характеризуется иммунологической перекрестной реактивностью с белком, кодируемым второй нуклеиновой кислотой. Таким образом, белок, как правило, является в значительной степени идентичным второму белку, например, если два белка отличаются только консервативными заменами.

Как используется в данном документе, термины "комплементарный" или "комплементарность" (и подобные термины) относятся к естественному связыванию полинуклеотидов в условиях содержания солей и температуры, допускающих это, путем спаривания оснований. Например, последовательность "A-G-T" связывается с комплементарной последовательностью "T-C-A". Комплементарность между двумя одонитевыми молекулами может быть частичной, при которой связываются только некоторые из

нуклеотидов, или она может быть полной, когда имеет место абсолютная комплементарность между одонитевыми молекулами. Степень комплементарности между нитями нуклеиновой кислоты значительно влияет на эффективность и силу гибридизации между двумя молекулами.

Как используется в данном документе, термин "в значительной степени комплементарный" (и подобные термины) означает, что две последовательности нуклеиновой кислоты комплементарны по меньшей мере на приблизительно 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% или больше. Альтернативно, термин "в значительной степени комплементарный" (и подобные термины) может означать, что две последовательности нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться вместе в условиях высокой жесткости (как описано в данном документе).

Термин "выделенный" при применении в контексте молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов по настоящему изобретению относится к полинуклеотиду, который идентифицируют в пределах и выделяют/отделяют от его хромосомного полинуклеотидного окружения в соответствующем организме-источнике. Выделенная нуклеиновая кислота или полинуклеотид не является нуклеиновой кислотой, которая встречается в своем естественном окружении, если она действительно имеет встречающийся в природе аналог. В отличие от этого, нуклеиновые кислоты, не являющиеся выделенными, представляют собой нуклеиновые кислоты, такие как ДНК и РНК, которые встречаются в состоянии, в котором они существуют в природе. Например, определенный полинуклеотид (например, ген) встречается в хромосоме клетки-хозяина вблизи соседних генов. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты может находиться в одонитевой или двунитевой форме. Альтернативно, она может содержать как смысловую, так и антисмысловую нити (т.е. молекула нуклеиновой кислоты может быть двунитевой). В предпочтительном варианте осуществления молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению являются выделенными.

Термин "локус" относится к положению (например, гена, генетического маркера или т.п.) в хромосоме данного вида.

Термин "сцепление" и его грамматические варианты относятся к склонности аллелей в различных локусах в той же хромосоме сегрегировать вместе чаще, чем ожидалось бы случайным образом, если их передача была бы независимой, в некоторых вариантах осуществления в результате их физической близости. Фраза "неравновесное сцепление" (также называемое "аллельной связью") относится к явлению, при котором определенные аллели в двух или более локусах склонны оставаться вместе в группах сцепления при сегрегации от родителей к потомству с большей частотой, чем ожидается исходя из их отдельных частот в данной популяции. Например, аллель генетического маркера и аллель QTL могут характеризоваться неравновесным сцеплением, если они встречаются вместе с частотами, превышающими прогнозируемые исходя из отдельных частот аллелей. Неравновесное сцепление может происходить по нескольким причинам, в том числе без ограничения из-за того, что аллели находятся в непосредственной близости в хромосоме. Термин "группа сцепления" относится ко всем генам или генетическим признакам, которые расположены в одной и той же хромосоме. В группе сцепления те локусы, которые расположены достаточно близко, будут характеризоваться сцеплением в генетических скрещиваниях. Поскольку вероятность кроссинговера возрастает по мере увеличения физического расстояния между генами в хромосоме, то гены, которые расположены далеко друг от друга в группе сцепления, могут не характеризоваться каким-либо выявляемым сцеплением в прямых генетических тестах. Выражение "группа сцепления" главным образом используется для обозначения генетических локусов, которые проявляют сцепленное поведение в генетических системах, где отнесения к хромосомам еще не были выполнены. Таким образом, в контексте настоящего изобретения термин "группа сцепления" является синонимом (физическим объектом) хромосомы.

Фраза "нуклеиновая кислота" или "полинуклеотид" относится к любому физическому отрезку из мономерных единиц, который может соответствовать отрезку из нуклеотидов, включая полимер из нуклеотидов (например, типичный полимер ДНК, или полидезоксирибонуклеотид, или полимер РНК, или полирибонуклеотид), модифицированных олигонуклеотидов (например, олигонуклеотидов, содержащих основания, которые не являются типичными по отношению к биологической РНК или ДНК, такие как 2'-О-метилированные олигонуклеотиды) и т.п. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или полинуклеотид могут быть одонитевыми, двунитевыми, многонитевыми или представлять собой их комбинацию. Если не указано иное, определенная нуклеиновая кислота или полинуклеотид по настоящему изобретению необязательно содержат или кодируют комплементарные полинуклеотиды в дополнение к любому явно указанному полинуклеотиду.

Подразумевается, что "ПНР (полимеразная цепная реакция)" в объеме настоящего изобретения относится к способу получения относительно больших количеств определенных участков ДНК, тем самым обеспечивая возможность проведения различных анализов с использованием этих участков.

"Функционально связанный" относится к ассоциации полинуклеотидов на одном фрагменте нуклеиновой кислоты, вследствие чего функция одного влияет на функцию другого. Например, промотор является функционально связанным с кодирующим полинуклеотидом или функциональной РНК, когда он может влиять на экспрессию такого кодирующего полинуклеотида или функциональной РНК (то есть такой кодирующий полинуклеотид или функциональная РНК находятся под контролем промотора на

уровне транскрипции). Кодированный полинуклеотид в смысловой или антисмысловой ориентации может быть функционально связан с регуляторными полинуклеотидами.

Термин "промотор" относится к полинуклеотиду, как правило, расположенному выше (5') от его кодирующего полинуклеотида, который осуществляет контроль экспрессии кодирующего полинуклеотида, обеспечивая узнавание РНК-полимеразой и другими факторами, необходимыми для правильной транскрипции. "Конститутивный промотор" относится к промотору, который способен обеспечивать экспрессию открытой рамки считывания (ORF), регуляцию которой он осуществляет во всех или почти во всех тканях растения в ходе всех или почти всех стадий развития растения (обозначается как "конститутивная экспрессия"). Термин "регулируемый промотор" относится к промоторам, которые управляют экспрессией генов не конститутивно, а временно и/или пространственно регулируемым образом, и включают тканеспецифичные, тканепредпочтительные и индуцируемые промоторы. Он включает природные и синтетические полинуклеотиды, а также полинуклеотиды, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и природных полинуклеотидов. Разные промоторы могут управлять экспрессией гена в разных типах тканей или клеток, или на разных стадиях развития, или в ответ на разные условия окружающей среды.

Термины "тканеспецифичный промотор" или "тканепредпочтительный промотор" относятся к регулируемым промоторам, которые экспрессируются не во всех растительных клетках, а только или предпочтительно в одном или нескольких типах клеток в специфических органах (таких как листья или семена), специфических тканях (таких как ткани зародыша или семядоли) или специфических типах клеток (таких как клетки паренхимы листьев или запасающие клетки семян). Эти термины также включают промоторы, которые являются временно регулируемыми, например, в начале или в конце эмбриогенеза, во время созревания плодов, в развивающихся семенах или плоде, в полностью дифференцированном листе или в начале старения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что для тканеспецифичных промоторов не требуется, чтобы они характеризовались абсолютной тканеспецифичностью, а опосредовали транскрипционную активность в большинстве частей растений на уровне, составляющем приблизительно 1% или меньше от уровня, достигаемого в части растения, в котором транскрипция происходит наиболее активно.

"Энхансер" или "транскрипционный энхансер" представляет собой нуклеотидную последовательность, которая может стимулировать активность промотора и может представлять собой природный элемент промотора или гетерологичный элемент, вставленный для повышения уровня тканевой специфичности промотора. Основная последовательность может находиться в пределах каждой из нитей двунитевой молекулы ДНК, и она способна функционировать даже в случае расположения как выше, так и ниже относительно промотора.

Каждая из "регуляторных последовательностей" или "подходящих регуляторных последовательностей" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности и влияющим на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию связанной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности включают энхансеры, промоторы, трансляционные энхансерные последовательности, интроны и сигнальные последовательности полиадектирования. Они включают природные и синтетические последовательности, а также последовательности, которые могут представлять собой комбинацию синтетических и природных последовательностей. Регуляторные последовательности могут определять уровень экспрессии, пространственный и временной паттерн экспрессии и для подмножества промоторов экспрессию в индуктивных условиях (регуляция внешними факторами, такими как свет, температура, химические вещества и гормоны). Регуляторные последовательности могут представлять собой короткие участки последовательности ДНК длиной 6-100 пар оснований, которые определяют сайты связывания для действующих в транс-положении факторов, таких как факторы транскрипции. Регуляторные последовательности могут также быть энхансерами, более длинными участками последовательности ДНК, которые могут действовать на расстоянии от участка корового промотора, иногда на расстоянии нескольких тысяч пар оснований от корового участка. На активность регуляторных последовательностей могут влиять действующие в транс-положении факторы, в том числе базовый транскрипционный аппарат, факторы транскрипции и факторы сборки хроматина.

"Цис-элемент" относится к действующему в цис-положении транскрипционному регуляторному элементу, который обеспечивает некоторый аспект общего контроля экспрессии генов. Цис-элемент может обладать функцией связывания с факторами транскрипции, действующими в транс-положении белковыми факторами, которые регулируют транскрипцию. Некоторые цис-элементы связывают более одного фактора транскрипции, и при этом факторы транскрипции могут взаимодействовать с более чем одним цис-элементом с различными значениями аффинности. Цис-элементы могут быть идентифицированы с помощью ряда методик, включая делеционный анализ, то есть удаление одного или нескольких нуклеотидов с 5'-конца или из внутренней части промотора; анализ связывания ДНК с белком при помощи футпринтинга с использованием ДНКазы I, анализ интерференции метилированием, анализ с определением изменения электрофоретической подвижности, *in vivo* геномный футпринтинг с помощью ПЦР, опосредованной лигированием, и другие традиционные анализы; или с помощью анализа сходства по-

следовательностей ДНК с использованием известных мотивов цис-элементов посредством традиционных способов сравнения последовательностей ДНК. Тонкая структура цис-элемента может быть дополнительно исследована с помощью мутагенеза (или замены) одного или нескольких нуклеотидов или с помощью других традиционных способов. Цис-элементы могут быть получены с помощью химического синтеза или выделения из промоторов, содержащих такие элементы, и они могут быть синтезированы с дополнительными фланкирующими нуклеотидами, содержащими сайты для рестрикционных ферментов, полезные для осуществления манипуляций с подпоследовательностями.

"Терминатор транскрипции" отвечает за терминацию транскрипции за пределами кодирующего участка и правильное полиаденилирование mRNA. Участок терминации может быть нативным относительно участка инициации транскрипции, может быть нативным относительно функционально связанной последовательности ДНК, представляющей интерес, может быть нативным относительно растения-хозяина или может быть получен из другого источника (т.е. чужеродного или гетерологичного для промотора, последовательности ДНК, представляющей интерес, растения-хозяина или какой-либо их комбинации). Соответствующие терминаторы транскрипции представляют собой таковые, которые, как известно, функционируют в растениях и включают терминатор 35S CAMV, терминатор гена *tml*, терминатор гена *нопа* инсинтазы и терминатор гена *gbcS-E9* гороха. Их можно применять как у однодольных, так и у двудольных растений. В дополнение, можно применять нативный терминатор транскрипции гена.

Выражение "трансляционная энхансерная последовательность" относится к такой части последовательности ДНК гена между промотором и кодирующей последовательностью, которая транскрибируется в РНК и присутствует в полностью процессированных mRNA, расположенных выше (5') относительно старт-кодона трансляции. Трансляционная энхансерная последовательность может влиять на процессинг первичного транскрипта в mRNA, на стабильность mRNA или эффективность трансляции.

Как используется в данном документе, термин "пакетирование" генов или признаков представляет собой комбинирование желательных генов или признаков в одной линии трансгенного растения. В качестве одного подхода растениеводы осуществляют "пакетирование" трансгенных признаков при помощи скрещиваний родителей, каждый из которых имеет желательный признак, а затем идентификации потомства, которое имеет оба из этих желательных признаков (так называемые "селекционные гибриды"). Другим способом "пакетирования" генов является перенос двух или более генов в ядро клетки растения одновременно в ходе трансформации. Еще одним способом "пакетирования" генов является повторная трансформация трансгенного растения другим представляющим интерес геном. Например, "пакетирование" генов можно применять для комбинирования двух различных признаков устойчивости к насекомым, признака устойчивости к насекомым и признака устойчивости к заболеванию или признака устойчивости к гербициду (такому как, например, *Bt1*). Применение селективируемого маркера, в дополнение к представляющему интерес гену, также будет считаться "пакетированием" генов.

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

Термин "трансгенное растение" включает ссылку на растение, которое содержит в своем геноме гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты. Как правило, гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты стабильно интегрирована в геном с тем, чтобы последовательность нуклеиновой кислоты передавалась последующим поколениям. Гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты может быть интегрирована в геном отдельно или как часть рекомбинантной кассеты экспрессии. Термин "трансгенный", как используется в данном документе, включает любую клетку, линию клеток, каллюс, ткань, часть растения или растение, генотип которого был изменен за счет присутствия гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты, в том числе такие трансгенные объекты, которые исходно изменены таким образом, а также такие, которые созданы путем половых скрещиваний или бесполого размножения из исходного трансгенного объекта. Как используется в данном документе, термин "трансгенный" не охватывает изменение генома (хромосомного или внехромосомного) с помощью традиционных способов селекции растений или встречающихся в природе событий, таких как случайное перекрестное опыление, инфекция, опосредованная нереккомбинантным вирусом, трансформация нереккомбинантными бактериями, нереккомбинационная транспозиция или спонтанная мутация.

Термин "урожайность" может включать ссылку на количество бушелей на акр зерновой культуры

при уборке урожая с поправкой на влажность зерна (как правило, 15% для маиса, например) и объем образованной биомассы (для кормовых культур, таких как люцерна, и размер корней растения для культур, дающих несколько урожаев в год). Влажность зерна измеряют для зерновой культуры при уборке. Скорректированный натуральный вес зерна определяют как вес в фунтах на бушель с поправкой на уровень влажности зерна при уборке урожая. Биомассу измеряют как вес полученного растительного материала, который можно собрать. На урожайность могут влиять многие свойства, включая без ограничения высоту растения, число стручков, положение стручка на растении, число междоузлий, частоту растрескивания стручков, размер зерна, эффективность образования клубеньков и фиксации азота, эффективность ассимиляции питательных веществ, ассимиляции углерода, архитектуру растения, процент прорастания семян, мощность проростков и ювенильные признаки. На урожайность также может влиять эффективность прорастания (включая прорастание в стрессовых условиях), скорость роста (включая скорость роста в стрессовых условиях), число початков, число семян на початок, размер семени, состав семени (крахмал, масло, белок) и характеристики налива зерна. Урожайность растения может быть измерена с помощью ряда способов, включая определение натурального веса, числа семян на растение, веса семян, числа семян на единицу площади (т.е. семена, или вес семян, на акр), бушелей на акр, тонн на акр или килограмм на гектар. Например, урожайность кукурузы может быть измерена как продукция обмолоченных кукурузных зерен на единицу площади продукции, например, в бушелях на акр или метрических тоннах на гектар, часто указываемая с поправкой на влажность, например, при 15,5% влажности. Более того, бушель кукурузы определяется по закону штата Айова как 56 фунтов по весу, соответствующий коэффициент перевода для урожая кукурузы представляет собой 100 бушелей на акр эквивалентно 6,272 метрическим тоннам на гектар. Другие измерения урожайности являются распространенной практикой в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения урожайность может быть повышена в условиях стресса и/или в условиях отсутствия стресса.

Термин "вектор" или "конструкция" включает ссылку на нуклеиновую кислоту, применяемую для трансфекции клетки-хозяина, и в которую можно вставить полинуклеотид. Векторы зачастую являются репликационными. Векторы экспрессии обеспечивают транскрипцию нуклеиновой кислоты, вставленной в них. "Вектор" включает, в числе прочего, любую плазмиду, космиду, фаг или бинарный вектор для *Agrobacterium* в дву- или односторонней линейной или кольцевой форме, который может быть самопередающимся или мобилизуемым, или не быть таковым, и который может трансформировать прокариотического или эукариотического хозяина либо путем интеграции в геном клетки, либо за счет существования его внехромосомно (например, автономно реплицирующаяся плазида с точкой начала репликации). В частности, включены челночные векторы, с помощью которых предназначенный носитель ДНК может естественным или спланированным образом реплицироваться в двух различных организмах-хозяевах, которые могут быть выбраны из актиномицетов и родственных видов, бактерий и эукариот (например, клеток высших растений, млекопитающих, дрожжей или грибов).

Как используется в данном документе, термин "трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина, что приводит к генетически стабильному наследованию. В некоторых вариантах осуществления введение в растение, часть растения и/или растительную клетку осуществляется при помощи опосредованной бактериями трансформации, трансформации путем бомбардировки частицами, опосредованной фосфатом кальция трансформации, опосредованной циклодекстринами трансформации, электропорации, опосредованной липосомами трансформации, опосредованной наночастицами трансформации, опосредованной полимерами трансформации, опосредованной вирусами доставки нуклеиновых кислот, опосредованной микроиголами доставки нуклеиновых кислот, микроинъекции, обработки ультразвуком, инфльтрации, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, трансформации протопласта или любого другого электрического, химического, физического и/или биологического механизма, который в результате приводит к введению нуклеиновой кислоты в растение, часть растения и/или его клетку, или их комбинации.

Процедуры трансформации растений хорошо известны и общеприняты в данной области техники и описаны в литературе во всех отношениях. Неограничивающие примеры способов трансформации растений включают трансформацию с помощью доставки нуклеиновых кислот, опосредованной бактериями (например, с помощью бактерий из рода *Agrobacterium*), доставки нуклеиновых кислот, опосредованной вирусами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной карбидом кремния или микроиголами с нуклеиновыми кислотами, доставки нуклеиновых кислот, опосредованной липосомами, микроинъекцию, бомбардировку микрочастицами, трансформацию, опосредованную фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную циклодекстринами, электропорацию, трансформацию, опосредованную наночастицами, обработку ультразвуком, инфльтрацию, поглощение нуклеиновых кислот, опосредованное PEG, а также любой другой электрический, химический, физический (механический) и/или биологический механизм, который в результате приводит к введению нуклеиновой кислоты в растительную клетку, включая любую их комбинацию. Общие руководства по разнообразным способам трансформации растений, известным в данной области техники, включают Miki et al. ("Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants" в *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology* под редакцией Glick, B.R. и Thompson, J.E. (CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993), с. 67-88) и Rakowoczy-Trojanowska (2002, *Cell Mol Biol Lett* 7:849-858

(2002)).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления введение в растение, часть растения и/или растительную клетку осуществляется при помощи опосредованной бактериями трансформации, трансформации путем бомбардировки частицами, опосредованной фосфатом кальция трансформации, опосредованной циклодекстринами трансформации, электропорации, опосредованной липосомами трансформации, опосредованной наночастицами трансформации, опосредованной полимерами трансформации, опосредованной вирусами доставки нуклеиновых кислот, опосредованной микроиглами доставки нуклеиновых кислот, микроинъекции, обработки ультразвуком, инфльтрации, опосредованной полиэтиленгликолем трансформации, любого другого электрического, химического, физического и/или биологического механизма, который в результате приводит к введению нуклеиновой кислоты в растение, часть растения и/или его клетку, или их комбинации.

Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, представляет собой способ, широко применяемый для трансформации растений в связи с высокой эффективностью трансформации и в связи с широкой применимостью в отношении множества различных видов. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, как правило, предполагает перенос бинарного вектора, несущего чужеродную ДНК, представляющую интерес, в соответствующий штамм *Agrobacterium*, что может зависеть от набора *vir*-генов штамма-хозяина *Agrobacterium*, расположенного либо в корезидентной Ti-плазмиде, либо в хромосоме (Uknes et al. 1993, *Plant Cell* 5:159-169). Перенос рекомбинантного бинарного вектора в *Agrobacterium* можно выполнять с помощью процедуры трехродительского скрещивания с применением *Escherichia coli*, несущей рекомбинантный бинарный вектор, хелперного штамма *E.coli*, несущего плазмиду, которая способна мобилизовать рекомбинантный бинарный вектор в целевом штамме *Agrobacterium*. Альтернативно, рекомбинантный бинарный вектор можно переносить в *Agrobacterium* путем трансформации нуклеиновой кислоты (Höfgen and Willmitzer 1988, *Nucleic Acids Res* 16:9877).

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

Другой способ трансформации растений, частей растений и растительных клеток включает внедрение инертных или биологически активных частиц в растительные ткани и клетки (см, например, патенты США №№ 4945050; 5036006 и 5100792). В общем случае этот способ включает внедрение в растительные клетки инертных или биологически активных частиц в условиях, эффективных для проникновения через наружную поверхность клетки и возможности встраивания в ее внутреннюю часть. При использовании инертных частиц вектор можно вводить в клетку путем покрытия частиц вектором, содержащим представляющую интерес нуклеиновую кислоту. Альтернативно, клетка или клетки могут быть окружены вектором так, чтобы вектор переносился в клетку вслед за частицей. Биологически активные частицы (например, высушенные дрожжевые клетки, высушенная бактерия или бактериофаг, каждая(каждый) из которых содержит одну или несколько нуклеиновых кислот, подлежащих введению) также можно внедрять в ткань растения.

Таким образом, в конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения растительную клетку можно трансформировать с помощью любого способа, известного в данной области техники и описываемого в данном документе, и можно регенерировать интактные растения из таких трансформированных клеток с применением любой из разнообразных известных методик. Регенерация растений из растительных клеток, культуры растительных тканей и/или культивируемых протопластов описана, например, в Evans et al. (*Handbook of Plant Cell Cultures*, т. 1, MacMilan Publishing Co. New York (1983)) и Vasil I.R. (ред.) (*Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Acad. Press, Orlando, том I (1984) и т. II (1986)). Способы селекции трансформированных трансгенных растений, растительных клеток и/или культур растительных тканей являются общепринятыми в данной области техники и могут применяться в способах по настоящему изобретению, представленных в данном документе.

Термин "введенный" в контексте вставки нуклеиновой кислоты в клетку означает "трансфекцию", или "трансформацию", или "трансдукцию" и включает ссылку на встраивание нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, где нуклеиновая кислота может встраиваться в геном клетки (например, хромосому, плазмиду, пластидную или митохондриальную ДНК), превращаться в автономный репликон или временно экспрессироваться (например, трансфицированная mRNA).

Как используется в данном документе, термин "стабильная трансформация" или "стабильно трансформированный" означает, что нуклеиновая кислота вводится в клетку и интегрируется в геном клетки. В связи с этим интегрированная нуклеиновая кислота способна наследоваться потомством, более конкретно потомством нескольких последовательных поколений. Как используется в данном документе, термин "геном" также включает ядерный и пластидный геном, и, следовательно, предусматривается интеграция нуклеиновой кислоты, например, в геном хлоропласта. Как используется в данном документе, "стабильная трансформация" может относиться также к трансгену, который поддерживается внехромосомно, например в виде мини-хромосомы.

Стабильную трансформацию клетки можно выявлять, например, в анализе с использованием Саузерн-блот-гибридизации геномной ДНК клетки с последовательностями нуклеиновых кислот, которые специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью трансгена, введенного в организм (например, растение). Стабильную трансформацию клетки можно выявить, например, в анализе с использованием нозерн-блот-гибридизации РНК клетки с последовательностями нуклеиновых кислот, которые специфически гибридизуются с нуклеотидной последовательностью трансгена, введенного в растение или другой организм. Стабильную трансформацию клетки также можно выявить, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПНР) или других реакций амплификации, хорошо известных в данной области техники, в которых используются специфические последовательности праймеров, которые гибридизуются с целевой последовательностью (целевыми последовательностями) трансгена, что приводит в результате к амплификации последовательности трансгена, которую можно выявить в соответствии со стандартными способами. Трансформацию также можно выявить с помощью протоколов прямого секвенирования и/или гибридизации, хорошо известных в данной области техники.

Термин "процесс трансформации и регенерации" относится к процессу стабильного введения трансгена в растительную клетку и регенерации растения из трансгенной растительной клетки. Как используется в данном документе, трансформация и регенерация включают процесс отбора, при котором трансген содержит селективируемый маркер и трансформированная клетка содержит встроенный и экспрессируемый трансген таким образом, что трансформированная клетка будет выживать и активно развиваться в присутствии средства отбора. "Регенерация" относится к выращиванию целого растения из растительной клетки, группы растительных клеток или части растения, такой как протопласт, каллус или часть ткани.

Термин "селективируемый маркер" или "селективируемый маркерный ген" относится к гену, экспрессия которого в растительной клетке дает клетке преимущество при отборе. Термин "положительный отбор" относится к трансформированной клетке, приобретающей способность метаболизировать субстрат, который ранее она не могла использовать или не могла использовать эффективно, обычно благодаря трансформации положительным селективируемым маркерным геном и его экспрессии. Эта трансформированная клетка, таким образом, развивается из массы нетрансформированной ткани. Существует множество типов положительного отбора, от неактивных форм регуляторов роста растений, которые затем превращаются в активные формы при помощи перенесенного фермента, до альтернативных источников углеводов, которые не утилизируются эффективно нетрансформированными клетками, например маннозы, которая затем становится доступной при трансформации геном фермента, например фосфоманнозоизомеразы, которая позволяет ее метаболизировать. Нетрансформированные клетки либо растут медленно по сравнению с трансформированными клетками, либо не растут вовсе. Другие типы отбора могут быть обусловлены тем, что клетки, трансформированные селективируемым маркерным геном, приобретают способность к росту в присутствии средства отрицательного отбора, такого как антибиотик или гербицид, в отличие от способности к росту нетрансформированных клеток. Преимущество при отборе, которым обладает трансформированная клетка, может также быть обусловлено потерей гена, который имелся ранее, при так называемом "отрицательном отборе". При этом добавляются соединения, токсичные только для клеток, которые не потеряли специфический ген (отрицательный селективируемый маркерный ген), присутствующий в родительской клетке (как правило, в трансгене).

Примеры селективируемых маркерных генов включают без ограничения гены, которые обеспечивают устойчивость или толерантность к антибиотикам, таким как канамицин (Dekeyser et al. 1989, *Plant Phys* 90: 217-23), спектиномицин (Svab and Maliga 1993, *Plant Mol Biol* 14: 197-205), стрептомицин (Maliga et al. 1988, *Mol Gen Genet* 214: 456-459), гигромицин В (Waldron et al. 1985, *Plant Mol Biol* 5: 103-108), блеомицин (Hille et al. 1986, *Plant Mol Biol* 7: 171-176), сульфонамиды (Guerineau et al. 1990, *Plant Mol Biol* 15: 127-136), стрептотрицин (Jelenska et al. 2000, *Plant Cell Rep* 19: 298-303) или хлорамфеникол (De Block et al. 1984, *EMBO J* 3: 1681-1689). Другие селективируемые маркеры включают гены, которые обеспечивают устойчивость или толерантность к гербицидам, например, за счет мутаций S4 и/или Hra ацетолактатсинтазы (ALS), которая обеспечивает устойчивость к гербицидам, в том числе сульфонилмочевинам, имидазолинонам, триазолопиримидинам и пиримидинилитобензоатам; гены 5-енолпирувилшкима-3-фосфатсинтазы (EPSPS), в том числе без ограничения те, которые описаны в патентах США №№ 4940935, 5188642, 5633435, 6566587, 7674598 (а также всех родственных заявках), и глифосат-N-ацетилтрансферазы (GAT), которая обеспечивает устойчивость к глифосату (Castle et al. 2004, *Science* 304:1151-1154, и опубликованные патентные заявки США №№ 20070004912, 20050246798 и 20050060767); BAR, которая обеспечивает устойчивость к глюфосинату (см., например, патент США № 5561236); арилоксиалканонатдиоксигеназы или AAD-1, AAD-12 или AAD-13, которые обеспечивают устойчивость к 2,4-D; гены, такие как HPPD *Pseudomonas*, которые обеспечивают устойчивость к HPPD; мутанты и варианты протофторфориногенаоксидазы (PPO), которые обеспечивают устойчивость к окисляющему в перекисное соединение гербицидам, в том числе фомесафену, ацифлуорфен-натрию, оксифлуорфену, лактофену, флутиацет-метилу, сафлуфенацилу, флумиоксазину, флумиклорак-пентилу, карфентразон-этилу, сульфентразону); и гены, обеспечивающие устойчивость к дикамбе, такие как ген дикамбамонооксигеназы (Herman et al. 2005, *J Biol Chem* 280: 24759-24767 и патент США № 7812224 и родствен-

ные заявки и патенты). Другие примеры селективируемых маркеров можно найти в Sundar and Sakthivel (2008, *J Plant Physiology* 165: 1698-1716), включенные в данный документ посредством ссылки.

Другие системы отбора включают применение лекарственных препаратов, аналогов метаболитов, промежуточных соединений метаболитов и ферментов для положительного отбора или зависящего от условий положительного отбора трансгенных растений. Примеры включают без ограничения ген, кодирующий фосфоманнозоизомеразу (PMI), где манноза представляет собой средство отбора, или ген, кодирующий ксилозоизомеразу, где D-ксилоза представляет собой средство отбора (Haldrup et al. 1998, *Plant Mol Biol* 37: 287-96). Наконец, в других системах отбора можно применять не содержащую гормонов среду в качестве средства отбора. Одним неограничивающим примером является ген гомеобокса маиса *kn1*, эктопическая экспрессия которого приводит к 3-кратному повышению эффективности трансформации (Luo et al. 2006, *Plant Cell Rep* 25: 403-409). Примеры различных селективируемых маркеров и генов, кодирующих их, раскрыты в Miki and McHugh (*J Biotechnol*, 2004, 107: 193-232, включенной посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления селективируемый маркер может происходить от растения. Пример селективируемого маркера, который может происходить от растения, включает без ограничения 5-енолпирувилшкимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS). Фермент 5-енолпирувилшкимат-3-фосфатсинтаза (EPSPS) катализирует ключевую стадию шикиматного пути, общего для биосинтеза ароматических аминокислот у растений. Гербицид глифосат подавляет EPSPS, тем самым уничтожая растение. Трансгенные толерантные к глифосату растения можно получать с помощью введения модифицированного трансгена EPSPS, на который не влияет глифосат (например, патент США 6040497, включенный посредством ссылки). Другие примеры модифицированного EPSPS растения, которые можно применять в качестве селективируемого маркера в присутствии глифосата, включают мутант P106L EPSPS риса (Zhou et al. 2006, *Plant Physiol* 140: 184-195) и с мутацией P106S в EPSPS подмаренника цепкого (Baerson et al. 2002, *Plant Physiol* 129: 1265-1275). Другие источники EPSPS, которые не происходят от растения и которые можно применять для обеспечения толерантности к глифосату, включают без ограничения мутант EPSPS P101S из *Salmonella typhimurium* (Comai et al. 1985, *Nature* 317: 741-744) и мутированный вариант CP4 EPSPS от штамма CP4 *Agrobacterium* sp. (Funke et al. 2006, *PNAS* 103: 13010-13015). Несмотря на то, что ген EPSPS растения является ядерным, зрелый фермент локализуется в хлоропласте (Mousdale and Coggins 1985, *Planta* 163:241-249). EPSPS синтезируется в виде белка-предшественника, содержащего транзитный пептид, и при этом предшественник затем транспортируется в строму хлоропласта и обрабатывается протеолитическим путем с образованием зрелого фермента (della-Cioppa et al. 1986, *PNAS* 83: 6873-6877). Таким образом, для получения трансгенного растения, которое характеризуется толерантностью к глифосату, можно вводить подходящим образом мутированный вариант EPSPS, который надлежащим образом транслоцируется в хлоропласт. В этом случае такое трансгенное растение содержит нативный геномный ген EPSPS, а также мутированный трансген EPSPS. Затем глифосат можно применять в качестве средства отбора в ходе процессов трансформации и регенерации, при этом выживают лишь те растения или ткани растения, которые успешно трансформированы мутированным трансгеном EPSPS.

Как используется в данном документе, термин трансгенный "объект" относится к рекомбинантному растению, полученному с помощью трансформации и регенерации растительной клетки или ткани гетерологичной ДНК, например кассетой экспрессии, которая содержит представляющий интерес ген. Термин "объект" относится к исходному трансформанту и/или потомству трансформанта, которые содержат гетерологичную ДНК. Термин "объект" относится к потомству, полученному путем полового аутокроссинга между трансформантом и другой линией кукурузы. Даже после повторного обратного скрещивания с рекуррентным родителем вставленная ДНК и фланкирующая ДНК из трансформированного родителя присутствует в потомстве, полученном в результате скрещивания, в том же местоположении в хромосоме. Термин "объект" также относится к ДНК из исходного трансформанта, содержащего вставленную последовательность ДНК и фланкирующую геномную последовательность, непосредственно примыкающие к вставленной ДНК, которая, как ожидается, будет передана потомству, которое получает вставленную ДНК, в том числе представляющий интерес трансген, в результате полового скрещивания одной родительской клеточной линии, которая содержит вставленную ДНК (например, исходный трансформант и потомство, полученное в результате самоопыления), и родительской клеточной линии, не содержащей вставленную ДНК. Как правило, трансформация ткани растения обеспечивает получение нескольких объектов, каждый из которых предусматривает вставку конструкции ДНК в разное местоположение в геноме растительной клетки. На основании экспрессии трансгена или других необходимых характеристик, отбирают определенный объект.

Специалисту в данной области будет понятно, что трансгенный генотип по настоящему изобретению можно интрогрессировать при помощи селекции в другие линии растений, содержащие различные трансгенные или нетрансгенные генотипы. Например, инбредную кукурузу, содержащую трансгенный генотип по настоящему изобретению, можно скрещивать с инбредной кукурузой, содержащей трансгенный генотип объекта MIR162, устойчивого к чешуекрылым, известного в данной области техники, с получением тем самым семени кукурузы, которое содержит как трансгенный генотип по настоящему изобретению, так и трансгенный генотип MIR162. Кроме того, будет понятно, что можно выполнять другие

комбинации с трансгенным генотипом по настоящему изобретению, и, таким образом, этот пример не следует рассматривать в качестве ограничивающего.

Трансгенный генотип по настоящему изобретению можно интрогрессировать от изначально трансформированного растения, такого как растение кукурузы, в инбредное или гибридное растение при помощи известных в данной области методик селекции. Целью селекции растений является комбинация в одном сорте или гибриде различных желательных признаков. Для полевых культур такие признаки могут включать устойчивость к насекомым и заболеваниям, толерантность к гербицидам, выносливость по отношению к жаре и засухе, уменьшение промежутка времени до созревания культуры, более высокую урожайность и лучшее агрономическое качество. При механизированной уборке урожая многих культур важным является однородность характеристик растений, таких как достижение прорастания и стояния, скорость роста, созревание и высота растения и початка.

В настоящем изобретении предусмотрена конструкция, которая содержит ген *mCry3A*, раскрытый в патенте США № 7030295 (включенный в данный документ посредством ссылки), который кодирует белок *mCry3A* и пригоден для контроля насекомых-вредителей кукурузных жуков (*Diabrotica* spp.). Конструкция также содержит ген *eCry3.1Ab* (также известный как FR8a), раскрытый в патенте США № 8309516 и включенный в данный документ посредством ссылки, который кодирует инсектицидный белок *eCry3.1Ab*, также пригодный для контроля насекомых-вредителей *Diabrotica* spp. посредством второго режима действия. Двойной режим действия, обеспечиваемый за счет двух инсектицидных белков в одном трансгенном растении кукурузы, обеспечивает растениевода более эффективной системой по уходу за растениями для контроля кукурузного жука.

Хотя существуют коммерческие объекты, которые несут либо ген *mCry3A* (а именно объект MIR604, патенты США №№ 7361813, 7897748, 8354519 и 8884102), либо ген *eCry3.1Ab* (а именно объект 5307, патент США № 8466346), отдельный объект, который несет оба гена в одном локусе, обеспечивал бы значительные преимущества. В настоящее время создание коммерчески полезного трансгенного растения, которое содержит оба трансгена *mCry3A* и *eCry3.1Ab*, требует нескольких стадий селекции и значительного количества скрининговых анализов для идентификации надлежащего генотипа в надлежащей идиоплазме. Эти стадии селекции и скрининга требуются для каждой разновидности идиоплазмы, в которую необходимо ввести эти два признака. Кроме того, для многих агрономически важных культур, таких как кукуруза, эти два признака необходимо поддерживать в виде гибридов для десятков разновидностей идиоплазмы. В конечном итоге, факторы, такие как сцепление генов нежелательных признаков или генетическая рекомбинация, могут осложнять введение двух признаков из двух различных локусов в одну разновидность идиоплазмы. Таким образом, было бы предпочтительным получить молекулу нуклеиновой кислоты, которая при введении в геном клетки приведет к образованию трансгенной клетки, которая несет оба признака в одном локусе.

Были получены различные конструкции для определения эффективности генов *mCry3A* и *eCry3.1Ab* в контексте различных касет экспрессии. Удивительно, что один вектор, 17629, обеспечивал превосходные инсектицидные свойства без каких-либо отрицательных эффектов на вегетативное развитие или фертильность трансгенного растения или с минимальными эффектами. Трансген из вектора 17629 представляет собой SEQ ID NO: 1. Этот трансген содержит три касеты экспрессии. Две такие касеты экспрессии содержат *eCry3.1Ab* и *mCry3A*, которые представляют собой гены, пригодные для контроля жесткокрылых насекомых-вредителей, в том числе *Diabrotica virgifera virgifera*, западный кукурузный жук, *D. virgifera zeaе*, мексиканский кукурузный жук, и *D. longicornis barberi*, северный кукурузный жук. Третья кассета экспрессии содержит ген PAT, который обеспечивает устойчивость к гербицидам, содержащим глюфосинат. Ген PAT происходит из *Streptomyces viridochromogenes* и кодирует фосфинотрицинацетилтрансферазу, которая обеспечивает толерантность к глюфосинату (патенты США №№ 5531236, 5646024, 5648477 и 5276268). Ген PAT можно использовать в качестве селективируемого маркера для трансформации. Трансгенные растения, экспрессирующие ген PAT, также могут характеризоваться толерантностью к гербицидам, содержащим глюфосинат. Следовательно, трансгенное растение, содержащее SEQ ID NO: 1, характеризуется как улучшенными инсектицидными свойствами, так и толерантностью к гербицидам.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что при вставке молекулы нуклеиновой кислоты, такой как SEQ ID NO: 1, в клетку, 5'- и/или 3'-концы вставленной молекулы можно удалить или перегруппировать. Такие делеции или перестройки могут не влиять на функцию вставленной молекулы, и эти относительно небольшие изменения приводят к тому, что вставленная молекула может считаться в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что молекула нуклеиновой кислоты, например, содержащая SEQ ID NO: 1, может подвергаться полной или частичной перестройке или дупликации в процессе вставки таким образом, что вставленная молекула представляет собой полную или частичную перестройку или дупликацию исходной молекулы нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области техники будет понятно, что эта вставленная молекула может по-прежнему обладать теми же характеристиками и/или признаками, что и исходная молекула, вследствие того, что вставленная молекула в значительной степени идентична SEQ ID NO: 1, и трансформированная клетка или полученное трансформированное растение все еще может оставаться

желательным.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что в случае трансгена для коммерческого применения, такого как молекула нуклеиновой кислоты, которая содержит SEQ ID NO: 1, могут потребоваться относительно незначительные модификации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты для соответствия требованиям государственных регулятивных норм. Такие модификации не будут влиять на функцию полученной молекулы, которая будет в значительной степени идентична SEQ ID NO: 1. Специалисту в данной области техники будет понятно, что молекула модифицированной нуклеиновой кислоты будет фактически такой же, как и исходная молекула.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает молекулу нуклеиновой кислоты, в значительной степени идентичную SEQ ID NO: 1, где определенные нуклеотиды из SEQ ID NO: 1 удаляют, заменяют или перестраивают, с получением в результате мутированной SEQ ID NO: 1, и при этом функциональность мутированной SEQ ID NO: 1 является такой же, как и у исходной молекулы. В настоящем изобретении также предусмотрена молекула нуклеиновой кислоты, химерная молекула нуклеиновой кислоты и/или конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектор, которые содержат, состоят из или состоят главным образом из последовательности нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична, по меньшей мере на 95% идентична, по меньшей мере на 97% идентична, по меньшей мере на 98% идентична, по меньшей мере на 99% идентична или на 100% идентична SEQ ID NO: 1. В одном варианте осуществления эта химерная молекула нуклеиновой кислоты может содержать дополнительные кассеты экспрессии, транскрипционные или трансляционные регуляторные элементы или точки начала репликации прокариот. В другом варианте осуществления химерная молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой конструкцию рекомбинантной нуклеиновой кислоты, такую как бинарный вектор или вектор, подходящий для экспрессии у прокариот. Конструкция рекомбинантной нуклеиновой кислоты может быть подходящей для транзientной или стабильной экспрессии у растений. В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанная в данном документе, представляет собой выделенную молекулу нуклеиновой кислоты. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1 либо в виде выделенной молекулы нуклеиновой кислоты, либо в виде части более крупной молекулы нуклеиновой кислоты.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает применение SEQ ID NO: 1 или молекулы нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1, где экспрессия указанной молекулы обеспечивает улучшенные инсектицидные свойства, пригодные для контроля жесткокрылых насекомых-вредителей, в том числе *Diabrotica virgifera virgifera*, западный кукурузный жук, *D. virgifera zeaе*, мексиканский кукурузный жук, и *D. longicornis barberi*, северный кукурузный жук.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает трансгенную клетку-хозяина, содержащую молекулу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления клетка может представлять собой бактериальную клетку или растительную клетку. В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка может представлять собой клетку *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*; *Bacillus cereus*, *Agrobacterium ssp.* или *Pseudomonas ssp.*

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает трансгенное растение, часть растения, ткань растения, культуру растительных клеток или растительную клетку, содержащие трансгенную растительную клетку, которая содержит молекулу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления эта молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой хромосому, в которую была встроена молекула нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, описанная в данном документе. Трансгенная растительная клетка может обладать способностью регенерации в трансгенное растение или не обладать такой способностью. Трансгенное растение может быть однодольным растением или двудольным растением. В некоторых вариантах осуществления трансгенное растение может представлять собой культурное растение, в том числе без ограничения маис, сорго, пшеницу, подсолнечник, помидор, крестоцветные, овес, газонную траву, пастбищную траву, разновидности перца, картофель, хлопчатник, рис, сою, сахарный тростник, сахарную свеклу, табак, ячмень или масличный рапс.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает потомство трансгенного растения любого поколения, где потомство содержит SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает пропагулу от трансгенного растения любого поколения, где пропагула содержит SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления пропагула может представлять собой семя или черенок. Черенок может быть из надземной части трансгенного растения, такой как стебель или лист, или подземной, такой как корень или корневище.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает способ получения трансген-

ного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий введение в растение SEQ ID NO: 1 или молекулы нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1, с получением таким образом трансгенного растения, где молекула нуклеиновой кислоты обеспечивает экспрессию генов mCry3A и eCry3.1 Ab в количестве, которое обеспечивает контроль насекомых. В одном варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты можно вводить в растение с помощью способа трансформации, в том числе без ограничения трансформации, опосредованной Agrobacterium, или биолистической бомбардировкой или бомбардировкой частицами. Такой способ будет включать стадии а) получения молекулы нуклеиновой кислоты; б) введения в растение, культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты из стадии (а) с получением трансформированного растения, культуры трансформированных тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и с) выращивания указанного трансформированного растения или обеспечения регенерации трансформированного растения из культуры трансформированных тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами.

В другом варианте осуществления молекулу нуклеиновой кислоты также можно вводить в растение с помощью селекции, в том числе самоопыления или ауткроссинга, таким образом, что потомство несет молекулу нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления способ будет предусматривать стадии а) получения фертильного трансгенного растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1; б) выращивания указанного растения в подходящих условиях с получением указанного трансгенного семени. В другом варианте осуществления способ будет предусматривать стадии а) получения фертильного трансгенного растения, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1; б) полового скрещивания трансгенного родительского растения со вторым родительским растением; с) отбора растения-потомка первого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами. Необязательно способ может предусматривать дополнительные стадии d) обеспечения самоопыления растения-потомка первого поколения с получением таким образом множества растений-потомков второго поколения; и e) отбора из растений-потомков второго поколения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, где растения-потомки второго поколения содержат молекулу нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 1 или молекулу нуклеиновой кислоты, которая является в значительной степени идентичной SEQ ID NO: 1, и растения-потомки второго поколения характеризуются улучшенными инсектицидными свойствами по сравнению с нетрансгенным растением.

### Примеры

Пример 1. Синтезированные конструкции.

Конструировали конструкции пяти бинарных векторов с различными комбинациями транскрипционных энхансеров, промоторов, трансляционных энхансеров и терминаторов и вариантами этих генетических элементов, управляющих экспрессией вариантов mCry3A и eCry3.1Ab. Все применяемые промоторы, как известно, являются сильными конститутивными промоторами, и ожидалось, что добавление транскрипционных и трансляционных энхансеров обеспечит у трансгенных растений превосходные уровни экспрессии и контроль насекомых. Варианты генов mCry3A и eCry3.1Ab получали с учетом различных предпочтений в отношении кодонов для уменьшения идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями. Участки идентичности нуклеотидной последовательности между генами mCry3A и eCry3.1Ab могут приводить к уменьшению экспрессии генов на транскрипционном или посттранскрипционном уровне. Следовательно, разработка нуклеотидных последовательностей с минимальной идентичностью может приводить к повышенной экспрессии одного или обоих генов mCry3A и eCry3.1Ab в трансгенном растении. В табл. 1 показаны пять полученных конструкций и перечни генетических элементов с каждой кодирующей последовательностью (CDS). В табл. 2 описан каждый из генетических элементов, обозначенных в табл. 1.

Таблица 1

## Состав бинарных конструкций

ID конструкции	Положение кассеты	Транскрипционный энхансер	Промотор	CDS	Терминатор
17629	1	eNOS-02	prCMP-04	eCry3.1Ab-01	tNOS-05-01
	2		prUbi1-18	mCry3A-01	tNOS-20
	3		pr35S-04	ePAT-08	tNOS-05-01
18382	1	eNOS-02	prCMP-09	eCry3.1Ab-03	tZmUbi158-01
	2		prUbi1-18	mCry3A-04	tZmUbi361-01
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21371	1	eNOS-03	prCMP-15	eCry3.1Ab-04	tNOS-25
	2		prUbi1-38	mCry3A-05	tNOS-25
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21629	1	eNOS-02	prCMP-04	eCry3.1Ab-01	tNOS-05-01
	2		prUbi1-38	mCry3A-05	tUbi1-05
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21630	1	eNOS-02	prCMP-04	eCry3.1Ab-01	tNOS-05-01
	2		prSoUbi4-01	mCry3A-05	t35S-09
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21386	1	eNOS-03	prCMP-15	eCry3.1Ab-04	tNOS-25
	2	eFMV-06:e35S-11	prUbi1-38	mCry3A-05	tNOS-25
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21648	1	eNOS-02	prCMP-04	eCry3.1Ab-05	tNOS-05-01
	2		prUbi1-38	mCry3A-05	tUbi1-05
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01
21649	1	eNOS-02	prCMP-04	eCry3.1Ab-05	tNOS-05-01
	2		prSoUbi4-01	mCry3A-05	t35S-09
	3		pr35S-19	ePAT-09	tNOS-05-01

Таблица 2

## Описание генетических элементов

Элемент	Название	Описание
Транскрипционный энхансер	eNOS-02	Модифицированный энхансер NOS из <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Транскрипционный энхансер	eFMV-06	Модифицированный энхансерный участок из вируса мозаики норичника (аналогичный таковому с номером доступа в NCBI X06166.1; Maiti <i>et al.</i> 1997, <i>Transgenic Res</i> 6: 143-156). Отличается от eFMV-03 изменениями в 3 п. о.
Транскрипционный энхансер	e35S-11	Энхансерный участок 35S вируса мозаики цветной капусты, который может активировать гетерологичные коровые промоторы (Ow <i>et al.</i> 1987, <i>PNAS</i> 84: 4870-4874). Отличается от e35S-05 изменениями в 2 п. о.
Промотор	pr35S-04	Модифицированный промоторный участок из вируса мозаики цветной капусты (Odell <i>et al.</i> 1985, <i>Nature</i> 313: 810-812).
Промотор	pr35S-19	Отличается от pr35S-04 изменениями в 4 нуклеотидах.
Промотор	prCMP-04	Промоторный участок вируса цеструма, вызывающего желтую курчавость листьев (Hohn <i>et al.</i> 2007; патент США № 7166770). Обеспечивает конститутивную экспрессию в маисе.
Промотор	prCMP-09	Отличается от prCMP-04 изменениями в 3 нуклеотидах.
Промотор	prCMP-15	Отличается от prCMP-04 изменениями в 5 нуклеотидах.
Промотор	prUbi1-18	Модифицированный промотор гена убиквитина маиса, аналогичный промотору полиубиквитина гена маиса, номер доступа в NCBI S944646.1; (Christensen <i>et al.</i> 1992, <i>PMB</i> 18: 675-689).
Промотор	prUbi1-38	Отличается от prUbi1-18 изменениями в 8 нуклеотидах.
Промотор	prSoUbi4-01	Промотор гена убиквитина сахарного тростника аналогичен гену тетраубиквитина сахарного тростника (ubi4), номер доступа в GenBank AF093504, патент США № 6706948.
Кодирующая последовательность	eCry3.1Ab-01	Сконструированный ген Cry, активный в отношении определенных видов кукурузного жука ( <i>Diabrotica</i> ). Патент США № 8309516
Кодирующая последовательность	eCry3.1Ab-03	Такой вариант eCry3.1Ab основан на eCry3.1Ab-01 и имеет такую же аминокислотную последовательность, однако предпочтение в отношении кодонов было изменено для сокращения применения наиболее часто

		используемых кодонов и уменьшения идентичности нуклеотидной последовательности с mCry3A и Cry1Ab. Нуклеотидную последовательность также оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Кодирующая последовательность	eCry3.1Ab-04	Такой вариант eCry3.1Ab основан на eCry3.1Ab-01 и имеет такую же аминокислотную последовательность, однако предпочтение в отношении кодонов было изменено с применением другой стратегии, чем для eCry3.1Ab-03, для сокращения применения наиболее часто используемых кодонов и уменьшения идентичности нуклеотидной последовательности с mCry3A и Cry1Ab. Нуклеотидную последовательность также оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Кодирующая последовательность	eCry3.1Ab-05	Такой вариант eCry3.1Ab основан на eCry3.1Ab-01 и имеет такую же аминокислотную последовательность, за исключением мутации S153T. Предпочтение в отношении кодонов было изменено с применением другой стратегии, чем для eCry3.1Ab-03 или eCry3.1Ab-04, для сокращения применения наиболее часто используемых кодонов и уменьшения идентичности нуклеотидной последовательности с mCry3A и Cry1Ab. Нуклеотидную последовательность также оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Кодирующая последовательность	mCry3A-01	Оптимизированный для маиса cry3A на основании нативной белковой последовательности Cry3A из <i>B. thuringiensis</i> подвиды <i>tenebrionis</i> (Sekar et al. 1987, <i>PNAS</i> 84: 7036-7040; патенты США №№ 7030295 и 7276583).
Кодирующая последовательность	mCry3A-04	Такой вариант mCry3A основан на mCry3A-01 и имеет такую же аминокислотную последовательность. Нуклеотидную последовательность оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Кодирующая последовательность	mCry3A-05	Такой вариант mCry3A основан на mCry3A-01 и имеет такую же аминокислотную последовательность, однако предпочтение в отношении кодонов было изменено для сокращения применения наиболее часто используемых кодонов и уменьшения идентичности нуклеотидной последовательности с eCry3.1Ab. Нуклеотидную последовательность также оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Кодирующая последовательность	cPAT-08	Модифицированный вариант гена от штамма Tü494 <i>Streptomyces viridochromogenes</i> , кодирующего селективируемый маркер PAT. Нативная кодирующая последовательность (Wohlleben et al. 1988, <i>Gene</i> 70: 25-37) была кодон-оптимизирована с целью усиленной экспрессии. PAT обеспечивает устойчивость к гербицидам, содержащим глифосинат (фосфинотрицин). (Патенты США №№ 5531236, 5646024, 5648477 и 5276268).
Кодирующая последовательность	cPAT-09	Отличается от cPAT-08 изменениями в 6 нуклеотидах; имеет такую же аминокислотную последовательность.
Терминатор	tNOS-05-01	Терминаторная последовательность из гена NOS <i>A. tumefaciens</i> (номер доступа в NCBI V00087.1). Образует сайт полиаденилирования (Bevan et al. 1983, <i>Nucleic Acids Res</i> 11: 369-385).
Терминатор	tNOS-20	Модифицированная терминаторная последовательность из гена NOS <i>A. tumefaciens</i> (номер доступа в NCBI V00087.1). Образует сайт полиаденилирования (Bevan et al. 1983).
Терминатор	tNOS-25	Отличается от tNOS-05-01 изменением в одном нуклеотиде.
Терминатор	tZmUbi158-01	Терминаторная последовательность из гена ZmU29158-3 убиквитина маиса. Публикация заявки на патент США № 13/377170.
Терминатор	tZmUbi361-01	Терминаторная последовательность из гена ZM066361 убиквитина маиса. Публикация заявки на патент США № 13/377170.
Терминатор	tUbi1-05	Терминаторная последовательность из гена Ubi1 <i>Zea mays</i> . Нуклеотидную последовательность оптимизировали для коммерческого применения и для соответствия требованиям государственных регулятивных норм.
Терминатор	t35S-09	Модифицированный терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты (Genbank V00141 J02048)

#### Пример 2. Трансформация в растениях кукурузы.

Каждую из восьми конструкций бинарных векторов применяли для создания трансгенных объектов маиса. Объекты получали при помощи опосредованной *Agrobacterium* трансформации запатентованной линии маиса. Незрелые зародыши трансформировали главным образом, как описано в Negrotto et al. (2000, *Plant Cell Reports* 19: 798-803). При помощи этого способа генетические элементы в пределах левой и правой граничных областей плазмиды для трансформации эффективно переносились и интегриро-

вались в геном растительной клетки, в то время как генетические элементы за пределами данных граничных областей не переносились.

Ген PAT применяли в качестве селективируемого маркера в ходе осуществления способа трансформации (Negrotto et al. 2000). Зародыши, образующие эмбриогенные каллюсы, переносили на ряд селективных сред для культивирования клеток, содержащих биалафос в качестве средства отбора, и в общей сложности культивировали в течение 10-11 недель. Селективные среды содержали 200 мг/мл тиментина и/или 10 мл/л PPM (смеси защитных средств для растений) для обеспечения удаления *Agrobacterium* из трансформированной ткани.

Регенерированные проростки тестировали в отношении присутствия гена PAT и других целевых генов с помощью ПЦР-анализа в реальном времени с применением TAQMAN®, разработанного Ingham et al. (Biotechniques 31(1): 132-4, 136-40, 2001). Растения, положительные в отношении гена PAT и целевых генов, также называемые объектами, переносили в теплицу для дальнейшего размножения.

Пример 3. Экспрессия генов, определяемая с помощью количественного "сэндвич" ELISA.

Для определения уровней экспрессии mCry3A и eCry3.1Ab выполняли количественный ELISA с применением дуплексного метода для определения количества белков mCry3A и eCry3.1Ab одновременно в одном и том же образце. Образцы получали из корней трансгенных объектов и экстрагировали в фосфатно-солевом буферном растворе с pH 7,3 (PBS), содержащем 0,05% Tween-20 (PBST). Общий растворимый белок (TSP) в экстракте измеряли с применением анализа для определения белков с помощью BCA от Pierce (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс). 96-луночные планшеты (Nunc Maxisorp) с высокой связывающей способностью покрывали с помощью 2 мкг/мл MAb170 к mCry3A в буфере. Планшеты промывали три раза фосфатно-солевым буферным раствором с pH 7,3 (PBS), содержащим 0,05% Tween-20 (PBST). В планшет добавляли образцы или стандартные образцы в разбавителе для ELISA (PBST, содержащем 1% альбумина бычьей сыворотки) (100 мкл/луночка), инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) со встряхиванием и промывали пять раз. В планшет добавляли 100 мкл/луночка 0,5 мкг/мл конъюгированного с HRP антитела кролика к Cry1Ab, 1 мкг/мл конъюгированного с биотином MAb174 к mCry3A и 0,1 мкг/мл конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (Jackson ImmunoResearch Labs, Вест-Грув, Пенсильвания) в разбавителе для ELISA, инкубировали в течение 1 ч при RT/встряхивании и промывали, как описано ранее. Добавляли субстрат п-нитрофенилфосфат (SurModics, Иден Прейри, Миннесота) (100 мкл/луночка) и позволяли проявиться цвету в течение 30 мин при комнатной температуре. Поглощение измеряли при 405 нм с помощью считывающего устройства для микропланшетов (BioTek Powerwave XS2, Винуски, Вермонт) для количественного определения mCry3A. Планшет промывали, как описано ранее. Добавляли субстрат тетраметилбензидин (Sigma, Сент-Луис, Миссури) (100 мкл/луночка) и позволяли проявиться цвету в течение 30 мин при комнатной температуре со встряхиванием. Реакцию останавливали с применением 1 н HCl (100 мкл/луночка). Поглощение измеряли при 450 нм для определения eCry3.1Ab. Для нормализации эффективности экстракции концентрацию анализируемого вещества (mCry3A или eCry3.1Ab) делили на концентрацию общего растворимого белка (TSP). Для стандартной кривой применяли четырехпараметрический подбор кривой для отложения на графике концентраций в зависимости от поглощения.

Таблица 3  
Обобщение данных по экспрессии mCry3A

ID конструкции	№ объектов	mCry3A в нг/TSP в мг (среднее значение)
17629	137	225
18382	20	628
21371	103	76
21629	181	38
21630	158	20
21386	42	46
21648	45	44
21649	197	80

Накопление белка mCry3A в среднем было наиболее высоким в объектах, полученных при трансформации бинарной конструкцией 18382. Трансгенные растения, полученные при трансформации бинарными конструкциями 21371, 21629, 21630, 21386, 21648 и 21649, характеризовались более низкой эффективностью по отношению к западному кукурузному жуку из-за низких уровней белка.

Таблица 4  
Обобщение данных по экспрессии eCry3.1Ab

ID конструкции	№ объектов	eCry3.1Ab в нг/TSP в мг (среднее значение)
17629	137	1177
18382	20	139
21371	103	47
21629	181	194
21630	158	223
21386	42	0
21648	45	204
21649	197	85

Количества белка eCry3.1Ab в среднем были наиболее высокими в объектах, полученных при трансформации бинарной конструкцией 17629. Удивительно, что объекты, полученные с остальными конструкциями, характеризовались намного меньшими количествами белка eCry3.1Ab.

Пример 4. Исследования эффективности объектов, содержащих трансгены 17629 и 18382.

В 49 трансгенных объектах кукурузы, содержащих трансген 17629, и 12 трансгенных объектах, содержащих трансген 18382, оценивали эффективность в отношении западного кукурузного жука в полевых условиях в двух различных гибридах (гибриды А и В) в общей сложности в 8 различных местах на территории Соединенных Штатов. Объекты высаживали на участки в три ряда с 3 повторами каждого. На 6 растений из центрального ряда были нанесены четырехдюймовые корневые повреждения, обусловленные питанием. В случае гибрида А, 21 из 49 объектов, содержащих трансген 17629, и 12 из 12 объектов, содержащих трансген 18382, характеризовались приемлемой эффективностью в отношении западного кукурузного жука при доверительном уровне 5%. В случае гибрида В, 31 из 49 объектов, содержащих трансген 17629, и 12 из 12 объектов, содержащих трансген 18382, характеризовались приемлемой эффективностью в отношении западного кукурузного жука.

Пример 5. Исследования агрономической эквивалентности объектов, содержащих трансгены 17629 и 18382.

В 49 трансгенных объектах кукурузы, содержащих трансген 17629, и 12 трансгенных объектах, содержащих трансген 18382, оценивали эффективность в отношении западного кукурузного жука в полевых условиях в двух различных гибридах (гибриды А и В) в общей сложности в 16 различных местах на территории Соединенных Штатов. Объекты высаживали на участки в два ряда с 3 повторами каждого. Урожай зерна определяли как количество бушелей на акр, и осуществляли анализ по определению среднего значения методом наименьших квадратов. В случае гибрида А все объекты, содержащие трансген 17629, продемонстрировали результат, сравнимый, по меньшей мере, с контрольным образцом, который представлял собой трансгенное растение, содержащее такой же трансген eCry3.1Ab, как и объект 5307. Однако в случае гибрида А 8 из 11 объектов, содержащих трансген 18382, продемонстрировали значительно худший результат, чем контрольный образец. В случае гибрида В все объекты, содержащие трансген 17629, продемонстрировали результат, сравнимый, по меньшей мере, с контрольным образцом. В случае гибрида В 1 из 11 объектов, содержащих трансген 18382, продемонстрировал значительно худший результат, чем контрольный образец. Удивительно, что несмотря на превосходные уровни белка mCry3A и белка eCry3.1Ab (как показано в табл. 3 и 4) и превосходную эффективность в полевых условиях, как описано в примере 4, объектов, полученных с применением вектора 18382, только объекты, полученные с применением вектора 17629, характеризовались как хорошей эффективностью, так и хорошей производительностью. Следовательно, только вектор 17629 удовлетворяет всем требованиям получения трансгенных объектов маиса с высокой производительностью.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в данном описании, являются показателем уровня компетентности специалистов в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все публикации и патентные заявки включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно включена посредством ссылки.

Хотя в целях ясности понимания вышеприведенное изобретение было довольно подробно описано посредством иллюстрации и примера, будет очевидно, что на практике можно осуществлять определенные изменения и модификации в пределах объема перечня вышеупомянутых вариантов осуществления и прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает экспрессию инсектицидных белков, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или комплементарной ей последовательности.

2. Молекула нуклеиновой кислоты по п.1, которая является выделенной молекулой нуклеиновой кислоты.

3. Химерная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

4. Рекомбинантный вектор на основе нуклеиновой кислоты для обеспечения экспрессии инсектицидных белков, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.1.

5. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4 для экспрессии инсектицидных свойств в клетке-хозяине.

6. Трансгенная клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4.

7. Трансгенная клетка-хозяин по п.6, где указанная клетка представляет собой бактериальную клетку или растительную клетку.

8. Клетка-хозяин по п.7, где бактериальная клетка представляет собой клетку *Escherichia coli*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Agrobacterium ssp.* или *Pseudomonas ssp.*

9. Трансгенное растение, обладающее инсектицидными свойствами, содержащее трансгенную растительную клетку по п.7.
10. Часть трансгенного растения, в том числе ткань растения, обладающая инсектицидными свойствами, содержащая трансгенную растительную клетку по п.7.
11. Клеточная культура трансгенного растения, обладающая инсектицидными свойствами, содержащая трансгенную растительную клетку по п.7.
12. Трансгенное растение по п.9, где указанное растение представляет собой однодольное растение.
13. Трансгенное растение по п.9, где указанное растение представляет собой двудольное растение.
14. Трансгенное растение по п.9, где указанное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, помидора, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя и масличного рапса.
15. Часть трансгенного растения по п.10, где указанное растение представляет собой однодольное растение.
16. Часть трансгенного растения по п.10, где указанное растение представляет собой двудольное растение.
17. Часть трансгенного растения по п.10, где указанное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, помидора, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя и масличного рапса.
18. Клеточная культура трансгенного растения по п.11, где указанное растение представляет собой однодольное растение.
19. Клеточная культура трансгенного растения по п.11, где указанное растение представляет собой двудольное растение.
20. Клеточная культура трансгенного растения по п.11, где указанное растение выбрано из группы, состоящей из маиса, сорго, пшеницы, подсолнечника, помидора, крестоцветных, овса, газонной травы, пастбищной травы, разновидностей перца, картофеля, хлопчатника, риса, сои, сахарного тростника, сахарной свеклы, табака, ячменя и масличного рапса.
21. Потомство растения по п.9 любого поколения, где потомство содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или ее комплементарной последовательности.
22. Семя трансгенного растения по п.9 любого поколения, где семя содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или ее комплементарной последовательности.
23. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий введение в растение молекулы нуклеиновой кислоты по п.1 с получением таким образом трансгенного растения, где молекула нуклеиновой кислоты экспрессирует белок в эффективных для контроля насекомых количествах.
24. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии:
- а) получения молекулы нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4;
  - б) введения в растение, культуру тканей или растительную клетку молекулы нуклеиновой кислоты из стадии (а) с получением трансформированного растения, культуры трансформированных тканей или трансформированной клетки, характеризующихся улучшенными инсектицидными свойствами; и
  - в) выращивания указанного трансформированного растения или обеспечения регенерации трансформированного растения из культуры трансформированных тканей или трансформированной растительной клетки с получением таким образом трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами.
25. Способ получения трансгенного семени, предусматривающий стадии:
- а) получения фертильного трансгенного растения по п.9 и
  - б) выращивания указанного растения в подходящих условиях с получением указанного трансгенного семени.
26. Способ получения потомства фертильного трансгенного растения любого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами, предусматривающий стадии:
- а) получения фертильного трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты по п.1;
  - б) сбора трансгенного семени от указанного трансгенного растения;
  - в) посадки собранного трансгенного семени и
  - г) выращивания трансгенных растений, являющихся потомством, из указанного семени, где указанное потомство характеризуется улучшенными инсектицидными свойствами по сравнению с нетрансформированным растением.
27. Способ получения трансгенного растения с улучшенными инсектицидными свойствами, преду-

смаатривающий стадии полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где указанное первое или второе родительское растение представляет собой растение по п.9, с получением растения-потомка первого поколения, которое содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или ее комплементарной последовательности.

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

а) полового скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением, где указанное первое или второе родительское растение представляет собой растение по п.9; и

б) отбора растения-потомка первого поколения с улучшенными инсектицидными свойствами, где отобранное растение-потомок содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или ее комплементарной последовательности.

29. Способ по п.28, дополнительно предусматривающий стадии:

с) обеспечения самоопыления растения-потомка первого поколения с получением таким образом множества растений-потомков второго поколения и

д) отбора из растений-потомков второго поколения растения с улучшенными инсектицидными свойствами, где отобранные растения-потомки второго поколения содержат последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1 или ее комплементарной последовательности.

