

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038923**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.10**

(21) Номер заявки  
**201792007**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.03.03**

(51) Int. Cl. *A01N 65/00* (2009.01)  
*C07K 14/415* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)

**(54) ИНСЕКТИЦИДНАЯ ДНК-КОНСТРУКЦИЯ И СПОСОБЫ ЕЁ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/131,564; 62/287,272**

(32) **2015.03.11; 2016.01.26**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2016/020642**

(87) **WO 2016/144688 2016.09.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ПАЙОНИР ХАЙ-БРЭД  
ИНТЕРНЭШНЛ, ИНК.; Е. И.  
ДЮПОН ДЕ НЕМУР ЭНД  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Дин Скотт Генри, Ху Сюй, Лю  
Альберт Л., Лю Лу, Преснэйл Джеймс  
Кевин, Сандал Гэри А., Шелленбергер  
Уте, У Гусуй (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2015134256  
WO-A1-2015130893  
WO-A1-2015130890  
WO-A2-2015038734  
WO-A2-2015023846  
US-A1-20140007292**

**CHEN et al. "Characterization of an  
Insecticidal Toxin and Pathogenicity of Pseudomonas  
taiwanensis against Insects," PLoS Pathogens, 21  
August 2014 (21.08.2014), Vol. 10, Iss. 8, e1004288,  
Pgs. 1-14, entire document**

(57) Предусматриваются композиции и способы для контроля вредителей. Способы включают трансформацию организмов одной или несколькими последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими инсектицидный(е) белок(и), и одним или несколькими элементами сайленсинга. В частности, последовательности нуклеиновой кислоты применимы для получения растений и микроорганизмов, которые обладают инсектицидной активностью. Таким образом, предусматриваются трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, растительные ткани и семена. Композиции представляют собой инсектицидные нуклеиновые кислоты и белки из видов бактерий. Последовательности находят применение при конструировании векторов экспрессии для последующей трансформации организмов, представляющих интерес, в том числе растений, в качестве зондов для выделения других гомологичных (или частично гомологичных) генов. Молекулярные пакеты и пакеты, полученные в результате скрещивания, находят применение при контроле, ингибировании роста или уничтожении популяций вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, грибов, полужесткокрылых и нематод и при получении композиций с инсектицидной активностью.

**B1****038923****038923****B1**

### **Ссылка на перечень последовательностей, представленный в электронном виде**

Перечень последовательностей с названием файла

"6578 sequence listing.txt", созданный 26 января 2016 г. и имеющий размер 587 Кбайт, подается в машиночитаемой форме одновременно с настоящим описанием. Перечень последовательностей является частью настоящего описания и в полном объеме включен в данный документ с помощью ссылки.

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на выдачу патента США № 62/131564, поданной 11 марта 2015 г., и предварительной заявки на выдачу патента США № 62/287272, поданной 26 января 2016 г.; обе из которых настоящим включены в данный документ в полном объеме с помощью ссылки.

### **Область изобретения**

Настоящее раскрытие относится к области молекулярной биологии. Предусматриваются пакеты генов полипептидов PIP-72, которые кодируют пестицидные белки и элементы сайленсинга. Данные пестицидные белки, признаки, обеспечивающие RNAi, и последовательности нуклеиновой кислоты, которые их кодируют, применимы в приготовлении пестицидных составов и в получении трансгенных растений, устойчивых к вредителям.

### **Предпосылки изобретения**

Биологический контроль насекомых-вредителей, имеющих сельскохозяйственное значение, с применением микробного агента, такого как грибы, бактерии или другие виды насекомых, представляет не оказывающую отрицательного влияния на окружающую среду и коммерчески привлекательную альтернативу синтетическим химическим пестицидам. В целом можно сказать, что применение биопестицидов приводит к меньшему риску загрязнения и неблагоприятных воздействий на окружающую среду, и биопестициды обеспечивают большую специфичность по отношению к мишени, чем та, которая характерна для традиционных химических инсектицидов широкого спектра действия. Кроме того, зачастую производство биопестицидов стоит дешевле, и вследствие этого улучшается экономически эффективный выход продукции для широкого спектра сельскохозяйственных культур.

Как известно, определенные виды микроорганизмов рода *Bacillus* обладают пестицидной активностью в отношении ряда насекомых-вредителей, в том числе *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera* и других. *Bacillus thuringiensis* (Bt) и *Bacillus popilliae* входят в число наиболее успешных средств биологического контроля, обнаруженных на сегодняшний день. Патогенность в отношении насекомых также приписывалась штаммам *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus* и *B. cereus*. Микробные инсектициды, в частности полученные из штаммов *Bacillus*, сыграли важную роль в сельском хозяйстве как альтернатива химическому контролю вредителей.

Были разработаны культурные растения с улучшенной устойчивостью к насекомым с помощью генной инженерии культурных растений для выработки пестицидных белков *Bacillus*. Например, с помощью генной инженерии были разработаны растения кукурузы и хлопчатника для выработки пестицидных белков, выделенных из штаммов Bt. Данные сельскохозяйственные культуры, разработанные с помощью генной инженерии, в настоящее время широко применяются в сельском хозяйстве и предоставляют фермеру не оказывающую отрицательного влияния на окружающую среду альтернативу традиционным способам контроля насекомых. В то время как они были признаны коммерчески очень успешными, данные разработанные с помощью генной инженерии устойчивые к насекомым культурные растения обеспечивают устойчивость только к узкому диапазону экономически важных насекомых-вредителей. В некоторых случаях насекомые могут развивать устойчивость к различным инсектицидным соединениям, что повышает необходимость в установлении альтернативных биологических средств контроля для контроля вредителей.

Соответственно остается необходимость в новых пестицидных белках с различными диапазонами инсектицидной активности в отношении насекомых-вредителей, например инсектицидных белках, которые активны в отношении ряда насекомых из отряда *Lepidoptera* и отряда *Coleoptera*, в том числе без ограничения насекомых-вредителей, которые развили устойчивость к существующим инсектицидам.

### **Краткое описание изобретения**

Предусматриваются композиции и способы обеспечения пестицидной активности у бактерий, растений, растительных клеток, тканей и семян. Композиции включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности пестицидных и инсектицидных полипептидов PIP-72, и полинуклеотиды, кодирующие элементы сайленсинга, обеспечивающие RNAi, векторы, содержащие такие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки-хозяева, содержащие векторы. Последовательности нуклеиновой кислоты можно применять в ДНК-конструкциях или кассетах экспрессии для трансформации и экспрессии в организмах, в том числе микроорганизмах и растениях. Нуклеотидные или аминокислотные последовательности могут представлять собой синтетические последовательности, которые были сконструированы для экспрессии в организме, в том числе без ограничения микроорганизме или растении. Композиции также содержат трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, ткани и семена.

В частности, предусматриваются выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды, инсектицидный белок-72 *Pseudomonas* (PIP-72). Дополнительно охваты-

ваются аминокислотные последовательности, соответствующие полипептидам PIP-72. Предусматриваются выделенные или рекомбинантные молекулы нуклеиновой кислоты, способные кодировать полипептид PIP-72 с SEQ ID NO: 849. Также охватываются последовательности нуклеиновой кислоты, которые комплементарны последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления или которые гибридизуются с последовательностью согласно вариантам осуществления. Также предусматриваются выделенные или рекомбинантные полипептиды PIP-72 с SEQ ID NO: 849.

Предусматриваются способы получения полипептидов PIP-72 и элементов сайленсинга, а также применения данных полипептидов и элементов сайленсинга для контроля или уничтожения вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, нематод, грибов и/или двукрылых. Трансгенные растения согласно вариантам осуществления экспрессируют один или несколько полипептидов PIP-72 и один или несколько элементов сайленсинга. В различных вариантах осуществления трансгенное растение дополнительно содержит один или несколько дополнительных генов для устойчивости к насекомым, например один или несколько дополнительных генов для контроля вредителей из группы жесткокрылых, чешуекрылых, полужесткокрылых или нематод. Трансгенное растение может дополнительно содержать любой ген, придающий агрономический признак, представляющий интерес.

Предусматриваются целевые полинуклеотиды, сайленсинг которых необходимо осуществить, или их активные варианты и фрагменты из публикаций заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 и US 2015/0257389. Предусматриваются элементы сайленсинга, разработанные с учетом этих целевых полинуклеотидов из публикаций заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 и US 2015/0257389, которые при поглощении вредителями уменьшают экспрессию одной или нескольких целевых последовательностей, и таким образом с их помощью осуществляют контроль вредителя (т.е. они обладают инсектицидной активностью). В одном варианте осуществления по настоящему изобретению одна или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды PIP-72, предоставлены в кассете с молекулярным пакетом или кассете экспрессии с одним или несколькими из последовательностей для сайленсинга, обеспечивающих целенаправленное воздействие, или элементов сайленсинга, указанных в публикации заявки на выдачу патента США с номером US 2014/0275208 или US 2015/0257389.

Композиции и способы согласно вариантам осуществления применимы для получения организмов с улучшенной устойчивостью к вредителям или переносимостью их. Эти организмы и композиции, содержащие организмы, подходят для сельскохозяйственных целей.

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

На фиг. 1 показан график, представляющий балл поражения узлов западным кукурузным жуком, питающимся на растениях T0, экспрессирующих пакетированную конструкцию, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга для RyanR (SEQ ID NO: 993), или на линии отрицательного контроля, HC69.

На фиг. 2 показан график, представляющий уровень экспрессии растением T0 элемента сайленсинга для RyanR в качестве пакетированной конструкции, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга для RyanR (SEQ ID NO: 993), или линией отрицательного контроля, HC69.

На фиг. 3 показан график, представляющий уровень экспрессии растением T0 PIP-72 в качестве пакетированной конструкции, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга для RyanR (SEQ ID NO: 993), или линией отрицательного контроля, HC69.

#### **Подробное описание изобретения**

Следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретными описанными методами, протоколами, клеточными линиями, родами и реагентами, в связи с этим они могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не подразумевается как ограничивающая объем настоящего раскрытия.

Используемая в данном документе форма единственного числа включает ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Так, например, ссылка на "клетку" включает множество таких клеток, и ссылка на "белок" включает ссылку на один или несколько белков и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д. Все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, как обычно понимается специалистом обычной квалификации в данной области, к которой принадлежит настоящее раскрытие, если явно не указано иное.

Настоящее раскрытие представляет композиции и способы для контроля вредителей. Способы включают трансформацию организмов последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга или другое пестицидное средство, которое раскрыто в данном документе. В частности, последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления применимы для получения растений и микроорганизмов, которые обладают пестицидной активностью. Таким образом, предусматриваются трансформированные бактерии, растения, растительные клетки, растительные ткани и семена. Композиции представляют собой пестицидные нуклеиновые кислоты и белки из видов бактерий. Последовательности нуклеиновой кислоты находят применение в конструировании

векторов экспрессии для последующей трансформации организмов, представляющих интерес. Полипептиды PIP-72 находят применение при контроле или уничтожении популяций вредителей из группы чешуекрылых, жесткокрылых, двукрылых, грибов, полужесткокрылых и нематод и при получении композиций с пестицидной активностью. Насекомые-вредители, представляющие интерес, включают без ограничения виды из отряда Lepidoptera, в том числе без ограничения моль капустную, например *Helicoverpa zea* Boddie; соевую совку, например *Pseudoplusia includens* Walker; гусеницу ночницы, питающуюся бобовыми, например *Anticarsia gemmatilis* Hubner, виды из отряда Coleoptera, в том числе без ограничения западного кукурузного жука (*Diabrotica virgifera*) - WCRW, блошку одиннадцатиточечную Говарда (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) -SCRW и северного кукурузного жука (*Diabrotica barberi*) - NCRW.

"Пестицидный белок" используется в данном документе для обозначения токсина, который характеризуется токсической активностью в отношении одного или нескольких вредителей, в том числе без ограничения представителей отрядов Lepidoptera, Diptera, Hemiptera и Coleoptera или типа Nematoda, или белка, который характеризуется гомологией с таким белком. Пестицидные белки были выделены из организмов, в том числе, например, *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Xenorhabdus* sp., *Clostridium bifermentans* и *Paenibacillus popilliae*. Пестицидные белки включают без ограничения инсектицидные белки из *Pseudomonas* sp., такие как PSEEN3174 (Monalysin; (2011) PLoS Pathogens 7:1-13); из штамма СНАО и Pf-5 *Pseudomonas protegens* (ранее *fluorescens*) (Pechy-Tarr, (2008) Environmental Microbiology 10:2368-2386; № доступа в GenBank EU400157); из *Pseudomonas Taiwanensis* (Liu, et al., (2010) J. Agric. Food Chem. 58:12343-12349) и из *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhang, et al., (2009) Annals of Microbiology 59:45-50 и Li, et al., (2007) Plant Cell Tiss. Organ Cult. 89:159-168); инсектицидные белки из *Photobacterium* sp. и *Xenorhabdus* sp. (Hinchliffe, et al., (2010) The Open Toxicology Journal 3:101-118 и Morgan, et al., (2001) Applied and Envir. Micro. 67:2062-2069); патент США № 6048838 и патент США № 6379946; полипептид PIP-1 из патентного документа США под серийным № 13/792861; полипептиды AfIP-1A и/или AfIP-1B из патентного документа США под серийным № 13/800233; полипептиды PNI-4 из патентного документа США под серийным № 13/839702; полипептиды PIP-47 из патентного документа США под серийным № 61/866747; инсектицидные белки из патентных документов США под серийными №№ 61/863761 и 61/863763; и  $\delta$ -эндотоксины, в том числе без ограничения класса генов  $\delta$ -эндотоксинов

*Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8,*

*Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry15, Cry16, Cry17,*

*Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry22, Cry23, Cry24, Cry25, Cry26,*

*Cry27, Cry 28, Cry 29, Cry 30, Cry31, Cry32, Cry33, Cry34,*

*Cry35, Cry36, Cry37, Cry38, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43,*

*Cry44, Cry45, Cry 46, Cry47, Cry49, Cry 51, Cry52, Cry 53, Cry*

*54, Cry55, Cry56, Cry57, Cry58, Cry59. Cry60, Cry61, Cry62,*

*Cry63, Cry64, Cry65, Cry66, Cry67, Cry68, Cry69, Cry70 и Cry71,*

а также цитолитические гены *B. thuringiensis cyt1* и *cyt2*. Члены данных классов инсектицидных белков *B. thuringiensis* включают без ограничения

*Cry1Aa1* (номер доступа AAA22353); *Cry1Aa2* (№

доступа № доступа AAA22552); *Cry1Aa3* (№ доступа BAA00257);

*Cry1Aa4* (№ доступа CAA31886); *Cry1Aa5* (№ доступа BAA04468);

*Cry1Aa6* (№ доступа AAA86265); *Cry1Aa7* (№ доступа AAD46139);

*Cry1Aa8* (№ доступа I26149); *Cry1Aa9* (№ доступа BAA77213);

*Cry1Aa10* (№ доступа AAD55382); *Cry1Aa11* (№ доступа CAA70856);

*Cry1Aa12* (№ доступа AAP80146); *Cry1Aa13* (№ доступа AAM44305);

*Cry1Aa14* (№ доступа AAP40639); *Cry1Aa15* (№ доступа AAY66993);

*Cry1Aa16* (№ доступа HQ439776); *Cry1Aa17* (№ доступа HQ439788);

Cry1Aa18 (№ доступа HQ439790); Cry1Aa19 (№ доступа HQ685121);  
Cry1Aa20 (№ доступа JF340156); Cry1Aa21 (№ доступа JN651496);  
Cry1Aa22 (№ доступа KC158223); Cry1Ab1 (№ доступа AAA22330);  
Cry1Ab2 (№ доступа AAA22613); Cry1Ab3 (№ доступа AAA22561);  
Cry1Ab4 (№ доступа BAA00071 ); Cry1Ab5 (№ доступа CAA28405);  
Cry1Ab6 (№ доступа AAA22420); Cry1Ab7 (№ доступа CAA31620);  
Cry1Ab8 (№ доступа AAA22551); Cry1Ab9 (№ доступа CAA38701);  
Cry1Ab10 (№ доступа A29125); Cry1Ab11 (№ доступа I12419);  
Cry1Ab12 (№ доступа AAC64003); Cry1Ab13 (№ доступа AAN76494);  
Cry1Ab14 (№ доступа AAG16877); Cry1Ab15 (№ доступа AAO13302);  
Cry1Ab16 (№ доступа AAK55546); Cry1Ab17 (№ доступа AAT46415);  
Cry1Ab18 (№ доступа AAQ88259); Cry1Ab19 (№ доступа AAW31761);  
Cry1Ab20 (№ доступа ABB72460); Cry1Ab21 (№ доступа ABS18384);  
Cry1Ab22 (№ доступа ABW87320); Cry1Ab23 (№ доступа HQ439777);  
Cry1Ab24 (№ доступа HQ439778); Cry1Ab25 (№ доступа HQ685122);  
Cry1Ab26 (№ доступа HQ847729); Cry1Ab27 (№ доступа JN135249);  
Cry1Ab28 (№ доступа JN135250); Cry1Ab29 (№ доступа JN135251);  
Cry1Ab30 (№ доступа JN135252); Cry1Ab31 (№ доступа JN135253);  
Cry1Ab32 (№ доступа JN135254); Cry1Ab33 (№ доступа AAS93798);  
Cry1Ab34 (№ доступа KC156668); Cry1Ab-подобный (№ доступа  
AAK14336); Cry1Ab-подобный (№ доступа AAK14337); Cry1Ab-подобный  
(№ доступа AAK14338); Cry1Ab-подобный (№ доступа ABG88858);  
Cry1Ac1 (№ доступа AAA22331); Cry1Ac2 (№ доступа AAA22338);  
Cry1Ac3 (№ доступа CAA38098); Cry1Ac4 (№ доступа AAA73077);  
Cry1Ac5 (№ доступа AAA22339); Cry1Ac6 (№ доступа AAA86266);  
Cry1Ac7 (№ доступа AAB46989); Cry1Ac8 (№ доступа AAC44841);  
Cry1Ac9 (№ доступа AAB49768); Cry1Ac10 (№ доступа CAA05505 );  
Cry1Ac11 (№ доступа CAA10270); Cry1Ac12 (№ доступа I12418);  
Cry1Ac13 (№ доступа AAD38701); Cry1Ac14 (№ доступа AAQ06607);  
Cry1Ac15 (№ доступа AAN07788); Cry1Ac16 (№ доступа AAU87037);  
Cry1Ac17 (№ доступа AAX18704); Cry1Ac18 (№ доступа AAY88347);  
Cry1Ac19 (№ доступа ABD37053); Cry1Ac20 (№ доступа ABB89046 );  
Cry1Ac21 (№ доступа AAY66992 ); Cry1Ac22 (№ доступа ABZ01836);  
Cry1Ac23 (№ доступа CAQ30431); Cry1Ac24 (№ доступа ABL01535);  
Cry1Ac25 (№ доступа FJ513324); Cry1Ac26 (№ доступа FJ617446);  
Cry1Ac27 (№ доступа FJ617447); Cry1Ac28 (№ доступа ACM90319);

Cry1Aa18 (№ доступа HQ439790); Cry1Aa19 (№ доступа HQ685121);  
Cry1Aa20 (№ доступа JF340156); Cry1Aa21 (№ доступа JN651496);  
Cry1Aa22 (№ доступа KC158223); Cry1Ab1 (№ доступа AAA22330);  
Cry1Ab2 (№ доступа AAA22613); Cry1Ab3 (№ доступа AAA22561);  
Cry1Ab4 (№ доступа BAA00071 ); Cry1Ab5 (№ доступа CAA28405);  
Cry1Ab6 (№ доступа AAA22420); Cry1Ab7 (№ доступа CAA31620);  
Cry1Ab8 (№ доступа AAA22551); Cry1Ab9 (№ доступа CAA38701);  
Cry1Ab10 (№ доступа A29125); Cry1Ab11 (№ доступа I12419);  
Cry1Ab12 (№ доступа AAC64003); Cry1Ab13 (№ доступа AAN76494);  
Cry1Ab14 (№ доступа AAG16877); Cry1Ab15 (№ доступа AA013302);  
Cry1Ab16 (№ доступа AAK55546); Cry1Ab17 (№ доступа AAT46415);  
Cry1Ab18 (№ доступа AAQ88259); Cry1Ab19 (№ доступа AAW31761);  
Cry1Ab20 (№ доступа ABB72460); Cry1Ab21 (№ доступа ABS18384);  
Cry1Ab22 (№ доступа ABW87320); Cry1Ab23 (№ доступа HQ439777);  
Cry1Ab24 (№ доступа HQ439778); Cry1Ab25 (№ доступа HQ685122);  
Cry1Ab26 (№ доступа HQ847729); Cry1Ab27 (№ доступа JN135249);  
Cry1Ab28 (№ доступа JN135250); Cry1Ab29 (№ доступа JN135251);  
Cry1Ab30 (№ доступа JN135252); Cry1Ab31 (№ доступа JN135253);  
Cry1Ab32 (№ доступа JN135254); Cry1Ab33 (№ доступа AAS93798);  
Cry1Ab34 (№ доступа KC156668); Cry1Ab-подобный (№ доступа  
AAK14336); Cry1Ab-подобный (№ доступа AAK14337); Cry1Ab-подобный  
(№ доступа AAK14338); Cry1Ab-подобный (№ доступа ABG88858);  
Cry1Ac1 (№ доступа AAA22331); Cry1Ac2 (№ доступа AAA22338);  
Cry1Ac3 (№ доступа CAA38098); Cry1Ac4 (№ доступа AAA73077);  
Cry1Ac5 (№ доступа AAA22339); Cry1Ac6 (№ доступа AAA86266);  
Cry1Ac7 (№ доступа AAB46989); Cry1Ac8 (№ доступа AAC44841);  
Cry1Ac9 (№ доступа AAB49768); Cry1Ac10 (№ доступа CAA05505 );  
Cry1Ac11 (№ доступа CAA10270); Cry1Ac12 (№ доступа I12418);  
Cry1Ac13 (№ доступа AAD38701); Cry1Ac14 (№ доступа AAQ06607);  
Cry1Ac15 (№ доступа AAN07788); Cry1Ac16 (№ доступа AAU87037);  
Cry1Ac17 (№ доступа AAX18704); Cry1Ac18 (№ доступа AAY88347);  
Cry1Ac19 (№ доступа ABD37053); Cry1Ac20 (№ доступа ABB89046 );  
Cry1Ac21 (№ доступа AAY66992 ); Cry1Ac22 (№ доступа ABZ01836);  
Cry1Ac23 (№ доступа CAQ30431); Cry1Ac24 (№ доступа ABL01535);  
Cry1Ac25 (№ доступа FJ513324); Cry1Ac26 (№ доступа FJ617446);  
Cry1Ac27 (№ доступа FJ617447); Cry1Ac28 (№ доступа ACM90319);

Cry1Ac29 (№ доступа DQ438941); Cry1Ac30 (№ доступа GQ227507);  
Cry1Ac31 (№ доступа GU446674); Cry1Ac32 (№ доступа HM061081);  
Cry1Ac33 (№ доступа GQ866913); Cry1Ac34 (№ доступа HQ230364);  
Cry1Ac35 (№ доступа JF340157); Cry1Ac36 (№ доступа JN387137);  
Cry1Ac37 (№ доступа JQ317685); Cry1Ad1 (№ доступа AAA22340);  
Cry1Ad2 (№ доступа CAA01880); Cry1Ae1 (№ доступа AAA22410);  
Cry1Af1 (№ доступа AAB82749); Cry1Ag1 (№ доступа AAD46137);  
Cry1Ah1 (№ доступа AAQ14326); Cry1Ah2 (№ доступа ABB76664);  
Cry1Ah3 (№ доступа HQ439779); Cry1Ai1 (№ доступа AA039719);  
Cry1Ai2 (№ доступа HQ439780); Cry1A-подобный (№ доступа  
AAK14339); Cry1Ba1 (№ доступа CAA29898); Cry1Ba2 (№ доступа  
CAA65003); Cry1Ba3 (№ доступа AAK63251); Cry1Ba4 (№ доступа  
AAK51084); Cry1Ba5 (№ доступа ABO20894); Cry1Ba6 (№ доступа  
ABL60921); Cry1Ba7 (№ доступа HQ439781); Cry1Bb1 (№ доступа  
AAA22344); Cry1Bb2 (№ доступа HQ439782); Cry1Bc1 (№ доступа  
CAA86568); Cry1Bd1 (№ доступа AAD10292); Cry1Bd2 (№ доступа  
AAM93496); Cry1Be1 (№ доступа AAC32850); Cry1Be2 (№ доступа  
AAQ52387); Cry1Be3 (№ доступа ACV96720); Cry1Be4 (№ доступа  
HM070026); Cry1Bf1 (№ доступа CAC50778); Cry1Bf2 (№ доступа  
AAQ52380); Cry1Bg1 (№ доступа AA039720); Cry1Bh1 (№ доступа  
HQ589331); Cry1Bi1 (№ доступа KC156700); Cry1Ca1 (№ доступа  
CAA30396); Cry1Ca2 (№ доступа CAA31951); Cry1Ca3 (№ доступа  
AAA22343); Cry1Ca4 (№ доступа CAA01886); Cry1Ca5 (№ доступа  
CAA65457); Cry1Ca6 [1] (№ доступа AAF37224 ); Cry1Ca7 (№ доступа  
AAG50438); Cry1Ca8 (№ доступа AAM00264); Cry1Ca9 (№ доступа  
AAL79362); Cry1Ca10 (№ доступа AAN16462); Cry1Ca11 (№ доступа  
AAX53094); Cry1Ca12 (№ доступа HM070027); Cry1Ca13 (№ доступа  
HQ412621); Cry1Ca14 (№ доступа JN651493); Cry1Cb1 (№ доступа  
M97880); Cry1Cb2 (№ доступа AAG35409); Cry1Cb3 (№ доступа  
ACD50894 ); Cry1Cb-подобный (№ доступа AAX63901); Cry1Da1 (№  
доступа CAA38099); Cry1Da2 (№ доступа I76415); Cry1Da3 (№  
доступа HQ439784); Cry1Db1 (№ доступа CAA80234 ); Cry1Db2 (№  
доступа AAK48937 ); Cry1Dc1 (№ доступа ABK35074); Cry1Ea1 (№  
доступа CAA37933); Cry1Ea2 (№ доступа CAA39609); Cry1Ea3 (№  
доступа AAA22345); Cry1Ea4 (№ доступа AAD04732); Cry1Ea5 (№  
доступа A15535); Cry1Ea6 (№ доступа AAL50330); Cry1Ea7 (№

**038923**

доступа AAW72936); Cry1Ea8 (№ доступа ABX11258); Cry1Ea9 (№  
доступа HQ439785); Cry1Ea10 (№ доступа ADR00398); Cry1Ea11 (№  
доступа JQ652456); Cry1Eb1 (№ доступа AAA22346); Cry1Fa1 (№  
доступа AAA22348); Cry1Fa2 (№ доступа AAA22347); Cry1Fa3 (№  
доступа HM070028); Cry1Fa4 (№ доступа HM439638); Cry1Fb1 (№  
доступа CAA80235); Cry1Fb2 (№ доступа BAA25298); Cry1Fb3 (№  
доступа AAF21767); Cry1Fb4 (№ доступа AAC10641); Cry1Fb5 (№  
доступа AA013295); Cry1Fb6 (№ доступа ACD50892); Cry1Fb7 (№  
доступа ACD50893); Cry1Ga1 (№ доступа CAA80233); Cry1Ga2 (№  
доступа CAA70506); Cry1Gb1 (№ доступа AAD10291); Cry1Gb2 (№  
доступа AA013756); Cry1Gc1 (№ доступа AAQ52381); Cry1Ha1 (№  
доступа CAA80236); Cry1Hb1 (№ доступа AAA79694); Cry1Hb2 (№  
доступа HQ439786); Cry1H-подобный (№ доступа AAF01213); Cry1Ia1  
(№ доступа CAA44633); Cry1Ia2 (№ доступа AAA22354); Cry1Ia3 (№  
доступа AAC36999); Cry1Ia4 (№ доступа AAB00958); Cry1Ia5 (№  
доступа CAA70124); Cry1Ia6 (№ доступа AAC26910); Cry1Ia7 (№  
доступа AAM73516); Cry1Ia8 (№ доступа AAK66742); Cry1Ia9 (№  
доступа AAQ08616); Cry1Ia10 (№ доступа AAP86782); Cry1Ia11 (№  
доступа CAC85964 ); Cry1Ia12 (№ доступа AAV53390); Cry1Ia13 (№  
доступа ABF83202); Cry1Ia14 (№ доступа ACG63871); Cry1Ia15 (№  
доступа FJ617445); Cry1Ia16 (№ доступа FJ617448); Cry1Ia17 (№  
доступа GU989199); Cry1Ia18 (№ доступа ADK23801); Cry1Ia19 (№  
доступа HQ439787); Cry1Ia20 (№ доступа JQ228426); Cry1Ia21 (№  
доступа JQ228424); Cry1Ia22 (№ доступа JQ228427); Cry1Ia23 (№  
доступа JQ228428); Cry1Ia24 (№ доступа JQ228429); Cry1Ia25 (№  
доступа JQ228430); Cry1Ia26 (№ доступа JQ228431); Cry1Ia27 (№  
доступа JQ228432); Cry1Ia28 (№ доступа JQ228433); Cry1Ia29 (№  
доступа JQ228434); Cry1Ia30 (№ доступа JQ317686); Cry1Ia31 (№  
доступа JX944038); Cry1Ia32 (№ доступа JX944039); Cry1Ia33 (№  
доступа JX944040); Cry1Ib1 (№ доступа AAA82114); Cry1Ib2 (№  
доступа ABW88019); Cry1Ib3 (№ доступа ACD75515); Cry1Ib4 (№  
доступа HM051227); Cry1Ib5 (№ доступа HM070028); Cry1Ib6 (№  
доступа ADK38579); Cry1Ib7 (№ доступа JN571740); Cry1Ib8 (№  
доступа JN675714); Cry1Ib9 (№ доступа JN675715); Cry1Ib10 (№  
доступа JN675716); Cry1Ib11 (№ доступа JQ228423); Cry1Ic1 (№  
доступа AAC62933); Cry1Ic2 (№ доступа AAE71691); Cry1Id1 (№

**038923**

доступа AAD44366); Cry1Id2 (№ доступа JQ228422); Cry1Ie1 (№ доступа AAG43526); Cry1Ie2 (№ доступа HM439636); Cry1Ie3 (№ доступа KC156647); Cry1Ie4 (№ доступа KC156681); Cry1If1 (№ доступа AAQ52382); Cry1Ig1 (№ доступа KC156701); Cry1I-подобный (№ доступа AAC31094); Cry1I-подобный (№ доступа ABG88859); Cry1Ja1 (№ доступа AAA22341); Cry1Ja2 (№ доступа HM070030); Cry1Ja3 (№ доступа JQ228425); Cry1Jb1 (№ доступа AAA98959); Cry1Jc1 (№ доступа AAC31092); Cry1Jc2 (№ доступа AAQ52372); Cry1Jd1 (№ доступа CAC50779); Cry1Ka1 (№ доступа AAB00376); Cry1Ka2 (№ доступа HQ439783); Cry1La1 (№ доступа AAS60191); Cry1La2 (№ доступа HM070031); Cry1Ma1 (№ доступа FJ884067); Cry1Ma2 (№ доступа KC156659); Cry1Na1 (№ доступа KC156648); Cry1Nb1 (№ доступа KC156678); Cry1-подобный (№ доступа AAC31091); Cry2Aa1 (№ доступа AAA22335); Cry2Aa2 (№ доступа AAA83516); Cry2Aa3 (№ доступа D86064); Cry2Aa4 (№ доступа AAC04867); Cry2Aa5 (№ доступа CAA10671); Cry2Aa6 (№ доступа CAA10672); Cry2Aa7 (№ доступа CAA10670); Cry2Aa8 (№ доступа AA013734); Cry2Aa9 (№ доступа AA013750 ); Cry2Aa10 (№ доступа AAQ04263); Cry2Aa11 (№ доступа AAQ52384); Cry2Aa12 (№ доступа ABI83671); Cry2Aa13 (№ доступа ABL01536); Cry2Aa14 (№ доступа ACF04939); Cry2Aa15 (№ доступа JN426947); Cry2Ab1 (№ доступа AAA22342); Cry2Ab2 (№ доступа CAA39075); Cry2Ab3 (№ доступа AAG36762); Cry2Ab4 (№ доступа AA013296 ); Cry2Ab5 (№ доступа AAQ04609); Cry2Ab6 (№ доступа AAP59457); Cry2Ab7 (№ доступа AAZ66347); Cry2Ab8 (№ доступа ABC95996); Cry2Ab9 (№ доступа ABC74968); Cry2Ab10 (№ доступа EF157306); Cry2Ab11 (№ доступа CAM84575); Cry2Ab12 (№ доступа ABM21764); Cry2Ab13 (№ доступа ACG76120); Cry2Ab14 (№ доступа ACG76121); Cry2Ab15 (№ доступа HM037126); Cry2Ab16 (№ доступа GQ866914); Cry2Ab17 (№ доступа HQ439789); Cry2Ab18 (№ доступа JN135255); Cry2Ab19 (№ доступа JN135256); Cry2Ab20 (№ доступа JN135257); Cry2Ab21 (№ доступа JN135258); Cry2Ab22 (№ доступа JN135259); Cry2Ab23 (№ доступа JN135260); Cry2Ab24 (№ доступа JN135261); Cry2Ab25 (№ доступа JN415485); Cry2Ab26 (№ доступа JN426946); Cry2Ab27 (№ доступа JN415764); Cry2Ab28 (№ доступа JN651494); Cry2Ac1 (№ доступа CAA40536); Cry2Ac2 (№ доступа AAG35410); Cry2Ac3 (№ доступа

AAQ52385); Cry2Ac4 (№ доступа ABC95997); Cry2Ac5 (№ доступа ABC74969); Cry2Ac6 (№ доступа ABC74793); Cry2Ac7 (№ доступа CAL18690); Cry2Ac8 (№ доступа CAM09325); Cry2Ac9 (№ доступа CAM09326); Cry2Ac10 (№ доступа ABN15104); Cry2Ac11 (№ доступа CAM83895); Cry2Ac12 (№ доступа CAM83896); Cry2Ad1 (№ доступа AAF09583); Cry2Ad2 (№ доступа ABC86927); Cry2Ad3 (№ доступа CAK29504); Cry2Ad4 (№ доступа CAM32331); Cry2Ad5 (№ доступа CAO78739 ); Cry2Ae1 (№ доступа AAQ52362); Cry2Af1 (№ доступа ABO30519); Cry2Af2 (№ доступа GQ866915); Cry2Ag1 (№ доступа ACH91610); Cry2Ah1 (№ доступа EU939453); Cry2Ah2 (№ доступа ACL80665); Cry2Ah3 (№ доступа GU073380); Cry2Ah4 (№ доступа KC156702); Cry2Ai1 (№ доступа FJ788388); Cry2Aj (№ доступа ); Cry2Ak1 (№ доступа KC156660); Cry2Ba1 (№ доступа KC156658); Cry3Aa1 (№ доступа AAA22336); Cry3Aa2 (№ доступа AAA22541); Cry3Aa3 (№ доступа CAA68482); Cry3Aa4 (№ доступа AAA22542); Cry3Aa5 (№ доступа AAA50255); Cry3Aa6 (№ доступа AAC43266); Cry3Aa7 (№ доступа CAB41411); Cry3Aa8 (№ доступа AAS79487); Cry3Aa9 (№ доступа AAW05659); Cry3Aa10 (№ доступа AAU29411); Cry3Aa11 (№ доступа AAW82872); Cry3Aa12 (№ доступа ABY49136 ); Cry3Ba1 (№ доступа CAA34983); Cry3Ba2 (№ доступа CAA00645); Cry3Ba3 (№ доступа JQ397327); Cry3Bb1 (№ доступа AAA22334); Cry3Bb2 (№ доступа AAA74198); Cry3Bb3 (№ доступа I15475); Cry3Ca1 (№ доступа CAA42469); Cry4Aa1 (№ доступа CAA68485); Cry4Aa2 (№ доступа BAA00179); Cry4Aa3 (№ доступа CAD30148); Cry4Aa4 (№ доступа AFB18317); Cry4A-подобный (№ доступа AAY96321); Cry4Ba1 (№ доступа CAA30312); Cry4Ba2 (№ доступа CAA30114); Cry4Ba3 (№ доступа AAA22337); Cry4Ba4 (№ доступа BAA00178); Cry4Ba5 (№ доступа CAD30095); Cry4Ba-подобный (№ доступа ABC47686); Cry4Ca1 (№ доступа EU646202); Cry4Cb1 (№ доступа FJ403208); Cry4Cb2 (№ доступа FJ597622); Cry4Cc1 (№ доступа FJ403207); Cry5Aa1 (№ доступа AAA67694); Cry5Ab1 (№ доступа AAA67693); Cry5Ac1 (№ доступа I34543); Cry5Ad1 (№ доступа ABQ82087); Cry5Ba1 (№ доступа AAA68598); Cry5Ba2 (№ доступа ABW88931); Cry5Ba3 (№ доступа AFJ04417); Cry5Ca1 (№ доступа HM461869); Cry5Ca2 (№ доступа ZP\_04123426); Cry5Da1 (№ доступа HM461870); Cry5Da2 (№ доступа ZP\_04123980); Cry5Ea1 (№

доступа HM485580); Cry5Ea2 (№ доступа ZP\_04124038); Cry6Aa1 (№  
доступа AAA22357); Cry6Aa2 (№ доступа AAM46849); Cry6Aa3 (№  
доступа ABH03377); Cry6Ba1 (№ доступа AAA22358); Cry7Aa1 (№  
доступа AAA22351); Cry7Ab1 (№ доступа AAA21120); Cry7Ab2 (№  
доступа AAA21121); Cry7Ab3 (№ доступа ABX24522); Cry7Ab4 (№  
доступа EU380678); Cry7Ab5 (№ доступа ABX79555); Cry7Ab6 (№  
доступа ACI44005); Cry7Ab7 (№ доступа ADB89216); Cry7Ab8 (№  
доступа GU145299); Cry7Ab9 (№ доступа ADD92572); Cry7Ba1 (№  
доступа ABB70817); Cry7Bb1 (№ доступа KC156653); Cry7Ca1 (№  
доступа ABR67863); Cry7Cb1 (№ доступа KC156698); Cry7Da1 (№  
доступа ACQ99547); Cry7Da2 (№ доступа HM572236); Cry7Da3 (№  
доступа KC156679); Cry7Ea1 (№ доступа HM035086); Cry7Ea2 (№  
доступа HM132124); Cry7Ea3 (№ доступа EEM19403); Cry7Fa1 (№  
доступа HM035088); Cry7Fa2 (№ доступа EEM19090); Cry7Fb1 (№  
доступа HM572235); Cry7Fb2 (№ доступа KC156682); Cry7Ga1 (№  
доступа HM572237); Cry7Ga2 (№ доступа KC156669); Cry7Gb1 (№  
доступа KC156650); Cry7Gc1 (№ доступа KC156654); Cry7Gd1 (№  
доступа KC156697); Cry7Ha1 (№ доступа KC156651); Cry7Ia1 (№  
доступа KC156665); Cry7Ja1 (№ доступа KC156671); Cry7Ka1 (№  
доступа KC156680); Cry7Kb1 (№ доступа BAM99306); Cry7La1 (№  
доступа BAM99307); Cry8Aa1 (№ доступа AAA21117); Cry8Ab1 (№  
доступа EU044830); Cry8Ac1 (№ доступа KC156662); Cry8Ad1 (№  
доступа KC156684); Cry8Ba1 (№ доступа AAA21118); Cry8Bb1 (№  
доступа CAD57542); Cry8Bc1 (№ доступа CAD57543); Cry8Ca1 (№  
доступа AAA21119); Cry8Ca2 (№ доступа AAR98783); Cry8Ca3 (№  
доступа EU625349); Cry8Ca4 (№ доступа ADB54826); Cry8Da1 (№  
доступа BAC07226); Cry8Da2 (№ доступа BD133574); Cry8Da3 (№  
доступа BD133575); Cry8Db1 (№ доступа BAF93483); Cry8Ea1 (№  
доступа AAQ73470); Cry8Ea2 (№ доступа EU047597); Cry8Ea3 (№  
доступа KC855216); Cry8Fa1 (№ доступа AAT48690); Cry8Fa2 (№  
доступа HQ174208); Cry8Fa3 (№ доступа AFH78109); Cry8Ga1 (№  
доступа AAT46073); Cry8Ga2 (№ доступа ABC42043); Cry8Ga3 (№  
доступа FJ198072); Cry8Ha1 (№ доступа AAW81032); Cry8Ia1 (№  
доступа EU381044); Cry8Ia2 (№ доступа GU073381); Cry8Ia3 (№  
доступа HM044664); Cry8Ia4 (№ доступа KC156674); Cry8Ib1 (№  
доступа GU325772); Cry8Ib2 (№ доступа KC156677); Cry8Ja1 (№

доступа EU625348); Cry8Ka1 (№ доступа FJ422558); Cry8Ka2 (№ доступа ACN87262); Cry8Kb1 (№ доступа HM123758); Cry8Kb2 (№ доступа KC156675); Cry8La1 (№ доступа GU325771); Cry8Ma1 (№ доступа HM044665); Cry8Ma2 (№ доступа EEM86551); Cry8Ma3 (№ доступа HM210574); Cry8Na1 (№ доступа HM640939); Cry8Pa1 (№ доступа HQ388415); Cry8Qa1 (№ доступа HQ441166); Cry8Qa2 (№ доступа KC152468); Cry8Ra1 (№ доступа AFP87548); Cry8Sa1 (№ доступа JQ740599); Cry8Ta1 (№ доступа KC156673); Cry8-подобный (№ доступа FJ770571); Cry8-подобный (№ доступа ABS53003); Cry9Aa1 (№ доступа CAA41122); Cry9Aa2 (№ доступа CAA41425); Cry9Aa3 (№ доступа GQ249293); Cry9Aa4 (№ доступа GQ249294); Cry9Aa5 (№ доступа JX174110); Cry9Aa подобный (№ доступа AAQ52376); Cry9Ba1 (№ доступа CAA52927); Cry9Ba2 (№ доступа GU299522); Cry9Bb1 (№ доступа AAV28716); Cry9Ca1 (№ доступа CAA85764); Cry9Ca2 (№ доступа AAQ52375); Cry9Da1 (№ доступа BAA19948); Cry9Da2 (№ доступа AAB97923); Cry9Da3 (№ доступа GQ249293); Cry9Da4 (№ доступа GQ249297); Cry9Db1 (№ доступа AAX78439); Cry9Dc1 (№ доступа KC156683); Cry9Ea1 (№ доступа BAA34908); Cry9Ea2 (№ доступа AA012908); Cry9Ea3 (№ доступа ABM21765); Cry9Ea4 (№ доступа ACE88267); Cry9Ea5 (№ доступа ACF04743); Cry9Ea6 (№ доступа ACG63872); Cry9Ea7 (№ доступа FJ380927); Cry9Ea8 (№ доступа GQ249292); Cry9Ea9 (№ доступа JN651495); Cry9Eb1 (№ доступа CAC50780); Cry9Eb2 (№ доступа GQ249298); Cry9Eb3 (№ доступа KC156646); Cry9Ec1 (№ доступа AAC63366); Cry9Ed1 (№ доступа AAX78440); Cry9Ee1 (№ доступа GQ249296); Cry9Ee2 (№ доступа KC156664); Cry9Fa1 (№ доступа KC156692); Cry9Ga1 (№ доступа KC156699); Cry9-подобный (№ доступа AAC63366); Cry10Aa1 (№ доступа AAA22614); Cry10Aa2 (№ доступа E00614); Cry10Aa3 (№ доступа CAD30098); Cry10Aa4 (№ доступа AFB18318); Cry10A-подобный (№ доступа DQ167578); Cry11Aa1 (№ доступа AAA22352); Cry11Aa2 (№ доступа AAA22611); Cry11Aa3 (№ доступа CAD30081); Cry11Aa4 (№ доступа AFB18319); Cry11Aa-подобный (№ доступа DQ166531); Cry11Ba1 (№ доступа CAA60504); Cry11Bb1 (№ доступа AAC97162); Cry11Bb2 (№ доступа HM068615); Cry12Aa1 (№ доступа AAA22355); Cry13Aa1 (№ доступа AAA22356); Cry14Aa1 (№ доступа AAA21516); Cry14Ab1 (№ доступа

KC156652); Cry15Aa1 (№ доступа AAA22333); Cry16Aa1 (№ доступа CAA63860); Cry17Aa1 (№ доступа CAA67841); Cry18Aa1 (№ доступа CAA67506); Cry18Ba1 (№ доступа AAF89667); Cry18Ca1 (№ доступа AAF89668); Cry19Aa1 (№ доступа CAA68875); Cry19Ba1 (№ доступа BAA32397); Cry19Ca1 (№ доступа AFM37572); Cry20Aa1 (№ доступа AAB93476); Cry20Ba1 (№ доступа ACS93601); Cry20Ba2 (№ доступа KC156694); Cry20-подобный (№ доступа GQ144333); Cry21Aa1 (№ доступа I32932); Cry21Aa2 (№ доступа I66477); Cry21Ba1 (№ доступа BAC06484); Cry21Ca1 (№ доступа JF521577); Cry21Ca2 (№ доступа KC156687); Cry21Da1 (№ доступа JF521578); Cry22Aa1 (№ доступа I34547); Cry22Aa2 (№ доступа CAD43579); Cry22Aa3 (№ доступа ACD93211); Cry22Ab1 (№ доступа AAK50456); Cry22Ab2 (№ доступа CAD43577); Cry22Ba1 (№ доступа CAD43578); Cry22Bb1 (№ доступа KC156672); Cry23Aa1 (№ доступа AAF76375); Cry24Aa1 (№ доступа AAC61891); Cry24Ba1 (№ доступа BAD32657); Cry24Ca1 (№ доступа CAJ43600); Cry25Aa1 (№ доступа AAC61892); Cry26Aa1 (№ доступа AAD25075); Cry27Aa1 (№ доступа BAA82796); Cry28Aa1 (№ доступа AAD24189); Cry28Aa2 (№ доступа AAG00235); Cry29Aa1 (№ доступа CAC80985); Cry30Aa1 (№ доступа CAC80986); Cry30Ba1 (№ доступа BAD00052); Cry30Ca1 (№ доступа BAD67157); Cry30Ca2 (№ доступа ACU24781); Cry30Da1 (№ доступа EF095955); Cry30Db1 (№ доступа BAE80088); Cry30Ea1 (№ доступа ACC95445); Cry30Ea2 (№ доступа FJ499389); Cry30Fa1 (№ доступа ACI22625 ); Cry30Ga1 (№ доступа ACG60020); Cry30Ga2 (№ доступа HQ638217); Cry31Aa1 (№ доступа BAV11757); Cry31Aa2 (№ доступа AAL87458); Cry31Aa3 (№ доступа BAE79808); Cry31Aa4 (№ доступа BAF32571); Cry31Aa5 (№ доступа BAF32572); Cry31Aa6 (№ доступа BAI44026); Cry31Ab1 (№ доступа BAE79809); Cry31Ab2 (№ доступа BAF32570); Cry31Ac1 (№ доступа BAF34368); Cry31Ac2 (№ доступа AB731600); Cry31Ad1 (№ доступа BAI44022); Cry32Aa1 (№ доступа AAG36711); Cry32Aa2 (№ доступа GU063849); Cry32Ab1 (№ доступа GU063850); Cry32Ba1 (№ доступа BAV78601); Cry32Ca1 (№ доступа BAV78602); Cry32Cb1 (№ доступа KC156708); Cry32Da1 (№ доступа BAV78603); Cry32Ea1 (№ доступа GU324274); Cry32Ea2 (№ доступа KC156686); Cry32Eb1 (№ доступа KC156663); Cry32Fa1 (№ доступа KC156656); Cry32Ga1 (№ доступа KC156657); Cry32Ha1 (№ доступа KC156661); Cry32Hb1 (№

## 038923

доступа KC156666); Cry32Ia1 (№ доступа KC156667); Cry32Ja1 (№  
 доступа KC156685); Cry32Ka1 (№ доступа KC156688); Cry32La1 (№  
 доступа KC156689); Cry32Ma1 (№ доступа KC156690); Cry32Mb1 (№  
 доступа KC156704); Cry32Na1 (№ доступа KC156691); Cry32Oa1 (№  
 доступа KC156703); Cry32Pa1 (№ доступа KC156705); Cry32Qa1 (№  
 доступа KC156706); Cry32Ra1 (№ доступа KC156707); Cry32Sa1 (№  
 доступа KC156709); Cry32Ta1 (№ доступа KC156710); Cry32Ua1 (№  
 доступа KC156655); Cry33Aa1 (№ доступа AAL26871); Cry34Aa1 (№  
 доступа AAG50341); Cry34Aa2 (№ доступа AAK64560); Cry34Aa3 (№  
 доступа AAT29032); Cry34Aa4 (№ доступа AAT29030); Cry34Ab1 (№  
 доступа AAG41671); Cry34Ac1 (№ доступа AAG50118); Cry34Ac2 (№  
 доступа AAK64562); Cry34Ac3 (№ доступа AAT29029); Cry34Ba1 (№  
 доступа AAK64565); Cry34Ba2 (№ доступа AAT29033); Cry34Ba3 (№  
 доступа AAT29031); Cry35Aa1 (№ доступа AAG50342); Cry35Aa2 (№  
 доступа AAK64561); Cry35Aa3 (№ доступа AAT29028); Cry35Aa4 (№  
 доступа AAT29025); Cry35Ab1 (№ доступа AAG41672); Cry35Ab2 (№  
 доступа AAK64563); Cry35Ab3 (№ доступа AY536891); Cry35Ac1 (№  
 доступа AAG50117); Cry35Ba1 (№ доступа AAK64566); Cry35Ba2 (№  
 доступа AAT29027); Cry35Ba3 (№ доступа AAT29026); Cry36Aa1 (№  
 доступа AAK64558); Cry37Aa1 (№ доступа AAF76376 ); Cry38Aa1 (№  
 доступа AAK64559); Cry39Aa1 (№ доступа BAB72016); Cry40Aa1 (№  
 доступа BAB72018); Cry40Ba1 (№ доступа BAC77648); Cry40Ca1 (№  
 доступа EU381045); Cry40Da1 (№ доступа ACF15199); Cry41Aa1 (№  
 доступа BAD35157); Cry41Ab1 (№ доступа BAD35163); Cry41Ba1 (№  
 доступа HM461871); Cry41Ba2 (№ доступа ZP\_04099652); Cry42Aa1 (№  
 доступа BAD35166); Cry43Aa1 (№ доступа BAD15301); Cry43Aa2 (№  
 доступа BAD95474 ); Cry43Ba1 (№ доступа BAD15303); Cry43Ca1 (№  
 доступа KC156676); Cry43Cb1 (№ доступа KC156695); Cry43Cc1 (№  
 доступа KC156696); Cry43-подобный (№ доступа BAD15305); Cry44Aa  
 (№ доступа BAD08532); Cry45Aa (№ доступа BAD22577); Cry46Aa (№  
 доступа BAC79010); Cry46Aa2 (№ доступа BAG68906); Cry46Ab (№  
 доступа BAD35170); Cry47Aa (№ доступа AAY24695); Cry48Aa (№  
 доступа CAJ18351); Cry48Aa2 (№ доступа CAJ86545); Cry48Aa3 (№  
 доступа CAJ86546 ); Cry48Ab (№ доступа CAJ86548); Cry48Ab2 (№  
 доступа CAJ86549); Cry49Aa (№ доступа CAH56541); Cry49Aa2 (№  
 доступа CAJ86541); Cry49Aa3 (№ доступа CAJ86543); Cry49Aa4 (№

доступа CAJ86544); Cry49Ab1 (№ доступа CAJ86542); Cry50Aa1 (№  
 доступа BAE86999); Cry50Ba1 (№ доступа GU446675); Cry50Ba2 (№  
 доступа GU446676); Cry51Aa1 (№ доступа ABI14444); Cry51Aa2 (№  
 доступа GU570697); Cry52Aa1 (№ доступа EF613489); Cry52Ba1 (№  
 доступа FJ361760); Cry53Aa1 (№ доступа EF633476); Cry53Ab1 (№  
 доступа FJ361759); Cry54Aa1 (№ доступа ACA52194); Cry54Aa2 (№  
 доступа GQ140349); Cry54Ba1 (№ доступа GU446677); Cry55Aa1 (№  
 доступа ABW88932); Cry54Ab1 (№ доступа JQ916908); Cry55Aa2 (№  
 доступа AAE33526); Cry56Aa1 (№ доступа ACU57499); Cry56Aa2 (№  
 доступа GQ483512); Cry56Aa3 (№ доступа JX025567); Cry57Aa1 (№  
 доступа ANC87261); Cry58Aa1 (№ доступа ANC87260); Cry59Ba1 (№  
 доступа JN790647); Cry59Aa1 (№ доступа ACR43758); Cry60Aa1 (№  
 доступа ACU24782); Cry60Aa2 (№ доступа EAO57254); Cry60Aa3 (№  
 доступа EEM99278); Cry60Ba1 (№ доступа GU810818); Cry60Ba2 (№  
 доступа EAO57253); Cry60Ba3 (№ доступа EEM99279); Cry61Aa1 (№  
 доступа HM035087); Cry61Aa2 (№ доступа HM132125); Cry61Aa3 (№  
 доступа EEM19308); Cry62Aa1 (№ доступа HM054509); Cry63Aa1 (№  
 доступа BAI44028); Cry64Aa1 (№ доступа BAJ05397); Cry65Aa1 (№  
 доступа HM461868); Cry65Aa2 (№ доступа ZP\_04123838); Cry66Aa1 (№  
 доступа HM485581); Cry66Aa2 (№ доступа ZP\_04099945); Cry67Aa1 (№  
 доступа HM485582); Cry67Aa2 (№ доступа ZP\_04148882); Cry68Aa1 (№  
 доступа HQ113114); Cry69Aa1 (№ доступа HQ401006); Cry69Aa2 (№  
 доступа JQ821388); Cry69Ab1 (№ доступа JN209957); Cry70Aa1 (№  
 доступа JN646781); Cry70Ba1 (№ доступа ADO51070); Cry70Bb1 (№  
 доступа EEL67276); Cry71Aa1 (№ доступа JX025568); Cry72Aa1 (№  
 доступа JX025569); Cyt1Aa (номер доступа в GenBank X03182);  
 Cyt1Ab (номер доступа в GenBank X98793); Cyt1B (номер доступа в  
 GenBank U37196); Cyt2A (номер доступа в GenBank Z14147) и Cyt2B  
 (номер доступа в GenBank U52043).

Примеры 5-эндотоксинов также включают без ограничения белки Cry1A из патентов США №№ 5880275, 7858849, 8530411, 8575433 и 8686233; токсин DIG-3 или DIG-11 (N-концевая делеция вариантов  $\alpha$ -спирали 1 и/или  $\alpha$ -спирали 2 белков Cry, например Cry1A, Cry3A) из патентов США №№ 8304604, 8304605 и 8476226; Cry1B из заявки на выдачу патента США с серийным номером 10/525318; Cry1C из патента США № 6033874; Cry1F из патентов США №№ 5188960 и 6218188; химеры Cry1A/F из патентов США №№ 7070982; 6962705 и 6713063; белок Cry2, например белок Cry2Ab из патента США № 7064249; белок Cry3A, в том числе без ограничения полученный с помощью методик генной инженерии гибридный инсектицидный белок (eHIP), созданный путем слияния уникальных комбинаций вариабельных участков и консервативных блоков по меньшей мере двух различных белков Cry (публикация заявки на выдачу патента США № 2010/0017914); белок Cry4; белок Cry5; белок Cry6; белки Cry8 из патентов США №№ 7329736, 7449552, 7803943, 7476781, 7105332, 7378499 и 7462760; белок Cry9, например представители семейств Cry9A, Cry9B, Cry9C, Cry9D, Cry9E и Cry9F, в том числе без ограничения белок Cry9D из патента США № 8802933 и белок Cry9B из патента США № 8802934; белок Cry15 из Naimov, et al., (2008) Applied and Environmental Microbiology, 74:7145-7151; Cry22, белок Cry34Ab из патентов США №№ 6127180, 6624145 и 6340593; белок CryET33 и CryET34 из патентов США №№ 6248535, 6326351, 6399330, 6949626, 7385107 и 7504229; гомологи CryET33 и CryET34 из публикаций патентов США №№ 2006/0191034, 2012/0278954 и публикации согласно РСТ с номером WO 2012/139004; белок Cry35Ab1 из патентов США №№ 6083499, 6548291 и 6340593; белок Cry46, белок Cry51, бинарный токсин Cry; TIC807 из публикации заявки на выдачу патента США № 2008/0295207; ET29, ET37, TIC809, TIC810, TIC812, TIC127, TIC128 из РСТ US 2006/033867; токсины TIC853 из патента США 8513494; TIC3131, TIC 3400 и TIC3407 из публикации заявки на выдачу патента США № 2015/0047076; AXMI-027, AXMI-036 и AXMI-038 из патента США № 8236757; AXMI-031, AXMI-039, AXMI-040, AXMI-049 из патента

США № 7923602; АХМІ-018, АХМІ-020 и АХМІ-021 из WO 2006/083891; АХМІ-010 из WO 2005/038032; АХМІ-003 из WO 2005/021585; АХМІ-008 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0250311; АХМІ-006 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0216186; АХМІ-007 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0210965; АХМІ-009 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0210964; АХМІ-014 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0197917; АХМІ-004 из публикации заявки на выдачу патента США № 2004/0197916; АХМІ-028 и АХМІ-029 из WO 2006/119457; АХМІ-007, АХМІ-008, АХМІ-0080r2, АХМІ-009, АХМІ-014 и АХМІ-004 из WO 2004/074462; АХМІ-150 из патента США № 8084416; АХМІ-205 из публикации заявки на выдачу патента США № 2011/0023184; АХМІ-011, АХМІ-012, АХМІ-013, АХМІ-015, АХМІ-019, АХМІ-044, АХМІ-037, АХМІ-043, АХМІ-033, АХМІ-034, АХМІ-022, АХМІ-023, АХМІ-041, АХМІ-063 и АХМІ-064 из публикации заявки на выдачу патента США № 2011/02 63488; АХМІ-R1 и родственные белки из публикации заявки на выдачу патента США № 2010/0197592; АХМІ221Z, АХМІ222z, АХМІ223z, АХМІ224Z и АХМІ225z из WO 2011/103248; АХМІ218, АХМІ219, АХМІ220, АХМІ226, АХМІ227, АХМІ228, АХМІ229, АХМІ230 и АХМІ231 из WO 2011/103247 и патента США № 8759619; АХМІ-115, АХМІ-113, АХМІ-005, АХМІ-163 и АХМІ-184 из патента США № 8334431; АХМІ-001, АХМІ-002, АХМІ-030, АХМІ-035 и АХМІ-045 из публикации заявки на выдачу патента США № 2010/0298211; АХМІ-066 и АХМІ-076 из публикации заявки на выдачу патента США № 2009/0144852; АХМІ128, АХМІ130, АХМІ131, АХМІ133, АХМІ140, АХМІ141, АХМІ142, АХМІ143, АХМІ144, АХМІ146, АХМІ148, АХМІ149, АХМІ152, АХМІ153, АХМІ154, АХМІ155, АХМІ156, АХМІ157, АХМІ158, АХМІ162, АХМІ165, АХМІ166, АХМІ167, АХМІ168, АХМІ169, АХМІ170, АХМІ171, АХМІ172, АХМІ173, АХМІ174, АХМІ175, АХМІ176, АХМІ177, АХМІ178, АХМІ179, АХМІ180, АХМІ181, АХМІ182, АХМІ185, АХМІ186, АХМІ187, АХМІ188, АХМІ189 из патента США № 8318900; АХМІ079, АХМІ080, АХМІ081, АХМІ082, АХМІ091, АХМІ092, АХМІ096, АХМІ097, АХМІ098, АХМІ099, АХМІ100, АХМІ101, АХМІ102, АХМІ103, АХМІ104, АХМІ107, АХМІ108, АХМІ109, АХМІ110, АХМІ111, АХМІ112, АХМІ114, АХМІ116, АХМІ117, АХМІ118, АХМІ119, АХМІ120, АХМІ121, АХМІ122, АХМІ123, АХМІ124, АХМІ1257, АХМІ1268, АХМІ127, АХМІ129, АХМІ164, АХМІ151, АХМІ161, АХМІ183, АХМІ132, АХМІ138, АХМІ137 из публикации заявки на выдачу патента США № 2010/0005543, АХМІ270 из публикации заявки на выдачу патента США US 20140223598, АХМІ279 из публикации заявки на выдачу патента США US 20140223599, белки Cry, такие как Cry1A и Cry3A, с модифицированными сайтами протеолитического расщепления из патента США № 8319019; белок-токсин Cry1Ac, Cry2Aa и Cry1Ca из штамма VBTS 2528 *Bacillus thuringiensis* из публикации заявки на выдачу патента США № 2011/00 64 710. Другие белки Cry хорошо известны специалисту в данной области (см. Crickmore, et al., "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2011), на сайте по адресу [lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с использованием префикса "www"). Инсектицидная активность белков Cry хорошо известна специалисту в данной области (для обзора см. van Franckenhuysen, (2009) J. Invert. Path. 101:1-16). Применение белков Cry в качестве признаков трансгенного растения хорошо известно специалисту в данной области, и трансгенные растения с Cry, в том числе без ограничения растения, экспрессирующие Cry1Ac, Cry1Ac+Cry2Ab, Cry1Ab, Cry1A.105, Cry1F, Cry1Fa2, Cry1F+Cry1Ac, Cry2Ab, Cry3A, mCry3A, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3A, mCry3A, Cry9c и CBI-Bt, были разрешены контролирующими органами (см. Sanahuja, (2011) Plant Biotech Journal 9:283-300 и CERA (2010), базу данных ГМ растений центра по оценке риска для окружающей среды (CERA), Исследовательский фонд ILSI, город Вашингтон, на сайте по адресу [cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database), доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с использованием префикса "www". В растениях также может экспрессироваться несколько пестицидных белков, хорошо известных специалисту в данной области, таких как Vip3Ab и Cry1Fa (US2012/0317682); Cry1BE и Cry1F (US2012/0311746); Cry1CA и Cry1AB (US 2012/0311745); Cry1F и CryCa (US2012/0317681); Cry1DA и Cry1BE (US 2012/0331590); Cry1DA и Cry1Fa (US 2012/0331589); Cry1AB и Cry1BE (US2012/0324606); Cry1Fa и Cry2Aa и Cry1I и Cry1E (US 2012/0324605); Cry34Ab/35Ab и Cry6Aa (US 20130167269); Cry34Ab/Vcry35Ab и Cry3Aa (US 20130167268); Cry1Ab и Cry1F (US 20140182018) и Cry3A, а также Cry1Ab или Vip3Aa (US 20130116170). Пестицидные белки также включают инсектицидные липазы, в том числе гидролазы омыляемых липидов из патента США № 7491869 и холестерин-оксидазы, как, например, из Streptomyces (Purcell et al. (1993) Biochem Biophys Res Commun 15:1406-1413). Пестицидные белки также включают токсины VIP (вегетативные инсектицидные белки) из патентов США №№ 5877012, 6107279, 6137033, 7244820, 7615686 и 8237020 и т. п. Другие белки VIP хорошо известны специалисту в данной области (см. сайт по адресу [lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/vip.html](http://lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html), доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с использованием префикса "www"). Пестицидные белки включают также белки токсинового комплекса (ТС), которые можно получить из организмов, таких как *Xenorhabdus*, *Photorhabdus* и *Paenibacillus* (см. патенты США №№ 7491698 и 8084418). Некоторые ТС-белки обладают "самостоятельной" инсектицидной активностью, а другие ТС-белки повышают активность самостоятельных токсинов, вырабатываемых тем же данным организмом. Токсичность "самостоятельного" ТС-белка (например, из *Photorhabdus*, *Xenorhabdus* или *Paenibacillus*) может повышаться с помощью од-

ного или нескольких ТС-белков-"усилителей", полученных из организма-источника из другого рода. Существуют три основных типа ТС-белков. Как изложено в данном документе, белки класса А ("белок А") представляют собой самостоятельные токсины. Белки класса В ("белок В") и белки класса С ("белок С") повышают токсичность белков класса А. Примерами белков класса А являются TcbA, TcdA, XptA1 и XptA2. Примерами белков класса В являются TcaC, TcdB, XptB1Xb и XptC1Wi. Примерами белков класса С являются TccC, XptC1Xb и XptB1Wi. Пестицидные белки также включают белки яда пауков, змей и скорпионов. Примеры пептидов яда пауков включают без ограничения пептиды ликотоксин-1 и его мутантные формы (патент США № 8334366).

Один аспект относится к выделенным или рекомбинантным молекулам нуклеиновой кислоты, содержащим последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды PIP-72 и элемент сайленсинга. Термин "молекула нуклеиновой кислоты", используемый в данном документе, относится к молекулам ДНК (например, рекомбинантной ДНК, кДНК, геномной ДНК, плазмидной ДНК, митохондриальной ДНК), и молекулам РНК (например, mRNA), и аналогам ДНК или РНК, полученным с применением аналогов нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, но предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК.

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты (или ДНК) используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая больше не находится в своей естественной среде, например находится *in vitro*. "Рекомбинантная" молекула нуклеиновой кислоты (или ДНК) используется в данном документе для обозначения последовательности нуклеиновой кислоты (или ДНК), которая находится в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. В некоторых вариантах осуществления "выделенная" или "рекомбинантная" нуклеиновая кислота не содержит последовательности (предпочтительно последовательности, кодирующие белок), которые в естественных условиях фланкируют нуклеиновую кислоту (т.е. последовательности, расположенные на 5'- и 3'-концах нуклеиновой кислоты) в геномной ДНК организма, из которого получена нуклеиновая кислота. Для целей настоящего раскрытия "выделенные" или "рекомбинантные", при использовании для обозначения молекул нуклеиновой кислоты, исключают выделенные хромосомы. Например, в различных вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, может содержать менее приблизительно 5 т.н., 4 т.н., 3 т.н., 2 т.н., 1 т.н., 0,5 т.н. или 0,1 т.н. последовательностей нуклеиновой кислоты, которые в естественных условиях фланкируют молекулу нуклеиновой кислоты в геномной ДНК клетки, из которой получена нуклеиновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, имеет одно или несколько изменений в последовательности нуклеиновой кислоты по сравнению с нативной или геномной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изменение в нативной или геномной последовательности нуклеиновой кислоты включает без ограничения изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие вырожденности генетического кода; изменения в последовательности нуклеиновой кислоты вследствие аминокислотной замены, вставки, делеции и/или добавления относительно нативной или геномной последовательности; удаление одного или нескольких интронов; делецию одного или нескольких регуляторных участков, расположенных выше или ниже; и делецию 5'-и/или 3'-нетранслируемого участка, ассоциированного с геномной последовательностью нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, представляет собой последовательность, отличающуюся от геномной.

Источники полинуклеотидов, которые кодируют полипептиды PIP-72, включают без ограничения SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 949, SEQ ID NO: 950, SEQ ID NO: 955, SEQ ID NO: 956, SEQ ID NO: 957, SEQ ID NO: 958, SEQ ID NO: 961, SEQ ID NO: 962, SEQ ID NO: 963, SEQ ID NO: 965, SEQ ID NO: 966, SEQ ID NO: 967 и SEQ ID NO: 968. Примеры последовательностей полипептида PIP-72, которые можно применять для получения соответствующих нуклеотидных кодирующих последовательностей, включают без ограничения полипептид PIP-72 с последовательностью под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 927, SEQ ID NO: 928, SEQ ID NO: 932, SEQ ID NO: 933, SEQ ID NO: 934, SEQ ID NO: 935, SEQ ID NO: 936, SEQ ID NO: 939, SEQ ID NO: 940, SEQ ID NO: 941, SEQ ID NO: 943, SEQ ID NO: 944, SEQ ID NO: 945 или SEQ ID NO: 946. Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами этих последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих полипептиды PIP-72 и элемент сайленсинга, также охватываются вариантами осуществления. "Фрагмент", используемый в данном документе, относится к части последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PIP-72 и/или элемент сайленсинга. Фрагмент последовательности нуклеиновой кислоты может кодировать биологически активную часть полипептида PIP-72 или элемента сайленсинга, или он может представлять собой фрагмент, который можно применять в качестве гибридного зонда или ПЦР-прайма с применением способов, раскрытых ниже. Молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются фрагментами последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PIP-72 или элемент сайленсинга, содержат по меньшей мере приблизительно 130, 140, 150,

160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или 260 смежных нуклеотидов или вплоть до количества нуклеотидов, присутствующих в последовательности нуклеиновой кислоты полной длины, кодирующей раскрытые в данном документе полипептид PIP-72 или элемент сайленсинга, в зависимости от предполагаемого применения. "Смежные нуклеотиды" используется в данном документе для обозначения нуклеотидных остатков, которые непосредственно прилегают друг к другу. Фрагменты последовательностей нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления будут кодировать фрагменты белка или элементы сайленсинга, которые сохраняют биологическую активность и вследствие этого сохраняют инсектицидную активность. Выражение "сохраняет активность" используется в данном документе для обозначения полипептида или элемента сайленсинга, обладающих по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, 80%, 90%, 95% или более высокой инсектицидной активностью полипептида или аминокислотной последовательности полной длины. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении *Lepidoptera*. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении видов жесткокрылых. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении вида *Diabrotica*. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении одного или нескольких насекомых-вредителей из группы кукурузных жуков: западного кукурузного жука, *Diabrotica virgifera virgifera*; северного кукурузного жука, *D. barberi*; блошки одиннадцатиточечной Говарда или жука-блошки одиннадцатиточечной; *Diabrotica undecimpunctata howardi* и мексиканского кукурузного жука, *D. virgifera zeaе*. В одном варианте осуществления инсектицидная активность представляет собой активность в отношении западного кукурузного жука, *Diabrotica virgifera virgifera*.

В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми параметрами по умолчанию. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей рассчитывают по всей длине полипептида с применением алгоритма ClustalW в модуле ALIGNX пакета программ Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния) со всеми параметрами по умолчанию.

Для определения процентной идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты осуществляют выравнивание последовательностей для целей оптимального сравнения. Процентная идентичность двух последовательностей является функцией количества идентичных положений, имеющих в последовательностях (т.е. процентная идентичность=количество идентичных положений/общее количество положений (например, перекрывающихся положений)×100). В одном варианте осуществления две последовательности имеют одинаковую длину. В другом варианте осуществления сравнение проводят по всей протяженности эталонной последовательности (например, по всей протяженности одной из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2). Процентную идентичность двух последовательностей можно определить с применением методик, аналогичных описанным ниже, которые допускают присутствие гэпов или не допускают присутствия гэпов. При расчете процентной идентичности, как правило, подсчитывают точные совпадения.

Определение процентной идентичности двух последовательностей можно выполнять с применением математического алгоритма. Неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм по Karlin and Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, модифицированный согласно Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм внедрен в программы BLASTN и BLASTX от Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Поиски нуклеотидных последовательностей в BLAST можно выполнять с помощью программы BLASTN, балл=100, длина слова=12, с получением последовательностей нуклеиновой кислоты, гомологичных пестицидным молекулам нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления. Поиски белковых последовательностей в BLAST можно выполнять с помощью программы BLASTX, балл=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам пестицидного белка согласно вариантам осуществления. Для получения выравниваний с введением гэпов в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST (в BLAST 2.0), как описано в Altschul, et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. В качестве альтернативы можно применять PSI-Blast для осуществления итерационного поиска, при помощи которого выявляют отдаленные связи между молекулами. См. Altschul, et al., (1997) выше. При использовании программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, BLASTX и BLASTN). Выравнивание также можно проводить вручную путем просмотра.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм ClustalW (Higgins, et al., (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW сравнивает последовательности и выравнивает всю протяженность аминокислотной последовательности или последовательности ДНК, и, таким образом, он может предоставлять данные о консервативности последовательностей для полной аминокислотной последовательности. Алгоритм ClustalW применяется в нескольких коммерчески доступных пакетах программного обеспечения для анализа

ДНК/аминокислотных последовательностей, таких как модуль ALIGNX® пакета программ Vector NTI® Program Suite (Invitrogen Corporation, Карлсбад, Калифорния). После выравнивания аминокислотных последовательностей с помощью ClustalW можно оценивать процентную идентичность аминокислотных последовательностей. Неограничивающим примером программного обеспечения, применимого для анализа выравниваний ClustalW, является GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) обеспечивает возможность оценки сходства и идентичности аминокислотных (или ДНК) последовательностей нескольких белков. Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм из Myers and Miller, (1988) CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм внедрен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью программного пакета GCG Wisconsin Genetics Software Package версии 10 (доступного от Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., Сан-Диего, Калифорния, США). При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно применять таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4.

Другим неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм из Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48(3) :443-453, используемый в программном обеспечении GAP версии 10 для определения идентичности или сходства последовательностей с применением следующих параметров по умолчанию: % идентичности и % сходства для последовательности нуклеиновой кислоты с применением штрафа за открытие гэпа 50, и штрафа за продолжение гэпа 3, и матрицы замен nwsgapdna.cmpii; % идентичности или % сходства для аминокислотной последовательности с применением штрафа за открытие гэпа 8, и штрафа за продолжение гэпа 2, и матрицы замен BLOSUM62. Также можно применять эквивалентные программы. "Эквивалентная программа" применяется в данном документе для обозначения любой программы для сравнения последовательностей, которая для любых двух исследуемых последовательностей генерирует выравнивание, характеризующееся идентичными совпадениями нуклеотидных остатков и идентичной процентной идентичностью последовательности при сравнении с соответствующим выравниванием, сгенерированным с помощью GAP версии 10.

Варианты осуществления также охватывают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты полипептида PIP-72 и элемент сайленсинга. "Варианты" последовательностей нуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, включают те последовательности, которые отличаются консервативно из-за вырожденности генетического кода, а также те последовательности, которые являются достаточно идентичными, как обсуждается выше. Встречающиеся в природе аллельные варианты можно идентифицировать с применением хорошо известных методик молекулярной биологии, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и методики гибридизации, изложенные ниже. Вариантные последовательности нуклеиновой кислоты также включают синтетически полученные последовательности нуклеиновой кислоты, которые были получены, например, с применением сайт-направленного мутагенеза, но которые все еще кодируют раскрытые полипептиды PIP-72, которые рассматриваются ниже.

Описание ряда процедур создания разнообразия с целью создания модифицированных последовательностей нуклеиновой кислоты, например последовательностей, кодирующих полипептиды с пестицидной активностью или их фрагменты, находят в следующих публикациях и литературе, приводимой в них:

Soong, et al.,

(2000) Nat Genet 25(4):436-439; Stemmer, et al., (1999) Tumor Targeting 4:1-4; Ness, et al., (1999) Nat Biotechnol 17:893-896; Chang, et al., (1999) Nat Biotechnol 17:793-797; Minshull and Stemmer, (1999) Curr Opin Chem Biol 3:284-290; Christians, et al., (1999) Nat Biotechnol 17:259-264; Cramer, et al., (1998) Nature 391:288-291; Cramer, et al., (1997) Nat Biotechnol 15:436-438; Zhang, et al., (1997) PNAS USA 94:4504-4509; Patten, et al., (1997) Curr Opin Biotechnol 8:724-733; Cramer, et al., (1996) Nat Med 2:100-103; Cramer, et al., (1996) Nat Biotechnol 14:315-319; Gates, et al., (1996) J Mol Biol 255:373-386; Stemmer, (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" в: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, New York. pp. 447-457; Cramer and Stemmer, (1995) BioTechniques 18:194-195; Stemmer, et al., (1995) Gene, 164:49-53; Stemmer, (1995) Science 270:1510; Stemmer, (1995) Bio/Technology 13:549-553; Stemmer, (1994) Nature 370:389-391 и Stemmer, (1994) PNAS USA 91:10747-10751.

Мутационные способы создания разнообразия включают, например, сайт-направленный мутагенез

(Ling, et al., (1997) *Anal Biochem* 254(2):157-178; Dale, et al., (1996) *Methods Mol Biol* 57:369-374; Smith, (1985) *Ann Rev Genet* 19:423-462; Botstein and Shortle, (1985) *Science* 229:1193-1201; Carter, (1986) *Biochem J* 237:1-7 и Kunkel, (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" в *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein and Lilley, eds., Springer Verlag, Berlin)); мутагенез с применением урацил-содержащих матриц (Kunkel, (1985) *PNAS USA* 82:488-492; Kunkel, et al., (1987) *Methods Enzymol* 154:367-382 и Bass, et al., (1988) *Science* 242:240-245); олигонуклеотид-направленный мутагенез (Zoller and Smith, (1983) *Methods Enzymol* 100:468-500; Zoller and Smith, (1987) *Methods Enzymol* 154:329-350 (1987); Zoller and Smith, (1982) *Nucleic Acids Res* 10:6487-6500), мутагенез фосфотиоат-модифицированной ДНК (Taylor, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:8749-8764; Taylor, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:8765-8787 (1985); Nakamaye and Eckstein, (1986) *Nucl Acids Res* 14:9679-9698; Sayers, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:791-802 и Sayers, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:803-814); мутагенез с применением дуплексной ДНК с глэпом (Kramer, et al., (1984) *Nucl Acids Res* 12:9441-9456; Kramer and Fritz, (1987) *Methods Enzymol* 154:350-367; Kramer, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:7207 и Fritz, et al., (1988) *Nucl Acids Res* 16:6987-6999).

Дополнительные подходящие способы включают точечную репарацию ошибочно спаренных оснований

(Kramer, et al., (1984) *Cell* 38:879-887), мутагенез с применением штаммов-хозяев с недостаточностью репарации (Carter, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:4431-4443 и Carter, (1987) *Methods in Enzymol* 154:382-403), делеционный мутагенез (Eghtedarzadeh and Henikoff, (1986) *Nucl Acids Res* 14:5115), рестрикцию-отбор и рестрикцию-очистку (Wells, et al., (1986) *Phil Trans R Soc Lond A* 317:415-423), мутагенез посредством полного синтеза гена (Nambiar, et al., (1984) *Science* 223:1299-1301; Sakamar and Khorana, (1988) *Nucl Acids Res* 14:6361-6372; Wells, et al., (1985) *Gene* 34:315-323 и Grundström, et al., (1985) *Nucl Acids Res* 13:3305-3316), репарацию двухцепочечных разрывов (Mandecki, (1986) *PNAS USA*, 83:7177-7181 и Arnold, (1993) *Curr Opin Biotech* 4:450-455).

Дополнительные сведения по многим из вышеуказанных способов можно найти в *Methods Enzymol*, том 154, в котором также описаны полезные руководства по поиску и устранению проблем в случае различных способов мутагенеза.

Дополнительные подробности, касающиеся различных способов создания разнообразия, можно найти в следующих патентах США, публикациях и заявках согласно РСТ и публикациях ЕРО: патенте США № 5723323, патенте США № 5763192, патенте США № 5814476, патенте США № 5817483, патенте США № 5824514, патенте США № 5976862, патенте США № 5605793, патенте США № 5811238, патенте США № 5830721, патенте США № 5834252, патенте США № 5837458, WO 1995/22625, WO 1996/33207, WO 1997/20078, WO 1997/35966, WO 1999/41402, WO 1999/41383, WO 1999/41369, WO 1999/41368, EP 752008, EP 0932670, WO 1999/23107, WO 1999/21979, WO 1998/31837, WO 1998/27230, WO 1998/27230, WO 2000/00632, WO 2000/09679, WO 1998/42832, WO 1999/29902, WO 1998/41653, WO 1998/41622, WO 1998/42727, WO 2000/18906, WO 2000/04190, WO 2000/42561, WO 2000/42559, WO 2000/42560, WO

2001/23401 и PCT/US 01/06775.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления могут также использоваться для выделения соответствующих последовательностей из других организмов. Таким образом, такие способы как ПЦР, гибридизация и т.п. можно применять для идентификации таких последовательностей на основе гомологии их последовательности с последовательностями, изложенными в данном документе. Вариантами осуществления охватываются последовательности, выбранные на основе идентичности их последовательности полным последовательностям, изложенным в данном документе, или их фрагментам. Такие последовательности включают в себя последовательности, которые являются ортологами раскрытых последовательностей. Термин "ортологи" относится к генам, происходящим от общего предкового гена и выявляемым у различных видов вследствие видообразования. Гены, обнаруживаемые у различных видов, считаются ортологами в случае, если их нуклеотидные последовательности и/или кодируемые ими белковые последовательности имеют существенную степень идентичности, как определено в других разделах данного документа. Функции ортологов часто являются высококонсервативными среди видов.

В случае подхода, основанного на ПЦР, олигонуклеотидные праймеры можно сконструировать для применения в ПЦР-реакциях для амплификации соответствующих последовательностей ДНК, исходя из кДНК или геномной ДНК, извлеченных из какого-либо организма, представляющего интерес. Способы конструирования ПЦР-праймеров и ПЦР-клонирования, как правило, известны в уровне техники и раскрыты в Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York), в дальнейшем "Sambrook". См. также Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); и Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Известные способы ПЦР включают без ограничения способы с применением парных праймеров, гнездовых праймеров, одиночных специфичных праймеров, вырожденных праймеров, ген-специфичных праймеров, вектор-специфичных праймеров, частично ошибочно спаренных праймеров и т.п.

В качестве альтернативы для идентификации гомологов полипептидов PIP-72 можно применять способ идентификации белков на основе масс-спектрометрии с применением протоколов из литературных источников (Scott Patterson, (1998), 10.22, 1-24, *Current Protocol in Molecular Biology*, изданный John Wiley & Son Inc.). Точнее говоря, способ идентификации белков на основе LC-MS/MS применяют для установления связи MS-данных указанных клеточных лизатов или образцов, обогащенных молекулами с требуемым молекулярным весом (вырезанных из геля SDS-PAGE с полосками с молекулярным весом, соответствующим PIP-72), с информацией о последовательностях PIP-72 (например, SEQ ID NO: 2) и его гомологов. Любое совпадение в пептидных последовательностях указывает на возможность наличия гомологов в образцах. Дополнительные методики (очистки белка и методики молекулярной биологии) можно применять для выделения белка и идентификации последовательностей гомологов.

В способах гибридизации для скрининга кДНК или геномных библиотек можно применять всю или часть последовательности пестицидной нуклеиновой кислоты. Способы для конструирования таких кДНК и геномных библиотек, как правило, известны в уровне техники и раскрыты в Sambrook and Russell, (2001), выше. Так называемые гибридизационные зонды могут представлять собой фрагменты геномной ДНК, фрагменты кДНК, фрагменты РНК или другие олигонуклеотиды, и они могут быть помечены детектируемой группой, такой как 32P, или любым другим детектируемым маркером, таким как другие радиоактивные изотопы, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Зонды для гибридизации можно получать путем мечения синтетических олигонуклеотидов, основанных на последовательности нуклеиновой кислоты, раскрытой в данном документе. Дополнительно можно применять вырожденные праймеры, сконструированные на основе консервативных нуклеотидов или аминокислотных остатков в последовательности нуклеиновой кислоты или кодируемой аминокислотной последовательности. Как правило, зонд содержит участок последовательности нуклеиновой кислоты, который гибридизуется при жестких условиях по меньшей мере с приблизительно 12, по меньшей мере с приблизительно 25, по меньшей мере с приблизительно 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 смежными нуклеотидами последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию, или ее фрагмента, или варианта. Способы получения зондов для гибридизации, как правило, известны в уровне техники и раскрыты в Sambrook and Russell, (2001), выше, включенном в данный документ с помощью ссылки.

Например, полную последовательность нуклеиновой кислоты, раскрытую в данном документе, или одну или несколько ее частей можно применять в качестве зонда, способного специфично гибридизоваться с соответствующими последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими последовательности, подобные полипептиду PIP-72, и матричными РНК. Для достижения специфичной гибридизации при различных условиях такие зонды включают в себя последовательности, которые являются уникальными и предпочтительно состоят по меньшей мере из приблизительно 10 нуклеотидов в длину или по меньшей мере из приблизительно 20 нуклеотидов в длину. Такие зонды можно применять для амплификации соответствующих пестицидных последовательностей из выбранного организма с помощью ПЦР. Эту методику можно применять для выделения дополнительных кодирующих последовательностей из требуемого организма или в качестве диагностического анализа для определения присутствия кодирую-

щих последовательностей в организме. Методики гибридизации включают гибридизационный скрининг высеченных ДНК-библиотек (либо блюшек, либо колоний; см., например, Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Гибридизацию таких последовательностей можно проводить в жестких условиях. "Жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" применяются в данном документе для обозначения условий, при которых зонд будет гибридизоваться со своей целевой последовательностью в явно большей степени, чем с другими последовательностями (например, по меньшей мере в 2 раза больше по сравнению с фоновой последовательностью). Жесткие условия являются зависимыми от последовательности и будут отличаться при различных обстоятельствах. Путем контроля жесткости условий гибридизации и/или отмывки можно идентифицировать целевые последовательности, которые на 100% комплементарны зонду (гибридизация с гомологичным зондом). В качестве альтернативы условия жесткости можно откорректировать для обеспечения некоторого ошибочного спаривания в последовательностях с тем, чтобы выявлять более низкие степени сходства (гибридизация с гетерологичным зондом). В целом зонд составляет менее приблизительно 1000 нуклеотидов в длину, предпочтительно менее 500 нуклеотидов в длину.

Как правило, жесткие условия будут такими, при которых концентрация соли составляет менее приблизительно 1,5 М ионов Na, обычно концентрация ионов Na (или других солей) составляет приблизительно 0,01-1,0 М при pH 7,0-8,3, а температура составляет по меньшей мере приблизительно 30°C для коротких зондов (например, 10-50 нуклеотидов) и по меньшей мере приблизительно 60°C для длинных зондов (например, более 50 нуклеотидов). Жесткие условия также могут быть достигнуты с помощью добавления дестабилизирующих средств, таких как формамид. Иллюстративные условия низкой жесткости включают гибридизацию в буферном растворе с 30-35% формамида, 1 М NaCl, 1% SDS (додецилсульфата натрия) при 37°C и отмывку в  $1 \times - 2 \times \text{SSC}$  ( $20 \times \text{SSC} = 3,0 \text{ М NaCl}/0,3 \text{ М цитрата тринатрия}$ ) при 50-55°C. Иллюстративные условия умеренной жесткости включают гибридизацию в 40-45% формамиде, 1,0 М NaCl, 1% SDS при 37°C и отмывку в  $0,5 \times - 1 \times \text{SSC}$  при 55-60°C. Иллюстративные условия высокой жесткости включают гибридизацию в 50% формамиде, 1 М NaCl, 1% SDS при 37°C и отмывку в  $0,1 \times \text{SSC}$  при 60-65°C. Необязательно отмывочные буферы могут содержать от приблизительно 0,1% до приблизительно 1% SDS. В целом длительность гибридизации составляет менее приблизительно 24 ч, обычно от приблизительно 4 до приблизительно 12 ч.

Специфичность, как правило, зависит от процедур отмывки после гибридизации, причем ключевыми факторами являются ионная сила и температура конечного отмывающего раствора. Для гибридов ДНК-ДНК  $T_m$  можно примерно рассчитать из уравнения Meinkoth и Wahl, (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284:  $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ форм.}) - 500/L$ ; где M представляет собой молярность одновалентных катионов, % GC представляет собой процентную долю гуанозиновых и цитозиновых нуклеотидов в ДНК, % форм., представляет собой процентную долю формамида в растворе для гибридизации, 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 гибридизуется с идеально совпадающим зондом.  $T_m$  снижают на приблизительно 1°C для каждого 1% ошибочного спаривания; таким образом,  $T_m$ , условия гибридизации и/или отмывки можно откорректировать для гибридизации с последовательностями требуемой идентичности. Например, если необходимы последовательности, идентичные на  $\geq 90\%$ , то  $T_m$  можно снизить на 10°C. Как правило, жесткие условия выбирают так, чтобы они были приблизительно на 5°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ) конкретной последовательности и комплементарной ей последовательности при определенных ионной силе и значении pH. Однако при условиях сильной жесткости могут применяться гибридизация и/или отмывка при температуре на 1, 2, 3 или 4°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ); при условиях умеренной жесткости могут применяться гибридизация и/или отмывка при температуре на 6, 7, 8, 9 или 10°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ); при условиях низкой жесткости могут применяться гибридизация и/или отмывка при температуре на 11, 12, 13, 14, 15 или 20°C ниже температуры плавления ( $T_m$ ). Специалистам будет понятно, что изменения жесткости растворов для гибридизации и/или отмывающих растворов по сути описаны с применением уравнения, композиций для гибридизации и отмывки и требуемой  $T_m$ . Если требуемая степень ошибочного спаривания приводит к  $T_m$  меньше 45°C (водный раствор) или 32°C (раствор формамида), то предпочтительно повысить концентрацию SSC так, чтобы можно было применять более высокую температуру. Исчерпывающее руководство по гибридизации нуклеиновых кислот приведено в Tijssen, (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, N.Y.) и Ausubel, et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). См. Sambrook, et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Термины "белок", "пептидная молекула" или "полипептид", используемые в данном документе, включают в себя любую молекулу, которая содержит пять или более аминокислот. В уровне техники хорошо известно, что белковые, пептидные или полипептидные молекулы могут подвергаться модификации, в том числе посттрансляционным модификациям, таким как без ограничения образование ди-

сульфидных связей, гликозилирование, фосфорилирование или олигомеризация. Таким образом, используемые в данном документе термины "белок", "пептидная молекула" или "полипептид" включают в себя любой белок, который модифицирован посредством какого-либо биологического или небиологического процесса. Термины "аминокислота" и "аминокислоты" относятся ко всем встречающимся в природе L-аминокислотам.

"Рекомбинантный белок" применяется в данном документе для обозначения белка, который более не находится в своей естественной среде, например *in vitro* или в рекомбинантной бактериальной или растительной клетке-хозяине. Полипептид PIP-72, который фактически не содержит клеточный материал, включает препараты белка, имеющие менее приблизительно 30%, 20%, 10% или 5% (по сухому весу) белка, не относящегося к пестицидному (также называемого в данном документе "загрязняющим белком").

Под "фрагментом" подразумевают часть полинуклеотида или часть аминокислотной последовательности и, следовательно, белка, кодируемого ими. Фрагменты полинуклеотида могут кодировать фрагменты белка, которые сохраняют биологическую активность нативного белка. "Фрагменты" или "биологически активные части" включают фрагменты полипептида, содержащие аминокислотные последовательности, достаточно идентичные полипептиду PIP-72 и которые проявляют инсектицидную активность. В качестве альтернативы фрагменты полинуклеотида, которые пригодны в качестве элемента сайленсинга, не должны кодировать фрагменты белков, которые сохраняют биологическую активность. Таким образом, фрагменты нуклеотидной последовательности могут варьировать в диапазоне по меньшей мере от приблизительно 10, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19 нуклеотидов, приблизительно 20 нуклеотидов, приблизительно 22 нуклеотидов, приблизительно 50 нуклеотидов, приблизительно 75 нуклеотидов, приблизительно 100 нуклеотидов, 200 нуклеотидов, 300 нуклеотидов, 400 нуклеотидов, 500 нуклеотидов, 600 нуклеотидов, 700 нуклеотидов и до полной длины используемого полинуклеотида. В качестве альтернативы, фрагменты нуклеотидной последовательности могут варьировать в диапазоне 1-50, 25-75, 75-125, 50-100, 125-175, 175-225, 100-150, 100-300, 150-200, 200-250, 225-275, 275-325, 250-300, 325-375, 375-425, 300-350, 350-400, 425-475, 400-450, 475-525, 450-500, 525-575, 575-625, 550-600, 625-675, 675-725, 600-650, 625-675, 675-725, 650-700, 725-825, 825-875, 750-800, 875-925, 925-975, 850-900, 925-975, 975-1025, 950-1000, 1000-1050, 1025-1075, 1075-1125, 1050-1100, 1125-1175, 1100-1200, 1175-1225, 1225-1275, 1200-1300, 1325-1375, 1375-1425, 1300-1400, 1425-1475, 1475-1525, 1400-1500, 1525-1575, 1575-1625, 1625-1675, 1675-1725, 1725-1775, 1775-1825, 1825-1875, 1875-1925, 1925-1975, 1975-2025, 2025-2075, 2075-2125, 2125-2175, 2175-2225, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800, 1800-1900, 1900-2000 последовательностей, раскрытых в данном документе. Биологически активная часть полипептида PIP-72 может представлять собой полипептид, который состоит, например, из 10, 25, 50, 55, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 или 85 аминокислот в длину. Такие биологически активные части можно получать при помощи рекомбинантных методик и оценивать в отношении инсектицидной активности. Как используется в данном документе, фрагмент содержит по меньшей мере 8 смежных аминокислот полипептида PIP-72.

В некоторых вариантах осуществления иллюстративные полипептиды PIP-72 изложены под

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ

ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 528, SEQ ID NO: 529, SEQ ID NO: 530, SEQ ID NO: 531, SEQ ID NO: 532, SEQ ID NO: 533, SEQ ID NO: 534, SEQ ID NO: 535, SEQ ID NO: 536, SEQ ID NO: 537, SEQ ID NO: 538, SEQ ID NO: 539, SEQ ID NO: 540, SEQ ID NO: 541, SEQ ID NO: 542, SEQ ID NO: 543, SEQ ID NO: 544, SEQ ID NO: 545, SEQ ID NO: 546, SEQ ID NO: 547, SEQ ID NO: 548, SEQ ID NO: 549, SEQ ID NO: 550, SEQ ID NO: 551, SEQ ID NO: 552,

038923

SEQ ID NO: 553, SEQ ID NO: 554, SEQ ID NO: 555, SEQ ID NO: 556,  
SEQ ID NO: 557, SEQ ID NO: 558, SEQ ID NO: 559, SEQ ID NO: 560,  
SEQ ID NO: 561, SEQ ID NO: 562, SEQ ID NO: 563, SEQ ID NO: 564,  
SEQ ID NO: 565, SEQ ID NO: 566, SEQ ID NO: 567, SEQ ID NO: 568,  
SEQ ID NO: 569, SEQ ID NO: 570, SEQ ID NO: 571, SEQ ID NO: 572,  
SEQ ID NO: 573, SEQ ID NO: 574, SEQ ID NO: 575, SEQ ID NO: 576,  
SEQ ID NO: 577, SEQ ID NO: 578, SEQ ID NO: 579, SEQ ID NO: 580,  
SEQ ID NO: 581, SEQ ID NO: 582, SEQ ID NO: 583, SEQ ID NO: 584,  
SEQ ID NO: 585, SEQ ID NO: 586, SEQ ID NO: 587, SEQ ID NO: 588,  
SEQ ID NO: 589, SEQ ID NO: 590, SEQ ID NO: 591, SEQ ID NO: 592,  
SEQ ID NO: 593, SEQ ID NO: 594, SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 596,  
SEQ ID NO: 597, SEQ ID NO: 598, SEQ ID NO: 599, SEQ ID NO: 600,  
SEQ ID NO: 601, SEQ ID NO: 602, SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604,  
SEQ ID NO: 605, SEQ ID NO: 606, SEQ ID NO: 607, SEQ ID NO: 608,  
SEQ ID NO: 609, SEQ ID NO: 610, SEQ ID NO: 611, SEQ ID NO: 612,  
SEQ ID NO: 613, SEQ ID NO: 614, SEQ ID NO: 615, SEQ ID NO: 616,  
SEQ ID NO: 617, SEQ ID NO: 618, SEQ ID NO: 619, SEQ ID NO: 620,  
SEQ ID NO: 621, SEQ ID NO: 622, SEQ ID NO: 623, SEQ ID NO: 624,  
SEQ ID NO: 625, SEQ ID NO: 626, SEQ ID NO: 627, SEQ ID NO: 628,  
SEQ ID NO: 629, SEQ ID NO: 630, SEQ ID NO: 631, SEQ ID NO: 632,  
SEQ ID NO: 633, SEQ ID NO: 634, SEQ ID NO: 635, SEQ ID NO: 636,  
SEQ ID NO: 637, SEQ ID NO: 638, SEQ ID NO: 639, SEQ ID NO: 640,  
SEQ ID NO: 641, SEQ ID NO: 642, SEQ ID NO: 643, SEQ ID NO: 644,  
SEQ ID NO: 645, SEQ ID NO: 646, SEQ ID NO: 647, SEQ ID NO: 648,  
SEQ ID NO: 649, SEQ ID NO: 650, SEQ ID NO: 651, SEQ ID NO: 652,  
SEQ ID NO: 653, SEQ ID NO: 654, SEQ ID NO: 655, SEQ ID NO: 656,  
SEQ ID NO: 657, SEQ ID NO: 658, SEQ ID NO: 659, SEQ ID NO: 660,  
SEQ ID NO: 661, SEQ ID NO: 662, SEQ ID NO: 663, SEQ ID NO: 664,  
SEQ ID NO: 665, SEQ ID NO: 666, SEQ ID NO: 667, SEQ ID NO: 668,  
SEQ ID NO: 669, SEQ ID NO: 670, SEQ ID NO: 671, SEQ ID NO: 672,  
SEQ ID NO: 673, SEQ ID NO: 674, SEQ ID NO: 675, SEQ ID NO: 676,  
SEQ ID NO: 677, SEQ ID NO: 678, SEQ ID NO: 679, SEQ ID NO: 680,  
SEQ ID NO: 681, SEQ ID NO: 682, SEQ ID NO: 683, SEQ ID NO: 684,  
SEQ ID NO: 685, SEQ ID NO: 686, SEQ ID NO: 687, SEQ ID NO: 688,  
SEQ ID NO: 689, SEQ ID NO: 690, SEQ ID NO: 691, SEQ ID NO: 692,  
SEQ ID NO: 693, SEQ ID NO: 694, SEQ ID NO: 695, SEQ ID NO: 696,

SEQ ID NO: 697, SEQ ID NO: 698, SEQ ID NO: 699, SEQ ID NO: 700,  
SEQ ID NO: 701, SEQ ID NO: 702, SEQ ID NO: 703, SEQ ID NO: 704,  
SEQ ID NO: 705, SEQ ID NO: 706, SEQ ID NO: 707, SEQ ID NO: 708,  
SEQ ID NO: 709, SEQ ID NO: 710, SEQ ID NO: 711, SEQ ID NO: 712,  
SEQ ID NO: 713, SEQ ID NO: 714, SEQ ID NO: 715, SEQ ID NO: 716,  
SEQ ID NO: 717, SEQ ID NO: 718, SEQ ID NO: 719, SEQ ID NO: 720,  
SEQ ID NO: 721, SEQ ID NO: 722, SEQ ID NO: 723, SEQ ID NO: 724,  
SEQ ID NO: 725, SEQ ID NO: 726, SEQ ID NO: 727, SEQ ID NO: 728,  
SEQ ID NO: 729, SEQ ID NO: 730, SEQ ID NO: 731, SEQ ID NO: 732,  
SEQ ID NO: 733, SEQ ID NO: 734, SEQ ID NO: 735, SEQ ID NO: 736,  
SEQ ID NO: 737, SEQ ID NO: 738, SEQ ID NO: 739, SEQ ID NO: 740,  
SEQ ID NO: 741, SEQ ID NO: 742, SEQ ID NO: 743, SEQ ID NO: 744,  
SEQ ID NO: 745, SEQ ID NO: 746, SEQ ID NO: 747, SEQ ID NO: 748,  
SEQ ID NO: 749, SEQ ID NO: 750, SEQ ID NO: 751, SEQ ID NO: 752,  
SEQ ID NO: 753, SEQ ID NO: 754, SEQ ID NO: 755, SEQ ID NO: 756,  
SEQ ID NO: 757, SEQ ID NO: 758, SEQ ID NO: 759, SEQ ID NO: 760,  
SEQ ID NO: 761, SEQ ID NO: 762, SEQ ID NO: 763, SEQ ID NO: 764,  
SEQ ID NO: 765, SEQ ID NO: 766, SEQ ID NO: 767, SEQ ID NO: 768,  
SEQ ID NO: 771, SEQ ID NO: 772, SEQ ID NO: 825, SEQ ID NO: 826,  
SEQ ID NO: 827, SEQ ID NO: 828, SEQ ID NO: 829, SEQ ID NO: 830,  
SEQ ID NO: 831, SEQ ID NO: 832, SEQ ID NO: 833, SEQ ID NO: 834,  
SEQ ID NO: 835, SEQ ID NO: 836, SEQ ID NO: 837, SEQ ID NO: 838,  
SEQ ID NO: 839, SEQ ID NO: 840, SEQ ID NO: 841, SEQ ID NO: 842,  
SEQ ID NO: 843, SEQ ID NO: 844, SEQ ID NO: 852, SEQ ID NO: 853,  
SEQ ID NO: 854, SEQ ID NO: 855, SEQ ID NO: 856, SEQ ID NO: 857,  
SEQ ID NO: 858, SEQ ID NO: 859, SEQ ID NO: 860, SEQ ID NO: 861,  
SEQ ID NO: 862, SEQ ID NO: 863, SEQ ID NO: 864, SEQ ID NO: 903,  
SEQ ID NO: 904, SEQ ID NO: 905, SEQ ID NO: 906, SEQ ID NO: 907,  
SEQ ID NO: 908, SEQ ID NO: 909, SEQ ID NO: 910, SEQ ID NO: 911,  
SEQ ID NO: 912, SEQ ID NO: 913, SEQ ID NO: 914, SEQ ID NO: 927,  
SEQ ID NO: 928, SEQ ID NO: 932, SEQ ID NO: 933, SEQ ID NO: 934,  
SEQ ID NO: 935, SEQ ID NO: 936, SEQ ID NO: 939, SEQ ID NO: 940,  
SEQ ID NO: 941, SEQ ID NO: 943, SEQ ID NO: 944, SEQ ID NO: 945 и  
SEQ ID NO: 946.

В некоторых вариантах осуществления полипептид PIP-72 характеризуется рассчитанным молекулярным весом от приблизительно 6 кДа до приблизительно 13 кДа, от приблизительно 7 кДа до приблизительно 12 кДа, от приблизительно 8 кДа до приблизительно 11 кДа, от приблизительно 9 кДа до приблизительно 10 кДа, приблизительно 8,75 кДа, приблизительно 9 кДа, приблизительно 9,25 кДа, приблизительно 9,5 кДа, приблизительно 9,75 кДа, приблизительно 10 кДа, приблизительно 10,25 кДа и приблизительно 10,5 кДа. Как используется в данном документе, термин "приблизительно", используемый в контексте молекулярного веса полипептида PIP-72, обозначает  $\pm 0,25$  килодальтон.

В некоторых вариантах осуществления полипептид PIP-72 характеризуется модифицированным физическим свойством. Термин "физическое свойство", используемый в данном документе, относится к любому параметру, который подходит для описания физико-химических характеристик белка. "Физическое свойство, представляющее интерес" и "свойство, представляющее интерес", используемые в данном документе, используются взаимозаменяемо для обозначения физических свойств белков, подлежащих исследованию и/или модификации. Примеры физических свойств включают без ограничения суммарный поверхностный заряд и распределение зарядов на поверхности белка, суммарную гидрофобность и рас-

пределение гидрофобных остатков на поверхности белка, плотность поверхностного заряда, плотность гидрофобности поверхности, общее число поверхностных ионизируемых групп, поверхностное натяжение, размер белка и его распределение в растворе, температуру плавления, теплоемкость и второй вириальный коэффициент. Примеры физических свойств также включают без ограничения растворимость, фолдинг, стабильность и усвояемость. В некоторых вариантах осуществления полипептид PIP-72 характеризуется повышенной усвояемостью протеолитических фрагментов в кишечнике насекомого. Модели для расщепления с помощью искусственного желудочного сока известны специалисту в данной области (Fuchs, R.L. and J.D. Astwood. *Food Technology* 50: 83-88, 1996; Astwood, J.D., et al *Nature Biotechnology* 14: 1269-1273, 1996; Fu TJ et al *J. Agric Food Chem.* 50: 7154-7160, 2002).

Подразумевают, что "варианты" означают в значительной степени сходные последовательности. В случае полинуклеотидов вариант предусматривает делецию и/или добавление одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких внутренних сайтах в пределах нативного полинуклеотида и/или замену одного или нескольких нуклеотидов в одном или нескольких сайтах в нативном полинуклеотиде. Вариант полинуклеотида, пригодного в качестве элемента сайленсинга, будет сохранять способность уменьшать экспрессию целевого полинуклеотида и, в некоторых вариантах осуществления, с осуществлением тем самым контроля представляющего интерес насекомого-вредителя растений. Как используется в данном документе, "нативный" полинуклеотид или полипептид предусматривает встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность соответственно. В отношении полинуклеотидов консервативные варианты включают те последовательности, которые по причине вырожденности генетического кода кодируют аминокислотную последовательность одного из раскрытых полипептидов. Вариантные полинуклеотиды также включают в себя полученные синтетическими способами полинуклеотиды, такие как полученные, например, с помощью сайт-направленного мутагена, но которые все еще сохраняют требуемую активность. В целом варианты конкретного раскрытого полинуклеотида (т.е. элемента сайленсинга) будут иметь последовательность, которая по меньшей мере на приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентична последовательности конкретного полинуклеотида, как определено с помощью программ выравнивания последовательностей и параметров, описанных в другой части данного документа.

Варианты конкретного раскрытого полинуклеотида (т.е. эталонного полинуклеотида) также можно оценить путем сравнения процентной идентичности последовательностей полипептида, кодируемого вариантным полинуклеотидом, и полипептида, кодируемого эталонным полинуклеотидом. Процентную идентичность последовательностей любых двух полипептидов можно вычислить с помощью программ выравнивания последовательностей и параметров, описанных в другой части данного документа. В случае если любую заданную пару используемых раскрытых полинуклеотидов оценивают с помощью сравнения процентной идентичности последовательностей для двух полипептидов, которые они кодируют, процентная идентичность последовательностей двух кодируемых полипептидов составляет по меньшей мере приблизительно 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или большую идентичность последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления варианты включают полипептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности вследствие мутагенеза. Вариантные белки, охваченные настоящим раскрытием, являются биологически активными, т.е. они все еще обладают требуемой биологической активностью (т.е. пестицидной активностью) нативного белка. В некоторых вариантах осуществления вариант будет обладать по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или более инсектицидной активности нативного белка. В некоторых вариантах осуществления варианты могут обладать усиленной активностью по сравнению с нативным белком.

Бактериальные гены довольно часто имеют несколько метиониновых инициаторных кодонов поблизости от стартового сайта открытой рамки считывания. Зачастую инициация трансляции по одному или нескольким из этих старт-кодонов будет приводить к образованию функционального белка. Эти старт-кодоны могут включать кодоны ATG. Однако бактерии, такие как *Bacillus* sp., также распознают кодон GTG в качестве старт-кодона, и белки, трансляция которых иницируется по кодонам GTG, в качестве первой аминокислоты содержат метионин. В редких случаях трансляция в бактериальных системах может иницироваться по кодону TTG, хотя в таком случае TTG кодирует метионин. Кроме того, зачастую а priori не определяют, какой из этих кодонов естественным образом используется в бактерии. Таким образом, понятно, что применение одного из взаимных метиониновых кодонов может также приводить к образованию пестицидных белков. Эти пестицидные белки охватываются настоящим раскрытием и могут применяться в способах по настоящему раскрытию. Будет понятно, что при экспрессии в растениях будет необходимо изменить взаимный старт-кодон на ATG для надлежащей трансляции.

В другом аспекте полипептид PIP-72 может экспрессироваться в виде белка-предшественника с вставочной последовательностью, которая катализирует многостадийный, посттрансляционный сплайсинг белка. Сплайсинг белка предусматривает вырезание вставочных последовательностей из полипептида с одновременным присоединением фланкирующих последовательностей с получением нового по-

липептида (Chong, et al., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271:22159-22168). Эта вставочная последовательность или элемент сплайсинга белка, называемые интеинами, которые катализируют свое собственное вырезание посредством трех согласованных реакций на N-терминальной и C-терминальной границах сплайсинга: ацильной перестройки N-терминального цистеина или серина; реакции переэтерификации между двумя концами с образованием разветвленного сложноэфирного или тиоэфирного промежуточного соединения и расщепления пептидной связи, сопряженного с образованием кольца с участием C-терминального аспарагина интеина с высвобождением интеина (Evans, et al., (2000) *J. Biol. Chem.*, 275:9091-9094). Выяснение механизма сплайсинга белка привело к возникновению ряда применений, связанных с интеинами

(Comb et al., патент США № 5496714; Comb et al., патент США № 5834247; Camarero and Muir, (1999) *J. Amer. Chem. Soc.* 121:5597-5598; Chong, et al., (1997) *Gene* 192:271-281, Chong, et al., (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:5109-5115; Chong, et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273:10567-10577; Cotton, et al., (1999) *J. Am. Chem. Soc.* 121:1100-1101; Evans, et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:18359-18363; Evans, et al., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:3923-3926; Evans, et al., (1998) *Protein Sci.* 7:2256-2264; Evans, et al., (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9091-9094; Iwai and Pluckthun, (1999) *FEBS Lett.* 459:166-172; Mathys, et al., (1999) *Gene* 231:1-13; Mills, et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3543-3548; Muir, et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6705-6710; Otomo, et al., (1999) *Biochemistry* 38:16040-16044; Otomo, et al., (1999) *J. Biomol. NMR* 14:105-114; Scott, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13638-13643; Severinov and Muir, (1998) *J. Biol. Chem.* 273:16205-16209; Shingledecker, et al., (1998) *Gene* 207:187-195; Southworth, et al., (1998) *EMBO J.* 17:918-926; Southworth, et al., (1999) *Biotechniques* 27:110-120; Wood, et al., (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:889-892; Wu, et al., (1998a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9226-9231; Wu, et al., (1998b) *Biochim Biophys Acta* 1387:422-432; Xu, et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:388-393; Yamazaki, et al., (1998) *J. Am. Chem. Soc.*, 120:5591-5592). Относительно применения интеинов в растительных трансгенах см. Yang, et al., (*Transgene Res* 15:583-593 (2006)) и Evans, et al., (*Annu. Rev. Plant Biol.* 56:375-392 (2005)).

В другом аспекте полипептид PIP-72 может кодироваться двумя отдельными генами, при этом интеин белка-предшественника берет начало от двух генов, он называется сплит-интеин, и две части предшественника соединяются путем образования пептидной связи. Это образование пептидной связи осуществляется с помощью транссплайсинга, опосредованного интеином. С этой целью первая и вторая кассеты экспрессии, содержащие два отдельных гена, дополнительно кодируют интеины, способные опосредовать транссплайсинг белков. С помощью транс-сплайсинга белки и полипептиды, кодируемые первым и вторым фрагментами, могут быть связаны путем образования пептидной связи. Интеины транссплайсинга можно выбирать из ядерного генома или генома органелл различных организмов, в том числе эукариот, археобактерий и зубактерий. Интеины, которые можно применять, перечислены на сайте по адресу [neb.com/neb/inteins.html](http://neb.com/neb/inteins.html), доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с использованием префикса "www"). Нуклеотидную последовательность, кодирующую интеин, можно разделять на 5'-часть и 3'-часть, которые кодируют соответственно 5'-часть и 3'-часть интеина. Части последовательности, которые не являются необходимыми для интеин-сплайсинга (например, домен хоминг-эндонуклеазы), могут быть удалены. Интеин-кодирующая последовательность расщепляется, так что 5'- и 3'-части способны к транс-сплайсингу. Для выбора подходящего сайта расщепления интеин-кодирующей последовательности можно следовать соображениям, опубликованным у Southworth, et al., (1998) *EMBO J.* 17:918-926. При конструировании первой и второй кассет экспрессии 5' интеин-кодирующую последовательность соединяют с 3'-концом первого фрагмента, кодирующего N-терминальную часть полипептида PIP-72, а 3' интеин-кодирующую последовательность соединяют с 5'-концом второго фрагмента, кодирующего C-терминальную часть полипептида PIP-72.

В целом партнеров для транс-сплайсинга можно конструировать с использованием любого сплит-интеина, в том числе любых встречающихся в природе или искусственно расщепленных сплит-интеинов. Известны несколько встречающихся в природе сплит-интеинов, например сплит-интеин гена DnaE PCC6803 *Synechocystis* sp. (см. Wu, et al., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(16): 9226-31 и Evans, et al., (2000) *J Biol Chem*. 275(13): 9091-4 и гена DnaE из *Nostoc punctiforme* (см. Iwai, et al., (2006) *FEBS Lett*. 580(7):1853-8). Интеины, не относящиеся к сплит-интеинам, были искусственно расщеплены в лаборатории с созданием новых сплит-интеинов, например искусственно расщепленный интеин Ssp DnaB (см. Wu, et al., (1998) *Biochim Biophys Acta*. 1387:422-32), и расщепленный интеин See VMA (см. Brenzel, et al., (2006) *Biochemistry*. 45 (6) :1571-8), и искусственно расщепленный грибной мини-интеин (см. Elleuche, et al., (2007) *Biochem Biophys Res Commun*. 355 (3):830-4). Также доступны базы данных по интеинам, в которых перечислены известные интеины (см., например, базу данных, доступную в режиме реального времени на сайте по адресу: [bioinformatics.weizmann.ac.il/~pietro/inteins/Inteinstable.html](http://bioinformatics.weizmann.ac.il/~pietro/inteins/Inteinstable.html), доступ к которому можно получить через всемирную сеть Интернет с использованием префикса "www").

Встречающиеся в природе интеины, не относящиеся к сплит-интеинам, могут обладать эндонуклеазной или другими видами ферментативной активности, которые, как правило, можно устранять при конструировании искусственно расщепленного сплит-интеина. Такие мини-интеины или минимизированные сплит-интеины хорошо известны из уровня техники, и, как правило, они состоят из менее чем 200 аминокислотных остатков в длину (см. Wu, et al., (1998) *Biochim Biophys Acta*. 1387:422-32). Подходящие сплит-интеины могут иметь другие обеспечивающие очистку полипептидные элементы, добавляемые к их структуре, при условии, что такие элементы не ингибируют сплайсинг сплит-интеина, или их добавляют таким способом, который дает возможность удалить их перед сплайсингом. Сообщалось о сплайсинге белка с применением белков, которые содержат бактериальные интеин-подобные (BIL) домены (см. Amitai, et al., (2003) *Mol Microbiol*. 47:61-73) и самопроцессирующиеся домены hedgehog (Hog) (последние при объединении с интеинами называют суперсемейством Hog/интеин или семейством HINT (см. Dassa, et al., (2004) *J Biol Chem*. 279:32001-7), и домены, такие как эти, можно также применять для получения искусственно расщепленных интеинов. В частности, не подвергающихся сплайсингу представителей таких семейств можно модифицировать с помощью методик молекулярной биологии для введения или восстановления активности сплайсинга в таких родственных разновидностях. Последние исследования показывают, что сплайсинг можно наблюдать при обеспечении реакции N-терминального компонента сплит-интеина с C-терминальным компонентом сплит-интеина, при этом в естественных условиях он не является его "партнером"; например, сплайсинг наблюдали при использовании партнеров, которые всего на 30-50% гомологичны "природному" сплайсинг-партнеру (см. Dassa, et al., (2007) *Biochemistry*. 46(1):322-30). Было показано, что другие такие смеси несовместимых партнеров сплит-интеинов не реагируют друг с другом (см. Brenzel, et al., (2006) *Biochemistry*. 45(6):1571-8). Однако в пределах компетенции специалиста в соответствующей области определить, может ли конкретная пара полипептидов связываться друг с другом с обеспечением функционального интеина, с применением стандартных способов и без использования изобретательских навыков.

Разработка способов с применением рекомбинантной ДНК обеспечивала возможность исследовать эффекты транспозиции последовательностей на фолдинг, структуру и функцию белка.

Подход, применяемый при создании новых последовательностей, напоминает то, что происходит со встречающимися в природе парами белков, которые связываются посредством линейной реорганизации их аминокислотных последовательностей (Cunningham, et al., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:3218-3222; Teather and Erfle, (1990) *J. Bacteriol.* 172:3837-3841; Schimming, et al., (1992) *Eur. J. Biochem.* 204:13-19; Yamiuchi and Minamikawa, (1991) *FEBS Lett.* 260:127-130; MacGregor, et al., (1996) *FEBS Lett.* 378:263-266). Первое *in vitro* применение этого типа перестановки у белков описали Goldenberg и Creighton (*J. Mol. Biol.* 165:407-413, 1983). При создании варианта с круговыми перестановками новый N-конец выбирают во внутреннем сайте (точечный разрыв) оригинальной последовательности, при этом новая последовательность имеет такой же порядок аминокислот, как и оригинальная, от точечного разрыва до тех пор, пока она не достигает аминокислоты, которая находится в оригинальном C-конце или вблизи него. В данной точке новая последовательность присоединяется либо непосредственно, либо через дополнительную часть последовательности (линкер) к аминокислоте, которая находится на оригинальном N-конце или вблизи него, и новая последовательность продолжается такой же последовательностью, что и оригинальная до тех пор, пока она не достигнет точки, которая находится в аминокислоте, которая была N-терминальной по отношению к сайту точечного разрыва оригинальной последовательности, или вблизи нее, причем этот остаток образует новый C-конец цепи. Длину аминокислотной последовательности линкера можно выбирать эмпирически, или исходя из информации о структуре, или путем применения комбинации двух этих подходов. Если информация о структуре является недоступной, то можно получить небольшие серии линкеров для тестирования с использованием конструирования, длина которого варьирует для охвата диапазона от 0 до 50 Å и последовательность которого выбрана таким образом, чтобы соответствовать доступности поверхностных групп (гидрофильность, Hopp and Woods, (1983) *Mol. Immunol.* 20:483-489; Kyte and Doolittle, (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132; площади поверхности, доступной воздействию растворителя, Lee and Richards, (1971) *J. Mol. Biol.* 55:379-400) и способности прини-

мать необходимую конформацию без нарушения конфигурации пестицидного полипептида (конформационно подвижный; Karplus and Schulz, (1985) *Naturwissenschaften* 72:212-213). При условии, что при трансляции средняя длина остатка составляет 2,0-3,8 Å, это будет означать, что длина, подлежащая тестированию, будет составлять от 0 до 30 остатков, при этом предпочтительным диапазоном является 0-15 остатков. Примером такой эмпирической серии будет конструирование линкеров с применением касетной последовательности, такой как Gly-Gly-Gly-Ser, повторяемой  $n$  раз, где  $n$  составляет 1, 2, 3 или 4. Специалисты в данной области поймут, что существует множество таких последовательностей, варьирующихся по длине или составу, которые могут служить в качестве линкеров с первоочередным соображением, что они не являются ни чрезмерно длинными, ни чрезмерно короткими (см. Sandhu, (1992) *Critical Rev. Biotech.* 12:437-462); причем если они являются слишком длинными, то энтропийные эффекты, вероятно, будут дестабилизировать трехмерную укладку и также могут делать фолдинг кинетически невыполнимым, а если они являются слишком короткими, то они вероятно будут дестабилизировать молекулу вследствие скручивающей или стерической деформации. Специалисты, разбирающиеся в анализе информации о структуре белка, будут понимать, что при наличии расстояния между концами цепей, определяемого как расстояние между с-альфа атомами углерода, можно применять для определения длины используемой последовательности или по меньшей мере для ограничения числа возможностей, которые требуется протестировать при эмпирическом отборе линкеров. Они также будут понимать, что иногда встречается случай, когда положения концов полипептидной цепи являются нечеткими в структурных моделях, полученных по данным рентгеноструктурного анализа или ядерной магнитно-резонансной спектроскопии, и в случае такой ситуации, следовательно, ее необходимо принимать во внимание для правильной оценки длины требуемого линкера. На основании остатков, положение которых четко определено, выбирают два остатка, которые близки по последовательности к концам цепи, и расстояние между их с-альфа атомами углерода используют для расчета приблизительной длины для линкера между ними. С использованием расчетной длины в качестве предварительных данных далее отбирают линкеры в пределах диапазона количества остатков (из расчета 2-3,8 Å на остаток). Эти линкеры можно составлять из оригинальной последовательности, укороченной или удлиненной при необходимости, и в случае удлинения можно выбирать дополнительные остатки, которые являются гибкими и гидрофильными, как описано выше; или необязательно оригинальная последовательность может замещаться с применением серии линкеров, причем одним примером является вышеупомянутый подход с использованием касеты Gly-Gly-Gly-Ser; или необязательно можно применять комбинацию оригинальной последовательности и новой последовательности, имеющей подходящую общую длину.

Последовательности пестицидных полипептидов, способных к фолдингу с образованием биологически активных состояний, можно получать путем соответствующего отбора начальных (амино-конец) и конечных (карбоксильный конец) положений из оригинальной полипептидной цепи, при этом с применением линкерной последовательности, которая описана выше. Амино-конец и карбоксильный конец выбирают из общего отрезка последовательности, называемого участком точечного разрыва, с использованием нижеописанных рекомендаций. Таким образом, новую аминокислотную последовательность получают путем отбора amino-конца и карбоксильного конца из одного участка точечного разрыва. Во многих случаях выбор новых концов будет таким, что оригинальное положение карбоксильного конца непосредственно предшествует положению amino-конца. Однако специалисты в данной области поймут, что выборы концов в каком-либо месте в пределах участка могут оказывать влияние и что он фактически будет приводить либо к удалениям, либо к добавлениям к amino-части или карбоксильной части новой последовательности. Основным положением молекулярной биологии является то, что первичная аминокислотная последовательность белка обуславливает фолдинг в трехмерную структуру, необходимую для проявления его биологической функции. Специалистам в данной области известны способы получения и интерпретации информации о трехмерной структуре с применением рентгеноструктурного анализа одиночных кристаллов белка или ядерной магнитно-резонансной спектроскопии растворов белка. Примеры информации о структуре, которая подходит для идентификации участков точечного разрыва, включают расположение и тип вторичной структуры белка (альфа- и 3-10 спирали, параллельные и антипараллельные бета-слои, обращения или повороты цепи и петли; Kabsch and Sander, (1983) *Biopolymers* 22:2577-2637; степень доступности аминокислотных остатков для растворителя, масштаб и тип взаимодействий остатков друг с другом (Chothia, (1984) *Ann. Rev. Biochem.* 53:537-572), а также статическое и динамическое распределение конформаций на протяжении полипептидной цепи (Alber and Mathews, (1987) *Methods Enzymol.* 154:511-533). В некоторых случаях известна дополнительная информация о доступности остатков для растворителя; причем одним примером является сайт посттрансляционного прикрепления углеводов, который обязательно находится на поверхности белка. Если экспериментальная информация о структуре недоступна или ее невозможно получить, то также доступны способы для анализа первичной аминокислотной последовательности с тем, чтобы делать прогнозы о третичной и вторичной структуре белка, доступности для растворителя и наличии поворотов и петель. Для эмпирического определения доступности поверхностных групп также иногда применимы биохимические способы, если прямые способы определения структуры невозможны; например, применение идентификации сайтов деполимеризации после ограниченного протеолиза для того, чтобы делать заключение о доступности поверхностных

групп (Gentile and Salvatore, (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:603-621). Таким образом, путем применения либо информации о структуре, полученной экспериментальным путем, либо прогностических способов (например, Srinivisan and Rose, (1995) *Proteins: Struct., Funct. & Genetics* 22:81-99) проводят исследование исходной аминокислотной последовательности для классификации участков в отношении того, важны ли они для поддержания вторичной и третичной структур. Наличия последовательностей в участках, которые, как известно, участвуют в периодической вторичной структуре (альфа и 3-10 спирали, параллельные и антипараллельные бета-слои), следует избегать. Аналогично участки аминокислотной последовательности, которые, как наблюдается или прогнозируется, обладают низкой степенью доступности для действия растворителя, наиболее вероятно являются частью так называемого гидрофобного ядра белка, и их следует также избегать при выборе amino-конца или карбоксильного конца. В отличие от этого, участки, которые, как известно или прогнозируется, находятся в поверхностных поворотах или петлях, и в частности те участки, о которых известно, что они не требуются для биологической активности, являются предпочтительными сайтами для расположения противоположных концов полипептидной цепи. Предпочтительные непрерывные отрезки аминокислотной последовательности, основанные на вышеприведенных критериях, называют участком точечного разрыва. Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды РІР-72 с круговыми перестановками с новым N-концом/С-концом, которые содержат линкерный участок, отделяющий оригинальный С-конец и N-конец, фактически можно получать согласно способу, описанному в Mullins, et al., (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:5529-5533. Несколько стадий амплификации посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяют для перестройки последовательности ДНК, кодирующей первичную аминокислотную последовательность белка. Полинуклеотиды, кодирующие полипептиды РІР-72 с круговыми перестановками с новым N-концом/С-концом, которые содержат линкерный участок, отделяющий оригинальный С-конец и N-конец, можно получать на основе способа тандемных повторов, описанного в Horlick, et al., (1992) *Protein Eng.* 5:427-431. Амплификацию посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) генов с новыми N-концом/С-концом проводят с применением ДНК-матрицы с тандемными повторами.

Способы разработки и конструирования белков слияния (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области. Полинуклеотиды, кодирующие полипептид РІР-72, могут быть слиты с сигнальными последовательностями, которые будут управлять локализацией полипептида РІР-72 в конкретных компартментах прокариотической или эукариотической клетки и/или управлять секрецией полипептида РІР-72 согласно вариантам осуществления из прокариотической или эукариотической клетки. Например, в *E. coli* может потребоваться направить экспрессию белка в периплазматическое пространство. Примеры сигнальных последовательностей или белков (или их фрагментов), с которыми можно сливать полипептид РІР-72 с тем, чтобы направить экспрессию полипептида в периплазматическое пространство бактерий, включают без ограничения сигнальную последовательность *relB*, сигнальную последовательность белка, связывающего мальтозу (МВР), МВР, сигнальную последовательность *ompA*, сигнальную последовательность В-субъединицы периплазматического неустойчивого к нагреванию энтеротоксина *E. coli* и сигнальную последовательность щелочной фосфатазы. Для конструирования белков слияния коммерчески доступны несколько векторов, которые будут управлять локализацией белка, такие как серия векторов рМАL (в частности, серия рМАL-p), доступная от New England Biolabs® (County Road, 240, Ипсуич, Массачусетс, 01938-2723). В конкретном варианте осуществления полипептид РІР-72 можно сливать с сигнальной последовательностью пектатлиазы *relB* для увеличения эффективности экспрессии и очистки таких полипептидов в граммотрицательных бактериях (см. патенты США №№ 5576195 и 5846818). Слияния пластидный транзитный пептид растения/полипептид хорошо известны в уровне техники (см. патент США № 7193133). Апопластные транзитные пептиды, такие как сигнальная последовательность для секреции альфа-амилазы риса или ячменя, также хорошо известны в уровне техники. Пластидный транзитный пептид сливают, как правило, со стороны N-конца с полипептидом, подлежащим нацеливанию (например, партнером слияния). В одном варианте осуществления белок слияния состоит фактически из пластидного транзитного пептида и полипептида РІР-72, подлежащего нацеливанию. В другом варианте осуществления белок слияния состоит из пластидного транзитного пептида и полипептида, подлежащего нацеливанию. В таких вариантах осуществления пластидный транзитный пептид предпочтительно находится на N-конце белка слияния. Однако дополнительные аминокислотные остатки могут находиться на N-конце относительно пластидного транзитного пептида при условии, что белок слияния, по меньшей мере, частично нацеливается на пластиду. В определенном варианте осуществления пластидный транзитный пептид находится на N-терминальной половине, N-терминальной трети или N-терминальной четверти белка слияния. Как правило, большая часть или весь пластидный транзитный пептид вырезается из белка слияния после вставки в пластиду. Положение расщепления может слегка варьировать между видами растений, на различных стадиях развития растения, в результате специфических внутриклеточных условий или конкретной комбинации применяемого транзитного пептида/партнера слияния. В одном варианте осуществления сайт расщепления пластидного транзитного пептида является гомогенным, так что сайт расщепления является идентичным в популяции белков слияния. В другом варианте осуществления сайт расщепления пластидного транзитного пептида не является гомогенным, так что сайт расщепления варьирует по 1-10 аминокислотам в популяции бел-

ков слияния. Пластидный транзитный пептид можно рекомбинантно сливать со вторым белком одним из нескольких путей. Например, сайт распознавания рестрикционной эндонуклеазы можно вводить в нуклеотидную последовательность транзитного пептида в положении, соответствующем его С-терминальному концу, и такой же или совместимый сайт можно вводить способами генной инженерии в нуклеотидную последовательность белка, подлежащего нацеливанию, по его N-терминальному концу. При конструировании этих сайтов нужно позаботиться о том, чтобы быть уверенными в том, что кодирующие последовательности транзитного пептида и второго белка содержатся "в рамке" для обеспечения синтеза требуемого белка слияния. В некоторых случаях предпочтительным может быть удаление инициаторного метионинового кодона второго белка при введении нового сайта рестрикции. Введение сайтов распознавания рестрикционной эндонуклеазы в обе исходные молекулы и их последующее соединение посредством методик с использованием рекомбинантной ДНК может приводить к добавлению одной или нескольких дополнительных аминокислот между транзитным пептидом и вторым белком. Как правило, это не влияет на нацеливающую активность, поскольку сайт расщепления транзитного пептида остается доступным и функционирование второго белка не изменится при добавлении этих дополнительных аминокислот по его N-концу. В качестве альтернативы специалист в данной области может создать точный сайт расщепления между транзитным пептидом и вторым пептидом (с его иницирующим метионином или без него) с применением синтеза генов (Stemmer, et al., (1995) *Gene* 164:49-53) или аналогичных способов. В дополнение, слияние транзитного пептида может намеренно включать аминокислоты ниже сайта расщепления. Аминокислоты на N-конце зрелого белка могут воздействовать на способность транзитного пептида нацеливать белки в пластиды и/или эффективность расщепления после импорта белков. Это может зависеть от белка, подлежащего нацеливанию. См., например, Comai, et al., (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (29): 15104-9.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены белки слияния, содержащие полипептид РР-72 и инсектицидный полипептид, соединенные аминокислотным линкером.

Понятно, что последовательности ДНК можно изменять различными способами и что эти изменения могут приводить к последовательностям ДНК, кодирующим белки с аминокислотными последовательностями, отличными от тех, которые кодируют пестицидный белок дикого типа (или нативный). В некоторых вариантах осуществления полипептид РР-72 можно изменять различными путями, в том числе с помощью аминокислотных замен, делеций, усечений и вставок одной или нескольких аминокислот, включая до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок или их комбинаций по сравнению с полипептидными последовательностями, раскрытыми в данном документе.

Способы осуществления таких манипуляций, как правило, известны в уровне техники. Например, варианты аминокислотной последовательности полипептида РР-72 можно получать с помощью мутаций в ДНК. Это также можно осуществлять с помощью одной из нескольких форм мутагенеза и/или путем направленной эволюции. В некоторых аспектах изменения, закодированные в аминокислотной последовательности, не будут существенно влиять на функцию белка. Такие варианты будут обладать требуемой пестицидной активностью. Однако понятно, что способность полипептида РР-72 обеспечивать пестицидную активность можно улучшать путем применения таких методик в композициях согласно настоящему раскрытию.

Например, можно делать консервативные аминокислотные замены по одному или нескольким прогнозируемым несущественным аминокислотным остаткам. "Несущественный" аминокислотный остаток представляет собой остаток, который можно изменять относительно последовательности дикого типа полипептида РР-72 без изменения биологической активности. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещен на аминокислотный остаток, имеющий аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющие аналогичные боковые цепи, были определены в уровне техники. Такие семейства включают: аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин); кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту); полярными отрицательно заряженными остатками и их амидами (например, аспарагиновую кислоту, аспарагин, глутаминовую кислоту, глутамин); незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серии, треонин, тирозин, цистеин); небольшими алифатическими неполярными или слабополярными остатками (например, аланин, серии, треонин, пролин, глицин); неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); крупными алифатическими неполярными остатками (например, метионин, лейцин, изолейцин, валин, цистеин); бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин); ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин); крупными ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан).

Аминокислотные замены можно проводить в неконсервативных участках, которые сохраняют функцию. В целом такие замены не следует проводить для консервативных аминокислотных остатков или для аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве, где такие остатки являются

существенными для активности белка. Примеры остатков, которые являются консервативными и которые могут быть существенными для активности белка, включают, например, остатки, которые идентичны у всех белков, содержащихся в выравнивании аналогичных или родственных токсинов с последовательностями согласно вариантам осуществления (например, остатки, которые идентичны при выравнивании гомологов). Примеры остатков, которые являются консервативными, но которые могут обеспечивать консервативные аминокислотные замены и все еще сохранять активность, включают, например, остатки, которые характеризуются только консервативными заменами у всех белков, содержащихся в выравнивании аналогичных или родственных токсинов с последовательностями согласно вариантам осуществления (например, остатки, которые характеризуются только консервативными заменами у всех белков, содержащихся в выравнивании гомологов). Однако специалисту в данной области будет понятно, что функциональные варианты могут иметь незначительные консервативные или неконсервативные изменения по консервативным остаткам. Указания в отношении подходящих аминокислотных замен, которые не влияют на биологическую активность белка, представляющего интерес, можно найти в модели Dayhoff, et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), включенном в данный документ с помощью ссылки.

При осуществлении таких изменений можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот для обеспечения согласованной биологической функции белка в целом понятна в уровне техники (Kyte and Doolittle, (1982) J Mol Biol. 157(1):105-32). Признают, что относительная гидропатичность аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру полученного в результате белка, что в свою очередь определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п.

В уровне техники известно, что определенные аминокислоты можно замещать другими аминокислотами, имеющими аналогичный индекс или балл гидропатичности, и в результате все еще получать белок с аналогичной биологической активностью, т.е. по-прежнему получают эквивалентный белок с биологической функцией. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и зарядных характеристик (Kyte and Doolittle, *ibid*). Они являются следующими: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспаргат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5). При осуществлении таких изменений предпочтительной является замена аминокислот, индексы гидропатичности которых находятся в пределах до +2, особенно предпочтительной тех с индексами в пределах до +1 и даже более предпочтительной тех с индексами в пределах до +0,5.

В уровне техники также понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно проводить на основании гидрофильности. В патенте США № 4554101 заявляется, что наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью смежных аминокислот, коррелирует с биологическим свойством белка.

Как подробно описано в патенте США № 4554101, аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспаргат (+3,0.+0,1); глутамат (+3,0.+0,1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5.+0,1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4).

В качестве альтернативы изменения можно совершать в белковой последовательности многих белков на amino- или карбокси-конце без существенного влияния на активность. Они могут включать вставки, делеции или изменения, введенные с помощью современных молекулярных способов, таких как ПЦР, в том числе амплификации посредством ПЦР, которые изменяют или расширяют последовательность, кодирующую белок, за счет включения последовательностей, кодирующих аминокислоты, в олигонуклеотиды, используемые при амплификации посредством ПЦР. В качестве альтернативы добавленные белковые последовательности могут включать последовательности, кодирующие весь белок, например такие, которые обычно применяют в области техники для получения слияний белков. Такие белки слияния часто применяют для (1) усиления экспрессии белка, представляющего интерес, (2) введения связывающего домена, ферментативной активности или эпитопа для облегчения либо очистки белка, выявления белка либо других экспериментальных применений, известных в уровне техники, (3) нацеливания секреции или трансляции белка во внутриклеточную органеллу, такую как периплазматическое пространство грамотрицательных бактерий, митохондрия, или хлоропласты растений, или эндоплазматический ретикулум эукариотических клеток, причем последнее зачастую приводит к гликозилированию белка.

Вариантные нуклеотидные и аминокислотные последовательности по настоящему раскрытию также охватывают последовательности, полученные в результате процедур, связанных с мутациями и рекомбинациями, такими как ДНК-шаффлинг. С помощью такой процедуры один или несколько различных кодирующих участков полипептида PIP-72 можно применять для создания нового полипептида PIP-72, обладающего требуемыми свойствами. Таким образом, библиотеки рекомбинантных полинуклеотидов создают из популяции родственных по последовательностям полинуклеотидов, содержащих участки последовательностей, которые характеризуются значительной идентичностью последовательности и мо-

гут подвергаться гомологичной рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Например, с использованием данного подхода мотивы с кодирующими домен последовательностями, представляющими интерес, можно подвергать шаффлингу между пестицидным геном и другими известными пестицидными генами с получением нового гена, кодирующего белок с улучшенным свойством, представляющим интерес, таким как повышенная инсектицидная активность. Стратегии для такого ДНК-шаффлинга известны в уровне техники. См., например, Stemmer, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer, (1994) Nature 370:389-391; Cramer, et al., (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore, et al., (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang, et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer, et al., (1998) Nature 391:288-291; и патенты США №№ 5605793 и 5837458.

Замена доменов или шаффлинг представляет собой другой механизм создания измененных полипептидов PIP-72. Можно проводить замену доменов между полипептидами PIP-72, что дает гибридные или химерные токсины с улучшенной пестицидной активностью или спектром мишеней. Способы получения рекомбинантных белков и тестирования их в отношении пестицидной активности хорошо известны в уровне техники (см., например, Naimov, et al., (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd, et al., (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge, et al., (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf, et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang, et al., (1999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

Как ДНК-шаффлинг, так и сайт-направленный мутагенез применяли для определения полипептидных последовательностей, которые обладают пестицидной активностью. ДНК-шаффлинг применяли для получения библиотеки активных вариантов путем рекомбинации разнообразия, присутствующего в GVP A3175 (SEQ ID NO: 20) и PIP-72Da (SEQ ID NO: 10). Специалист в данной области сможет применять сравнения с другими белками или функциональные анализы для дальнейшего определения мотивов. Для тестирования вариаций этих мотивов можно применять высокопроизводительный скрининг для определения роли специфических остатков. Принимая во внимание данные о некоторых мотивах, затем можно определять требования относительно функционального белка. Данные о мотивах позволяют специалисту в данной области разрабатывать вариации последовательностей, которые не будут влиять на функцию.

Выравнивание гомологов PIP-72 позволило идентифицировать остатки, которые являются консервативными среди гомологов в данном семействе. Насыщающий мутагенез применяли для осуществления и тестирования замен в выбранных положениях аминокислот. Эти мутанты тестировали в отношении активности и идентифицировали ряд активных замен, не присутствующих у гомологов, что объясняет функциональные ограничения по этим остаткам.

#### Элементы сайленсинга

Предусматриваются элементы сайленсинга, которые при поглощении вредителем снижают экспрессию одной или нескольких целевых последовательностей, и тем самым при их помощи осуществляют контроль над вредителем (т.е. они обладают инсектицидной активностью).

Под "элементом сайленсинга" подразумевают полинуклеотид, который при контакте с насекомым-вредителем растений или при поглощении им способен снижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевого полинуклеотида или кодируемого им полипептида, и элемент сайленсинга может включать полинуклеотид, кодирующий полинуклеотид, который при контакте с вредителем или при поглощении им способен снижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевого полинуклеотида или кодируемого им полипептида. Соответственно следует понимать, что "элемент сайленсинга", используемый в данном документе, включает полинуклеотиды, такие как РНК-конструкции, ДНК-конструкции, кодирующие РНК-конструкции, экспрессирующие конструкции, содержащие ДНК-конструкции. В одном варианте осуществления используемый элемент сайленсинга может снижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевой последовательности путем влияния на уровень целевого РНК-транскрипта или альтернативно путем влияния на трансляцию, и тем самым воздействуя на уровень кодируемого полипептида. Способы анализа функциональных элементов сайленсинга, которые способны уменьшать уровень последовательности, представляющей интерес, или устранять ее, раскрыты в другой части данного документа. Единичный полинуклеотид, используемый в раскрытых способах, может содержать один или несколько элементов сайленсинга для одного и того же или различных целевых полинуклеотидов. Элемент сайленсинга можно получать *in vivo* (т.е. в клетке-хозяине, такой как растительная или клетка микроорганизма) или *in vitro*. Следует понимать, что "элемент сайленсинга", используемый в данном документе, предназначен включать в себя полинуклеотиды, такие как РНК-конструкции, ДНК-конструкции, кодирующие РНК-конструкции и/или экспрессирующие конструкции, содержащие ДНК-конструкции.

Используемые в данном документе "целевая последовательность" или "целевой полинуклеотид" включают любую последовательность у вредителя, уровень экспрессии которой необходимо уменьшить. В определенных вариантах осуществления при помощи снижения уровня целевой последовательности у вредителя осуществляют контроль вредителя. К примеру, целевая последовательность может быть необходима для роста и развития. Как подтверждено примером в другой части данного документа, при помощи снижения уровня экспрессии одной или нескольких из этих целевых последовательностей у вредителя растений из группы жесткокрылых или вредителя растений из рода *Diabrotica* осуществляют кон-

троль данного вредителя. В некоторых вариантах осуществления целевой полинуклеотид предусматривает SEQ ID NO: 981, 992, 993, 994 или 995.

В определенных вариантах осуществления элемент сайленсинга может включать в себя молекулу химерной конструкции, содержащую две или более раскрытых последовательностей. Например, химерная конструкция может представлять собой шпильку или dsRNA, раскрытые в данном документе. Химера может содержать две или более раскрытые последовательности. В одном варианте осуществления химера подразумевает две комплементарные последовательности, изложенные в данном документе, с некоторой степенью несовпадения комплементарных последовательностей, так что две последовательности не являются совершенно комплементарными друг другу. Обеспечение по меньшей мере двух различных последовательностей в единичном элементе сайленсинга может предоставлять возможность целенаправленного воздействия на несколько генов при применении одного элемента сайленсинга и/или, например, одной кассеты экспрессии. Целенаправленное воздействие на несколько генов может предоставлять возможность для замедления развития устойчивости или уменьшения возможности развития устойчивости у вредителя. Кроме того, обеспечение способности к целенаправленному воздействию на несколько мишеней у одной экспрессируемой молекулы может снижать экспрессионную нагрузку у трансформированного растения или продукта растительного происхождения или обеспечивать средства для местной обработки, способные целенаправленно воздействовать на нескольких хозяев при одном применении.

В определенных вариантах осуществления целевая последовательность не является эндогенной для растения. В других вариантах осуществления, несмотря на то, что при помощи элемента сайленсинга осуществляют контроль вредителей, предпочтительно элемент сайленсинга не оказывает эффекта на нормальные растение или часть растения.

Как обсуждается более подробно, элементы сайленсинга могут включать без ограничений смысловой супрессионный элемент, антисмысловой супрессионный элемент, двухцепочечную РНК, siRNA, miRNA или шпильчатый супрессионный элемент. Элемент сайленсинга, кроме того, может содержать дополнительные последовательности, которые оказывают благоприятный эффект на транскрипцию и/или стабильность полученного в результате транскрипта. Например, элементы сайленсинга могут содержать по меньшей мере один остаток тимина на 3'-конце. Это может содействовать стабилизации. Таким образом, элементы сайленсинга могут обладать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или большим количеством остатков тимина на 3'-конце. Как обсуждается более подробно ниже, усиливающие супрессию элементы также можно использовать в сочетании с элементами сайленсинга, раскрытыми в данном документе.

В варианте осуществления элементы сайленсинга могут включать в себя химеру, в которой две или более раскрытые последовательности, или их активные фрагменты, или варианты, или комплементарные им последовательности находятся в одной молекуле РНК. В различных вариантах осуществления раскрытая последовательность, или ее активный фрагмент, или вариант, или комплементарная ей последовательность может присутствовать в виде более чем одной копии в ДНК-конструкции, элементе сайленсинга, молекуле ДНК или молекуле РНК. В случае шпильки или молекулы dsRNA расположение смысловой или антисмысловой последовательности в молекуле, например, определяющее, какая последовательность транскрибируется первой или расположена на конкретном конце молекулы РНК, не ограничивается раскрытыми последовательностями, и dsRNA не должна ограничиваться раскрытым в данном документе конкретным расположением такой последовательности.

Под "уменьшает" или "уменьшение" уровня экспрессии полинуклеотида или кодируемого им полипептида, таким образом, подразумевают, что уровень полинуклеотида или полипептида целевой последовательности является статистически более низким, чем уровень полинуклеотида или уровень полипептида той же целевой последовательности в соответствующем контролируемом вредителе, которого не подвергали воздействию (т.е. который не поглощал) элемента сайленсинга. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения уменьшение уровня полинуклеотида и/или уровня полипептида целевой последовательности во вредителе согласно настоящему изобретению приводит в результате к менее чем 95%, менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10% или менее чем 5% уровню полинуклеотида или уровню кодируемого им полипептида той же самой целевой последовательности в соответствующем контролируемом вредителе.

#### i. Смысловые супрессионные элементы

Используемый в данном документе "смысловой супрессионный элемент" включает в себя полинуклеотид, разработанный для экспрессии молекулы РНК, соответствующей по меньшей мере части целевой матричной РНК в "смысловой" ориентации. Экспрессия молекулы РНК, содержащей смысловой супрессионный элемент, уменьшает уровень или устраняет целевой полинуклеотид или кодируемый им полипептид. Полинуклеотид, содержащий смысловой супрессионный элемент, может соответствовать всей длине или части последовательности целевого полинуклеотида, всей длине или части 5'- и/или 3'- транскрибируемого участка целевого полинуклеотида, всей длине или части кодирующей последовательности целевого полинуклеотида или всей длине или части как кодирующей последовательности, так и не-

транспируемых участков целевого полинуклеотида.

Как правило, смысловой супрессионный элемент характеризуется существенной идентичностью последовательности с целевым полинуклеотидом, как правило, идентичностью последовательности, составляющей более чем приблизительно 65%, идентичностью последовательности, составляющей более чем приблизительно 85%, идентичностью последовательности, составляющей приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. См. патенты США №№ 5283184 и 5034323, включенные в данный документ посредством ссылки. Смысловой супрессионный элемент может иметь любую длину при условии, что допускается супрессия целевой последовательности. Смысловой супрессионный элемент может составлять в длину, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 900, 1000, 1100, 1200, 1300 нуклеотидов целевых полинуклеотидов или больше. В других вариантах осуществления смысловой супрессионный элемент может составлять в длину, например, приблизительно 15-25, 19-35, 19-50, 25-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 450-500, 500-550, 550-600, 600-650, 650-700, 700-750, 750-800, 800-850, 850-900, 900-950, 950-1000, 1000-1050, 1050-1100, 1100-1200, 1200-1300, 1300-1400, 1400-1500, 1500-1600, 1600-1700, 1700-1800 нуклеотидов целевых полинуклеотидов или больше.

#### ii. Антисмысловые супрессионные элементы

Используемый в данном документе "антисмысловой супрессионный элемент" включает полинуклеотид, который разработан для экспрессии молекулы РНК, комплементарной всей или части целевой матричной РНК. Экспрессия супрессионного элемента на основе антисмысловой РНК уменьшает уровень или устраняет целевой полинуклеотид. Полинуклеотид для применения в антисмысловой супрессии может соответствовать всей или части последовательности, комплементарной последовательности, кодирующей целевой полинуклеотид, всей или части последовательности, комплементарной 5'- и/или 3'-нетранспируемому участку целевого полинуклеотида, всей или части последовательности, комплементарной кодирующей последовательности целевого полинуклеотида, или всей или части последовательности, комплементарной как кодирующей последовательности, так и нетранспируемым участкам целевого полинуклеотида. В дополнение, антисмысловой супрессионный элемент может быть полностью комплементарен (т.е. на 100% идентичен последовательности, комплементарной целевой последовательности) или частично комплементарен (т.е. менее чем на 100% идентичен последовательности, комплементарной целевой последовательности) целевому полинуклеотиду. В определенных вариантах осуществления антисмысловой супрессионный элемент предусматривает последовательность, которая комплементарна не менее чем на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% целевому полинуклеотиду. Антисмысловая супрессия может применяться для подавления экспрессии нескольких белков в одном и том же растении. См., например, патент США № 5942657. Кроме того, антисмысловой супрессионный элемент может быть комплементарен части целевого полинуклеотида. В целом можно использовать последовательности, состоящие по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 450 нуклеотидов или больше, из последовательности, изложенной для любого из целевых полинуклеотидов. Способы применения антисмысловой супрессии для подавления экспрессии эндогенных генов у растений описаны, например, в Liu et al (2002) *Plant Physiol.* 129:1732-1743 и патентах США №№ 5759829 и 5942657, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

#### iii. Супрессионный элемент на основе двухцепочечной РНК

"Элемент сайленсинга на основе двухцепочечной РНК" или "dsRNA" включает в себя по меньшей мере один транскрипт, который способен образовывать dsRNA либо перед поглощением, либо после поглощения вредителем. Таким образом, "элемент сайленсинга на основе dsRNA" включает в себя dsRNA, транскрипт или полирибонуклеотид, способный образовывать dsRNA, или более одного транскрипта или полирибонуклеотида, способных образовывать dsRNA. "Двухцепочечная РНК" или "dsRNA" относится к полирибонуклеотидной структуре, образуемой одной самокомплементарной молекулой РНК, или полирибонуклеотидной структуре, образуемой путем экспрессии по меньшей мере двух отдельных цепей РНК. Молекула(ы) dsRNA, используемая(е) в способах и композициях по настоящему изобретению, опосредует(ют) уменьшение экспрессии целевой последовательности, например путем опосредования РНК-интерференции, "RNAi", или сайленсинга генов способом, специфическим в отношении последовательности. В контексте настоящего изобретения dsRNA способна уменьшать уровень экспрессии или устранять экспрессию по меньшей мере одного целевого полинуклеотида или кодируемого им полипептида у вредителя.

dsRNA может понижать уровень экспрессии или устранять экспрессию целевой последовательности путем влияния на уровень целевого РНК-транскрипта, путем влияния на трансляцию и тем самым воздействовать на уровень кодируемого полипептида или путем влияния на экспрессию на претрансляционном уровне (т.е. путем модуляции структуры хроматина, паттерна метилирования и т.д. для изменения генной экспрессии). См., например, Verdel et al. (2004) *Science* 303:672-676; Pal-Bhadra et al. (2004) *Science* 303:669-672; Allshire (2002) *Science* 297:1818-1819; Volpe et al. (2002) *Science* 297:1833-1837; Jenuwein (2002) *Science* 297:2215-2218 и Hall et al. (2002) *Science* 297:2232-2237. Способы анализа функциональных dsRNA, которые способны уменьшать уровень последовательности, представляющей интерес, или устранять ее, раскрыты в другой части данного документа. Соответственно, как используется в

данном документе, термин "dsRNA" предназначен охватывать другие термины, используемые для описания молекул нуклеиновой кислоты, которые способны к опосредованию РНК-интерференции или сайленсинга генов, в том числе, например, короткие interfering РНК (siRNA), двухцепочечные РНК (dsRNA), микроРНК (miRNA), шпилечные РНК, короткие шпилечные РНК (shRNA), РНК посттранскрипционного сайленсинга генов (ptgsRNA) и другие.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь дуплекса или двухцепочечного участка dsRNA обладает достаточной степенью идентичности последовательности или комплементарности последовательности с целевым полинуклеотидом для предоставления возможности dsRNA уменьшать уровень экспрессии целевой последовательности. Используемая в данном документе цепь, которая комплементарна целевому полинуклеотиду, представляет собой "антисмысловую цепь", а цепь, гомологичная целевому полинуклеотиду, представляет собой "смысловую цепь".

В другом варианте осуществления dsRNA включает в себя шпилечную РНК. Шпилечная РНК включает в себя молекулу РНК, которая способна к сворачиванию сама с собой с образованием двухцепочечной структуры. В качестве шпилечных элементов могут использоваться различные структуры. В определенных вариантах осуществления супрессионный элемент на основе dsRNA представляет собой шпилечный элемент, который содержит в следующем порядке: первый сегмент, второй сегмент и третий сегмент, при этом первый и третий сегменты обладают достаточной степенью комплементарности, чтобы предоставить возможность для образования транскрибированной РНК двухцепочечной структуры типа "стебель-петля".

"Второй сегмент" шпильки включает в себя "петлю" или "участок петли". В данном документе эти термины используют как синонимы, и их следует толковать в широком смысле как включающие в себя любую нуклеотидную последовательность, которая предоставляет достаточную гибкость для обеспечения внутреннего спаривания оснований между комплементарными участками полинуклеотида (т.е. сегментами 1 и 3, которые образуют "стебель" шпильки). Например, в некоторых вариантах осуществления участок "петли" может быть в значительной степени одноцепочечным и действовать как спейсер между самокомплементарными участками шпильки типа "стебель-петля". В некоторых вариантах осуществления участок "петли" может содержать случайную или нонсенс нуклеотидную последовательность, и, таким образом, идентичность последовательности с целевым полинуклеотидом отсутствует. В других вариантах осуществления участок "петли" содержит смысловую или антисмысловую последовательность РНК или ее фрагмент, который обладает идентичностью с целевым полинуклеотидом. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 02/00904, включенную в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления участок "петли" можно оптимизировать таким образом, чтобы он был как можно более коротким и при этом все еще обеспечивал достаточную внутримолекулярную гибкость, чтобы давать возможность образовываться участку "стебля" со спаренными основаниями. Соответственно последовательность "петли" в целом составляет менее 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 10 нуклеотидов или меньше.

"Первый" и "третий" сегменты шпилечной молекулы РНК содержат "стебель" со спаренными основаниями шпилечной структуры. Первый и третий сегменты представляют собой инвертированные повторы друг друга, и они обладают достаточной степенью комплементарности, чтобы предоставлять возможность для образования участка "стебля" со спаренными основаниями. В определенных вариантах осуществления первый и третий сегменты полностью комплементарны друг другу. Альтернативно первый и третий сегменты могут быть частично комплементарны друг другу при условии, что они способны к гибридизации друг с другом, образуя участок "стебля" со спаренными основаниями. Показатель комплементарности между первым и третьим сегментами можно рассчитать как процентную долю относительно полного сегмента. Таким образом, первый и третий сегменты шпилечной РНК в целом обладают по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% до и включительно 100% комплементарности.

Первый и третий сегменты составляют по меньшей мере приблизительно 1000, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 40, 30, 25, 22, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или 10 нуклеотидов в длину. В определенных вариантах осуществления длина первого и/или третьего сегмента составляет приблизительно 10-100 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 75 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 35 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 25 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 19 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 50 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 150 нуклеотидов до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 нуклеотидов до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 нуклеотидов до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 300 нуклеотидов до приблизительно 350 нуклеотидов, от приблизительно 350 нуклеотидов до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 400 нуклеотидов до приблизительно 500 нук-

леотидов, приблизительно 600 нуклеотидов, приблизительно 700 нуклеотидов, приблизительно 800 нуклеотидов, приблизительно 900 нуклеотидов, приблизительно 1000 нуклеотидов, приблизительно 1100 нуклеотидов, приблизительно 1200 нуклеотидов, 1300 нуклеотидов, 1400 нуклеотидов, 1500 нуклеотидов, 1600 нуклеотидов, 1700 нуклеотидов, 1800 нуклеотидов, 1900 нуклеотидов, 2000 нуклеотидов или более. В других вариантах осуществления длина первого и/или третьего сегмента составляет по меньшей мере 10-19 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов; 19-35 нуклеотидов, 20-35 нуклеотидов; 30-45 нуклеотидов; 40-50 нуклеотидов; 50-100 нуклеотидов; 100-300 нуклеотидов; приблизительно 500-700 нуклеотидов; приблизительно 700-900 нуклеотидов; приблизительно 900-1100 нуклеотидов; приблизительно 1300-1500 нуклеотидов; приблизительно 1500-1700 нуклеотидов; приблизительно 1700-1900 нуклеотидов; приблизительно 1900-2100 нуклеотидов; приблизительно 2100-2300 нуклеотидов или приблизительно 2300-2500 нуклеотидов. См., например, публикацию международной патентной заявки № WO 02/00904. В определенных вариантах осуществления первый и третий сегменты содержат по меньшей мере 20 нуклеотидов по меньшей мере с 85% комплементарностью с первым сегментом. В еще одних вариантах осуществления первый и третий сегменты, которые образуют структуру типа "стебель-петля" шпильки, содержат 3'-или 5'-выступающие участки с неспаренными нуклеотидными остатками.

Раскрытые шпилечные молекулы или молекулы двухцепочечной РНК могут иметь более одной целевой последовательности, или ее активных фрагментов, или вариантов, или комплементарных ей последовательностей, находящихся в одной и той же части молекулы РНК. Например, в химерной шпилечной структуре первый сегмент шпилечной молекулы содержит два полинуклеотидных отрезка, причем каждый с разной целевой последовательностью. Например, при считывании с одного конца шпильки первый сегмент состоит из последовательностей из двух отдельных генов (А, за которым следует В). За первым сегментом следует второй сегмент, часть "петли" шпильки. За сегментом "петли" следует третий сегмент, в котором обнаруживаются комплементарные цепи последовательностей первого сегмента (В\*, за которым следует А\*) при образовании структуры типа "стебель-петля", шпилечной структуры, "стебель" содержит последовательности А-А\* на дистальном конце "стебля" и последовательности В-В\* вблизи участка "петли".

В определенных вариантах осуществления последовательности, используемые в первом, втором и/или третьем сегменте, содержат домены, которые разработаны таким образом, чтобы обладать достаточной степенью идентичности последовательности с целевым полинуклеотидом, представляющим интерес, и тем самым обладают способностью к снижению уровня экспрессии целевого полинуклеотида. Специфичность ингибирующих РНК-транскриптов, следовательно, в целом обеспечивается этими доменами элемента сайленсинга. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления первый, второй и/или третий сегмент элемента сайленсинга содержит домен, характеризующийся по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000 или более чем 1000 нуклеотидов, которые обладают достаточной степенью идентичности последовательности с целевым полинуклеотидом, что позволяет снижать уровни экспрессии целевого полинуклеотида в ходе экспрессии в соответствующей клетке. В других вариантах осуществления домен составляет приблизительно от 15 до 50 нуклеотидов, приблизительно 19-35 нуклеотидов, приблизительно 20-35 нуклеотидов, приблизительно 25-50 нуклеотидов, приблизительно от 19 до 75 нуклеотидов, приблизительно от 20 до 75 нуклеотидов, приблизительно 40-90 нуклеотидов, приблизительно 15-100 нуклеотидов, 10-100 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 75 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 50 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 40 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 35 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 25 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 20 нуклеотидов, от приблизительно 10 до приблизительно 19 нуклеотидов, от приблизительно 50 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 100 нуклеотидов до приблизительно 150 нуклеотидов, от приблизительно 150 нуклеотидов до приблизительно 200 нуклеотидов, от приблизительно 200 нуклеотидов до приблизительно 250 нуклеотидов, от приблизительно 250 нуклеотидов до приблизительно 300 нуклеотидов, от приблизительно 300 нуклеотидов до приблизительно 350 нуклеотидов, от приблизительно 350 нуклеотидов до приблизительно 400 нуклеотидов, от приблизительно 400 нуклеотидов до приблизительно 500 нуклеотидов или более. В других вариантах осуществления длина первого и/или третьего сегмента составляет по меньшей мере 10-20 нуклеотидов, по меньшей мере 10-19 нуклеотидов, 20-35 нуклеотидов, 30-45 нуклеотидов, 40-50 нуклеотидов, 50-100 нуклеотидов или приблизительно 100-300 нуклеотидов.

В определенных вариантах осуществления домен первого, второго и/или третьего сегмента имеет последовательность, которая на 100% идентична целевому полинуклеотиду. В других вариантах осуществления домен первого, второго и/или третьего сегмента, характеризующийся гомологией с целевым полипептидом, предусматривает последовательность, которая по большей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична участку целевого полинуклеотида. Идентичность последовательностей доменов первого, второго и/или третьего сегментов

целевому полинуклеотиду должна быть до такой степени, которая достаточна для снижения экспрессии целевого полинуклеотида, представляющего интерес. См., например, Chuang and Meyerowitz (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4985-4990; Stoutjesdijk et al. (2002) *Plant Physiol.* 129:1723-1731; Waterhouse and Helliwell (2003) *Nat. Rev. Genet.* 4:29-38; Pandolfini et al. *BMC Biotechnology* 3:7 и публикацию заявки на выдачу патента США № 20030175965, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Анализ транзientной экспрессии для оценки эффективности конструкций hpRNA для сайленсинга генов in vivo был описан Panstruga et al. (2003) *Mol. Biol. Rep.* 30:135-140.

Показатель комплементарности между первым, вторым и/или третьим сегментом и целевым полинуклеотидом или показатель комплементарности между первым сегментом и третьим сегментом (т.е. "стебель" в шпилечной структуре) могут варьироваться в зависимости от организма, в котором требуется контролировать генную экспрессию. Для некоторых организмов или типов клеток может требоваться точное спаривание или 100% идентичность, при этом другие организмы или типы клеток могут допускать некоторые несовпадения. В некоторых клетках, например, несовпадения единичного нуклеотида в последовательности для целенаправленного воздействия уничтожает способность к супрессии генной экспрессии. В этих клетках раскрываемые кассеты супрессии можно применять для целенаправленной супрессии мутантных генов, например онкогенов, транскрипты которых содержат точковые мутации, и, следовательно, на них можно специфически целенаправленно воздействовать с применением раскрытых в данном документе способов и композиций без изменения экспрессии оставшегося аллеля дикого типа. У других организмов холистическая вариабельность последовательности может допускаться при условии, что какой-либо участок последовательности из 22 нуклеотидов представлен со 100% гомологией между целевым полинуклеотидом и кассетой супрессии.

В других вариантах осуществления элемент сайленсинга может включать в себя малую РНК (sRNA). sRNA могут включать в себя как микроРНК (miRNA), так и короткие интерферирующие РНК (siRNA) (Meister and Tuschl (2004) *Nature* 431:343-349 и Bonetta et al. (2004) *Nature Methods* 1:79-86). miRNA представляют собой регуляторные средства, содержащие от приблизительно 19 до приблизительно 24 рибонуклеотидов в длину, которые высокоэффективны для подавления экспрессии целевых полинуклеотидов. См., например, Javier et al. (2003) *Nature* 425: 257-263, включенные в данный документ посредством ссылки. В случае miRNA-интерференции можно разрабатывать элемент сайленсинга для экспрессии молекулы dsRNA, которая образует шпилечную структуру или структуру с частично спаренными основаниями, содержащую последовательность из 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, которая комплементарна представляющему интерес целевому полинуклеотиду. miRNA можно получать синтетическим способом или путем транскрипции в виде более длинной РНК, которая затем расщепляется с образованием активной miRNA. А именно, miRNA может содержать 19 нуклеотидов последовательности, характеризующейся гомологией с целевым полинуклеотидом в смысловой ориентации, и 19 нуклеотидов соответствующей антисмысловой последовательности, которая комплементарна смысловой последовательности. miRNA может представлять собой "искусственную miRNA" или "amiRNA", которая содержит последовательность miRNA, разработанную синтетическим способом для осуществления сайленсинга целевой последовательности.

В раскрытых в данном документе способах и композициях используют элементы сайленсинга, которые при транскрипции "образуют" молекулу dsRNA. Соответственно гетерологичный полинуклеотид, подлежащий экспрессии, не обязательно должен образовывать dsRNA самостоятельно, но может взаимодействовать с другими последовательностями в растительной клетке или в кишке вредителя после поглощения для предоставления возможности образования dsRNA. Например, химерный полинуклеотид, при помощи которого можно осуществлять селективный сайленсинг целевого полинуклеотида, можно получать с помощью экспрессии химерной конструкции, содержащей целевую последовательность для miRNA или siRNA с последовательностью, соответствующей всей или части гена или генов, подлежащих сайленсингу. В этом варианте осуществления dsRNA "образуется", когда мишень для miRNA или siRNA взаимодействует с miRNA, присутствующей в клетке. При помощи полученной в результате dsRNA затем можно уменьшать уровень экспрессии гена или генов, подлежащих сайленсингу. См., например, публикацию заявки на выдачу патента США № 2007-0130653, озаглавленную "Methods and Compositions for Gene Silencing". Можно разрабатывать конструкцию так, чтобы она содержала мишень для эндогенной miRNA, или альтернативно мишень для гетерологичной и/или синтетической miRNA можно использовать в конструкции. Если используется гетерологичная и/или синтетическая miRNA, ее можно вводить в клетку на той же нуклеотидной конструкции в виде химерного полинуклеотида или на отдельной конструкции. Как обсуждается в другой части данного документа, любой способ можно применять для введения конструкции, содержащей гетерологичную miRNA.

Используемые в данном документе "осуществление контроля вредителя" или "контроль вредителя" подразумевают какое-либо воздействие на вредителя, что приводит к ограничению повреждения, которое вызывает вредитель. Контроль вредителя включает без ограничений уничтожение вредителя, подавление развития вредителя, изменение плодовитости или роста вредителя таким образом, что вредитель наносит меньшее повреждение растению, снижение количества производимого потомства, получение менее приспособленных вредителей, получение вредителей, более восприимчивых к нападению хищни-

ков, или удерживание вредителей от поедания растения.

Уменьшение у вредителя уровня экспрессии целевого полинуклеотида или кодируемого им полипептида приводит таким образом к супрессии, контролю и/или уничтожению поражающего патогенного организма. Уменьшение у вредителя уровня экспрессии целевой последовательности будет ослаблять симптомы заболевания, полученные в результате введения патогена, на по меньшей мере от приблизительно 2%, по меньшей мере до приблизительно 6%, по меньшей мере от приблизительно 5% до приблизительно 50%, по меньшей мере от приблизительно 10% до приблизительно 60%, по меньшей мере от приблизительно 30% до приблизительно 70%, по меньшей мере от приблизительно 40% до приблизительно 80% или по меньшей мере от приблизительно 50% до приблизительно 90% или больше. Следовательно, способы по настоящему изобретению можно использовать для контроля вредителей, в частности вредителя растений из группы жесткокрылых или вредителя растений из рода *Diabrotica*.

Анализы, измеряющие уровень контроля вредителя, широко известны из уровня техники, как и способы для осуществления количественного анализа устойчивости к заболеваниям у растений после заражения патогеном. См., например, патент США № 5614395, включенный в данный документ путем ссылки. Такие методики включают измерение во времени среднего диаметра поражения, биомассы патогена и общего процента разложившихся тканей растений. См., например, Thomma et al. (1998) *Plant Biology* 95:15107-15111, включенный в данный документ посредством ссылки. См. также Baum et al. (2007) *Nature Biotech* 11:1322-1326 и WO 2007/035650, в которых предоставлены как анализы в отношении питания всем растением, так и анализы в отношении питания корнями кукурузы. Каждая из этих ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### Композиции

Также охвачены композиции, содержащие полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит целенаправленно воздействующий на RyanR (SEQ ID NO: 992), HP2 (SEQ ID NO: 994) или RPS10 (SEQ ID NO: 995) элемент сайленсинга. В одном варианте осуществления композиция содержит полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга, где элемент сайленсинга предусматривает любую из SEQ ID NO: 982-991, 993 или SEQ ID NO: 561-572 из публикаций заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 и US 2015/0257389.

Один или несколько полинуклеотидов, содержащих элемент сайленсинга, можно предоставлять в виде композиции для наружного применения, такой как раствор для опрыскивания или порошок для растения, части растения, семени, насекомого-вредителя растений или возделываемой площади. Подразумевается, что композиция может содержать клетку (такую как растительная клетка или бактериальная клетка), в которой полинуклеотид, кодирующий PIP-72 и элемент сайленсинга, стабильно внедрен в геном и функционально связан с промоторами, активными в клетке. В других вариантах осуществления композиции, содержащие PIP-72 и элемент сайленсинга, не содержатся в клетке. В таких вариантах осуществления композицию можно применять в отношении площади, где обитает насекомое-вредитель растений. В одном варианте осуществления композицию применяют наружно в отношении растения (т.е. путем опрыскивания поля или площади возделывания) для защиты растения от вредителя. Способы внесения нуклеотидов таким путем известны специалистам в данной области.

Композицию по настоящему изобретению, кроме того, можно составлять в виде приманки. В этом варианте осуществления композиции содержат пищевой продукт или аттрактант, который усиливает привлекательность композиции для вредителя.

Композицию, содержащую PIP-72 и элемент сайленсинга, можно составлять в подходящем с точки зрения сельского хозяйства и/или приемлемом с экологической точки зрения носителе. Такие носители могут представлять собой любой материал, который может переносить животное, растение или окружающая среда, подлежащие обработке. Кроме того, носитель должен быть таким, чтобы композиция оставалась эффективной для контроля насекомого-вредителя растений. Примеры таких носителей включают воду, солевой раствор, раствор Рингера, растворы декстрозы или других сахаров, раствор Хенкса и другие водные физиологически сбалансированные солевые растворы, фосфатный буфер, бикарбонатный буфер и Tris-буфер. В дополнение композиция может включать соединения, которые повышают период полураспада композиции. Различные инсектицидные составы также можно найти, например, в публикациях заявок на выдачу патентов США №№ 2008/0275115, 2008/0242174, 2008/0027143, 2005/0042245 и 2004/0127520, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

#### Нуклеотидные конструкции, кассеты и векторы экспрессии

Использование термина "нуклеотидные конструкции" в данном документе не предназначено ограничивать варианты осуществления нуклеотидными конструкциями, содержащими ДНК. Специалисту обычной квалификации в данной области будет понятно, что нуклеотидные конструкции, в частности полинуклеотиды и олигонуклеотиды, состоящие из рибонуклеотидов и комбинаций рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, также можно использовать в способах, раскрытых в данном документе. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления дополнительно охватывают все комплементарные формы таких конструкций, молекул и последовательностей. Кроме того, нуклеотидные конструкции, нуклеотидные молекулы и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления охватывают все нуклеотидные конструкции,

молекулы и последовательности, которые можно использовать в способах согласно вариантам осуществления для трансформации растений, в том числе без ограничения состоящие из дезоксирибонуклеотидов, рибонуклеотидов и их комбинаций. Такие дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды имеют в составе как встречающиеся в природе молекулы, так и синтетические аналоги. Нуклеотидные конструкции, нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления также охватывают все формы нуклеотидных конструкций, в том числе без ограничения одноцепочечные формы, двухцепочечные формы, шпильки, структуры "стебель-и-петля" и т.п.

Дополнительный вариант осуществления относится к трансформированному организму, такому как организм, выбранный из растительных клеток или клеток насекомых, бактерий, дрожжей, бакуловируса, простейших, нематод и водорослей.

Трансформированный организм содержит молекулу ДНК согласно вариантам осуществления, каскету экспрессии, содержащую молекулу ДНК, или вектор, содержащий каскету экспрессии, которые могут быть стабильно встроенными в геном трансформированного организма.

Последовательности согласно вариантам осуществления предусматриваются в составе ДНК-конструкций для экспрессии в организме, представляющем интерес. Конструкции будут включать 5' и 3' регуляторные последовательности, функционально связанные с последовательностью согласно вариантам осуществления. Термин "функционально связанный", используемый в данном документе, относится к функциональной связи между промотором и второй последовательностью, где последовательность промотора инициирует и опосредует транскрипцию последовательности ДНК, соответствующей второй последовательности. Как правило, функционально связанный означает, что связанные последовательности нуклеиновой кислоты являются смежными и при необходимости соединяют два кодирующих белок участка в одной рамке считывания. Конструкция может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный ген, подлежащий введению в организм путем котрансформации. В качестве альтернативы дополнительный(е) ген(ы) может(ут) предусматриваться в нескольких ДНК-конструкциях.

Как правило, в направлении транскрипции от 5' к 3' концу ДНК-конструкция будет включать: участок инициации транскрипции и трансляции (т.е. промотор), последовательность ДНК согласно вариантам осуществления и участок терминации транскрипции и трансляции (т.е. участок терминации), функционирующие в организме, служащем хозяином. Участок инициации транскрипции (т.е. промотор) может быть нативным, аналогичным, чужеродным или гетерологичным относительно организма-хозяина и/или последовательности согласно вариантам осуществления. Кроме того, промотор может представлять собой природную последовательность или, в качестве альтернативы, синтетическую последовательность. Термин "чужеродный", используемый в данном документе, указывает на то, что промотор не найден в нативном организме, в который введен промотор. Если промотор является "чужеродным" или "гетерологичным" относительно последовательности согласно вариантам осуществления, то предполагается, что промотор не является нативным или встречающимся в природе промотором для функционально связанной последовательности согласно вариантам осуществления. Если промотор представляет собой нативную или природную последовательность, то экспрессия функционально связанной последовательности изменена по сравнению с экспрессией дикого типа, что приводит к изменению фенотипа.

Полинуклеотид, кодирующий элемент сайленсинга или, в определенных вариантах осуществления, используемый в раскрытых способах и композициях, может быть предоставлен в каскетах экспрессии для экспрессии в растении или организме, представляющем интерес. Подразумевается, что можно применять несколько элементов сайленсинга, в том числе несколько идентичных элементов сайленсинга, несколько элементов сайленсинга, целенаправленно воздействующих на различные участки целевой последовательности, или несколько элементов сайленсинга из различных целевых последовательностей. В этом варианте осуществления подразумевается, что каждый элемент сайленсинга может содержаться в единичной или отдельной каскете, ДНК-конструкции или векторе. Как обсуждается, предусматривается любое средство получения элемента сайленсинга.

В другом варианте осуществления из каскеты супрессии экспрессируется двухцепочечная РНК. Такая каскета может содержать два конвергентных промотора, которые запускают транскрипцию функционально связанного элемента сайленсинга. "Конвергентными промоторами" называют промоторы, которые ориентированы на любом из концов функционально связанного элемента сайленсинга таким образом, что каждый промотор запускает транскрипцию элемента сайленсинга в противоположных направлениях, что дает два транскрипта. В таких вариантах осуществления конвергентные промоторы обеспечивают возможность транскрипции смысловой и антисмысловой цепей и, таким образом, обеспечивают возможность образования dsRNA. Такая каскета может также содержать два дивергентных промотора, которые запускают транскрипцию одного или нескольких функционально связанных элементов сайленсинга. "Дивергентными промоторами" называют промоторы, которые ориентированы в противоположных направлениях относительно друг друга, при этом они запускают транскрипцию одного или нескольких элементов сайленсинга в противоположных направлениях. В таких вариантах осуществления дивергентные промоторы обеспечивают возможность транскрипции смысловой и антисмысловой цепей и обеспечивают возможность образования dsRNA. В таких вариантах осуществления дивергентные промоторы также обеспечивают возможность транскрипции по меньшей мере двух отдельных шпилечных

РНК. В другом варианте осуществления в конструкции присутствует одна кассета, содержащая два или более элементов сайленсинга под контролем двух отдельных промоторов в одной и той же ориентации. В другом варианте осуществления в конструкции в одной и той же ориентации присутствуют две или более индивидуальных кассет, при этом каждая содержит по меньшей мере один элемент сайленсинга под контролем промотора.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция может также включать последовательность транскрипционного энхансера. Термин "энхансер", используемый в данном документе, относится к последовательности ДНК, которая может стимулировать активность промотора и которая может представлять собой характерный элемент промотора или гетерологичный элемент, вставленный для повышения уровня активности или тканевой специфичности промотора. В уровне техники известны различные энхансеры, в том числе, например, интроны, со свойствами усиления экспрессии гена в растениях (публикация заявки на выдачу патента США № 2009/0144863, убиквитиновый интрон (т.е. убиквитиновый интрон 1 маиса (см., например, последовательность из NCBI S94464; Christensen and Quail (1996) *Transgenic Res.* 5:213-218; Christensen et al. (1992) *Plant Molecular Biology* 18:675-689)), энхансер омега и энхансер омега штрих (Gallie, et al., (1989) *Molecular Biology of RNA* ed. Cech (Liss, New York) 237-256 и Gallie, et al., (1987) *Gene* 60:217-25), энхансер 35S CaMV (см., например, Benfey, et al., (1990) *EMBO J.* 9:1685-96), интрон маиса Adh I (Kyoizuka et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 228:40-48; Kyoizuka et al. (1990) *Maydica* 35:353-357), также можно применять энхансеры из патента США № 7803992 и энхансер палочковидного вируса сахарного тростника (SCBV) из документа WO 2013130813, каждый из которых включен посредством ссылки. Вышеприведенный перечень транскрипционных энхансеров не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой подходящий транскрипционный энхансер.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга. В одном варианте осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотиды, кодирующие полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга, где элемент сайленсинга целенаправленно воздействует на RyanR (SEQ ID NO: 992), HP2 (SEQ ID NO: 994) или RPS10 (SEQ ID NO: 995). В другом варианте осуществления ДНК-конструкция содержит полинуклеотиды, кодирующие полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга, где элемент сайленсинга предусматривает любую из SEQ ID NO: 982-991, 993 или SEQ ID NO: 561-572 из публикаций заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 и US 2015/0257389.

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. чужеродный или гетерологичный для промотора, последовательности, представляющей интерес, растения-хозяина или какой-либо их комбинации).

Подходящие участки терминации доступны из Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, такие как участки терминации генов октописинтазы и нопалинсинтазы. См. также Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen, et al., (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe, et al., (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903 и Joshi, et al., (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

При необходимости нуклеиновую кислоту можно оптимизировать для усиления экспрессии в организме-хозяине. Таким образом, если организм-хозяин является растением, то для усиления экспрессии можно синтезировать синтетические нуклеиновые кислоты с применением кодонов, предпочтительных для растений. См., например, Campbell and Gowri, (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11, где обсуждается применение кодонов, предпочтительных для хозяина. Например, хотя последовательности нуклеиновой кислоты согласно вариантам осуществления могут экспрессироваться как у видов однодольных, так и видов двудольных растений, последовательности можно модифицировать с учетом специфичных предпочтений кодонов и предпочтений по содержанию GC у однодольных или двудольных, если было показано, что предпочтения отличаются (Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498). Таким образом, кодон, предпочтительный для маиса, для конкретной аминокислоты можно получить из известных последовательностей генов маиса. Данные о частоте использования кодонов в маисе для 28 генов из растений маиса приведены в таблице 4 в Murray, et al., выше. В уровне техники доступны способы синтеза генов, предпочтительных для растений. См., например, патенты США №№ 5380831 и 5436391, а также Murray, et al., (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498 и Liu H et al. *Mol Bio Rep* 37:677-684, 2010, включенные в данный документ с помощью ссылки. Таблицу использования кодонов *Zea mays* можно найти на веб-сайте по адресу [kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577](http://kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4577), доступ к которому можно получить с использованием префикса www.

Таблицу использования кодонов *Glycine max* можно найти на веб-сайте по адресу [kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847&aa=1&style=N](http://kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847&aa=1&style=N), доступ к которому можно получить с использованием префикса www.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, имеет кодоны, оптимизированные для маиса.

Известны дополнительные модификации последовательности для усиления экспрессии гена у клеточного хозяина. Они включают устранение последовательностей, кодирующих ложные сигналы полиаденилирования, сигналы сайта сплайсинга экзонов и интронов, транспозон-подобные повторы и другие хорошо изученные последовательности, которые могут быть вредны для экспрессии гена. Содержание GC в последовательности можно скорректировать до уровней, средних для данного клеточного хозяина, рассчитываемых с учетом известных генов, экспрессируемых в клетке-хозяине. Термин "клетка-хозяин", используемый в данном документе, относится к клетке, которая содержит вектор и которая поддерживает репликацию и/или экспрессию предполагаемого вектора экспрессии. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками, такими как *E. coli*, или эукариотическими клетками, такими как клетки дрожжей, насекомых, амфибий или млекопитающих, или клетками однодольных или двудольных растений. Примером клетки-хозяина, относящейся к однодольному растению, является клетка-хозяин маиса. Если возможно, последовательность модифицируют для того, чтобы избежать образования прогнозируемых шпилечных вторичных структур mRNA.

Кассеты экспрессии могут дополнительно содержать 5'-лидерные последовательности. Такие лидерные последовательности могут способствовать усилению трансляции. Лидерные последовательности трансляции известны в уровне техники и предусматривают лидерные последовательности пикорнавирусов, например лидерную последовательность EMCV (5'-некодирующий участок вируса энцефаломиокардита) (Elroy-Stein, et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6126-6130); лидерные последовательности потивирусов, например лидерную последовательность TEV (вируса гравировки табака) (Gallie, et al., (1995) Gene 165(2):233-238), лидерную последовательность MDMV (вируса карликовой мозаики маиса), последовательность белка, связывающего тяжелую цепь иммуноглобулина человека (BiP) (Macejak, et al., (1991) Nature 353:90-94); нетранслируемую лидерную последовательность из mRNA белка оболочки вируса мозаики люцерны (AMV RNA 4) (Jobling, et al., (1987) Nature 325:622-625); лидерную последовательность вируса табачной мозаики (TMV) (Gallie, et al., (1989) в Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256) и лидерную последовательность вируса хлорозной мозаики маиса (MCMV) (Lommel, et al., (1991) Virology 81:382-385). См. также Delia Cioppa et al. (1987) Plant Physiology 84:965-968. Такие конструкции могут также содержать "сигнальную последовательность" или "лидерную последовательность" для облегчения сопряженного с трансляцией или посттрансляционного транспорта пептида в определенные внутриклеточные структуры, такие как хлоропласт (или другая пластида), эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи.

"Сигнальная последовательность", используемая в данном документе, относится к последовательности, которая, как известно или как ожидается, приводит к сопряженному с трансляцией или посттрансляционному транспорту пептида через клеточную мембрану. У эукариот это обычно подразумевает секрецию в пузырьках аппарата Гольджи, при этом происходит гликолизирование до некоторой степени. Инсектицидные токсины бактерий зачастую синтезируются в виде протоксинов, которые активируются под действием протеолиза в кишечнике целевого вредителя (Chang, (1987) Methods Enzymol. 153:507-516). В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность расположена в нативной последовательности или может быть получена из последовательности согласно вариантам осуществления. "Лидерная последовательность", используемая в данном документе, относится к любой последовательности, которая при трансляции приводит к аминокислотной последовательности, способной запускать сопряженный с трансляцией транспорт пептидной цепи во внутриклеточную органеллу. Таким образом, это предусматривает лидерные последовательности, нацеливающие транспорт и/или гликозилирование посредством перехода в эндоплазматический ретикулум, перехода в вакуоли, пластиды, в том числе хлоропласты, митохондрии и т.п. Кодированные в ядре белки, нацеленные в компартмент полости тилакоида хлоропластов, имеют характерный двойной транзитный пептид, состоящий из сигнального пептида, нацеливающего на строму, и сигнального пептида, нацеливающего на полость. Информация для нацеливания на строму находится в ближайшей к амино-концу части транзитного пептида. Сигнальный пептид, нацеливающий на полость, находится в ближайшей к карбокси-концу части транзитного пептида и содержит всю информацию для нацеливания на полость. Последние исследования по протеомике хлоропластов высших растений добились успеха в идентификации многочисленных кодируемых в ядре белков полости (Kieselbach et al. FEBS LETT 480:271-276, 2000; Peltier et al. Plant Cell 12:319-341, 2000; Bricker et al. Biochim. Biophys Acta 1503:350-356, 2001), при этом их сигнальный пептид, нацеливающий на полость, можно потенциально применять в соответствии с настоящим раскрытием. О приблизительно 80 белках из *Arabidopsis*, а также гомологичных белках из шпината и гороха огородного сообщается в Kieselbach et al., Photosynthesis Research, 78:249-264, 2003. В частности, в табл. 2 данной публикации, которая включена в настоящее описание с помощью ссылки, раскрыто 85 белков из полости хлоропласта, идентифицированных по их номеру доступа (см. также публикацию заявки на выдачу патента США 2009/09044298). В дополнение, опубликованная недавно предварительная версия генома риса (Goff et al., Science 296:92-100, 2002) является подходящим источником для информации о сигнальном пептиде, нацеливающим на полость, который можно применять в соответствии с настоящим раскрытием.

Подходящие транзитные пептиды хлоропластов (СТР), хорошо известные специалисту в данной области, включают также химерные СТР, содержащие без ограничения N-терминальный домен, цен-

тральный домен или С-терминальный домен СТР из 1-дезоксид-Д-ксилоза-5-фосфатсинтазы *Oryza sativa*, супероксиддисмутаза *Oryza sativa*, синтазы растворимого крахмала *Oryza sativa*, NADP-зависимого фермента *Oryza sativa*, действующего на яблочную кислоту, фосфо-2-дегидро-3-дезоксигептонатаьдолазы 2 *Oryza sativa*, L-аскорбатпероксидазы 5 *Oryza sativa*, фосфоглюкан-вода-дикиназы *Oryza sativa*, ssRUBISCO *Zea Mays*, бета-глюкозидазы *Zea Mays*, малатдегидрогеназы *Zea Mays*, тиоредоксина М-типа *Zea Mays* (публикация заявки на выдачу патента США 2012/0304336). Транзитные пептиды хлоропластов из публикации заявки на выдачу патентов США US 20130205440 A1, US 20130205441 A1 и US 20130210114 A1.

Ген полипептида PIP-72, подлежащего нацеливанию в хлоропласт, можно оптимизировать для экспрессии в хлоропласте с учетом отличий по использованию кодонов между растительным ядром и этой органеллой. Таким образом, нуклеиновые кислоты, представляющие интерес, можно синтезировать с применением кодонов, предпочтительных для хлоропласта. См., например, патент США № 5380831, включенный в данный документ с помощью ссылки.

При получении кассеты экспрессии с различными фрагментами ДНК можно проводить манипуляции так, чтобы получить последовательности ДНК в надлежащей ориентации и, при необходимости, в надлежащей рамке считывания. С данной целью для соединения фрагментов ДНК можно использовать адаптеры или линкеры или можно задействовать другие манипуляции для обеспечения подходящих сайтов рестрикции, удаления избыточной ДНК, удаления сайтов рестрикции и т.п. С данной целью можно задействовать мутагенез *in vitro*, репарацию с помощью праймеров, рестрикцию, гибридизацию, повторные замены, например транзиции и трансверсии.

При практическом осуществлении вариантов осуществления можно применять ряд промоторов. Промоторы можно выбирать, исходя из необходимого результата. Нуклеиновые кислоты можно комбинировать с конститутивными, предпочтительными для ткани, индуцируемыми или другими промоторами для экспрессии в организме-хозяине. Промоторы по настоящему изобретению включают гомологи цис-элементов, которые, как известно, влияют на регуляцию генов, характеризующихся гомологией с промоторными последовательностями по настоящему изобретению. Эти цис-элементы включают без ограничения чувствительные к кислороду цис-элементы (Cowen et al., *J Biol. Chem.* 268 (36): 26904-26910 (1993)) элементы, регулируемые светом

(Bruce and Quail, *Plant Cell* 2 (11):1081-1089 (1990); Bruce et al., *EMBO J.* 10:3015-3024 (1991); Rocholl et al., *Plant Sci.* 97:189-198 (1994); Block et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:5387-5391 (1990); Giuliano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7089-7093 (1988); Staiger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6930-6934 (1989); Izawa et al., *Plant Cell* 6:1277-1287 (1994); Menkens et al., *Trends in Biochemistry* 20:506-510 (1995); Foster et al., *FASEB J.* 8:192-200 (1994); Plesse et al., *Mol Gen Gene* 254:258-266 (1997); Green et al., *EMBO J.* 6:2543-2549 (1987); Kuhlemeier et al., *Ann. Rev Plant Physiol.* 38:221-257 (1987); Villain et al., *J. Biol. Chem.* 271:32593-32598 (1996); Lam et al., *Plant Cell* 2:857-866 (1990); Gilmartin et al., *Plant Cell* 2:369-378 (1990); Datta et al., *Plant Cell* 1:1069-1077 (1989); Gilmartin et al., *Plant Cell* 2:369-378 (1990); Castresana et al., *EMBO J.* 7:1929-1936 (1988); Ueda et al., *Plant Cell* 1:217-227 (1989); Terzaghi et al., *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:445-474 (1995); Green et al., *EMBO J.* 6:2543-2549 (1987); Villain et al., *J. Biol. Chem.* 271:32593-32598 (1996); Tjaden et al., *Plant Cell* 6:107-118 (1994); Tjaden et al., *Plant Physiol.* 108:1109-1117 (1995); Ngai et al., *Plant J.* 12:1021-1234 (1997); Bruce et al., *EMBO J.* 10:3015-3024 (1991); Ngai et al., *Plant J.* 12:1021-1034 (1997)),

## элементы, чувствительные к гибберелину

(Muller et

al., J. Plant Physiol. 145:606-613 (1995); Croissant et al., Plant Science 116:27-35 (1996); Lohmer et al., EMBO J. 10:617-624 (1991); Rogers et al., Plant Cell 4:1443-1451 (1992); Lanahan et al., Plant Cell 4:203-211 (1992); Skriver et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7266-7270 (1991); Gilmartin et al., Plant Cell 2:369-378 (1990); Huang et al., Plant Mol. Biol. 14:655-668 (1990), Gubler et al., Plant Cell 7:1879-1891 (1995)),

## элементы, чувствительные к абсцизовой кислоте

(Busk et

al., Plant Cell 9:2261-2270 (1997); Gultinan et al., Science 250:267-270 (1990); Shen et al., Plant Cell 7:295-307 (1995); Shen et al., Plant Cell 8:1107-1119 (1996); Seo et al., Plant Mol. Biol. 27:1119-1131 (1995); Marcotte et al., Plant Cell 1:969-976 (1989); Shen et al., Plant Cell 7:295-307 (1995); Iwasaki et al., Mol Gen Genet 247:391-398 (1995); Hattori et al., Genes Dev. 6:609-618 (1992); Thomas et al., Plant Cell 5:1401-1410 (1993)),

элементы, сходные с элементами, чувствительными к абсцизовой кислоте (Ellerstrom et al., Plant Mol. Biol. 32:1019-1027 (1996)), элементы, чувствительные к ауксину (Liu et al., Plant Cell 6:645-657 (1994); Liu et al., Plant Physiol. 115:397-407 (1997); Kosugi et al., Plant J. 7:877-886 (1995); Kosugi et al., Plant Cell 9:1607-1619 (1997); Ballas et al., J. Mol. Biol. 233:580-596 (1993)), цис-элемент, чувствительный к обработке метилжасмонатом (Beaudoin and Rothstein, Plant Mol. Biol. 33:835-846 (1997)), цис-элемент, чувствительный к абсцизовой кислоте и стрессовой реакции (Straub et al., Plant Mol. Biol. 26:617-630 (1994)), цис-элементы, чувствительные к этилену (Itzhaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8925-8929 (1994); Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5939-5943 (1993); Sessa et al., Plant Mol. Biol. 28:145-153 (1995); Shinshi et al., Plant Mol. Biol. 27:923-932 (1995)), цис-элементы, чувствительные к салициловой кислоте (Strange et al., Plant J. 11:1315-1324 (1997); Qin et al., Plant Cell 6:863-874 (1994)), цис-элемент, который реагирует на водный стресс и абсцизовую кислоту (Lam et al., J. Biol. Chem. 266:17131-17135 (1991); Thomas et al., Plant Cell 5:1401-1410 (1993); Pla et al., Plant Mol Biol 21:259-266 (1993)), цис-элемент, необходимый для специфической для М-фазы экспрессии (Ito et al., Plant Cell 10:331-341 (1998)), элементы, чувствительные к сахарозе (Huang et al., Plant Mol. Biol. 14:655-668 (1990); Hwang et al., Plant Mol Biol 36:331-341 (1998); Grierson et al., Plant J. 5:815-826 (1994)), элементы, чувствительные к тепловому шоку (Pelham et al., Trends Genet. 1:31-35 (1985)), элементы, чувствительные к ауксину и/или салициловой кислоте и также, как описано, к регуляции светом (Lam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7890-7897 (1989); Benfey et al., Science 250:959-966 (1990)), элементы, чувствительные к этилену и салициловой кислоте (Ohme-Takagi et al., Plant Mol. Biol. 15:941-946 (1990)), элементы, чувствительные к ранению и абиотическому стрессу (Loake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9230-9234 (1992); Mhiri et al., Plant Mol. Biol. 33:257-266 (1997)), элементы, реагирующие на антиоксиданты (Rushmore et al., J. Biol. Chem. 266:11632-11639; Dalton et al., Nucleic Acids Res. 22:5016-5023 (1994)), Sph-элементы (Suzuki et al., Plant Cell 9:799-807 (1997)), элементы, чувствительные к элиситору (Fukuda et al., Plant Mol. Biol. 34:81-87 (1997); Rushton et al., EMBO J. 15:5690-5700 (1996)), элементы, чувствительные к металлам (Stuart et al., Nature 317:828-831 (1985); Westin et al., EMBO J. 7:3763-3770 (1988); Thiele et al., Nucleic Acids Res. 20:1183-1191 (1992); Faisst et al., Nucleic Acids Res. 20:3-26 (1992)), элементы, чувствительные к низким температурам (Baker et al., Plant Mol. Biol. 24:701-713 (1994); Jiang et al., Plant Mol. Biol. 30:679-684 (1996); Nordin et al., Plant Mol. Biol. 21:641-653 (1993); Zhou et al., J. Biol. Chem. 267:23515-23519 (1992)), элементы, чувствительные к засухе (Yamaguchi et al., Plant Cell 6:251-264 (1994); Wang et al., Plant Mol. Biol. 28:605-617 (1995); Bray EA, Trends in Plant Science 2:48-54 (1997)), энхансерные элементы для гена глютелина (Colot et al., EMBO J. 6:3559-3564 (1987); Thomas et al., Plant Cell 2:1171-1180 (1990); Kreis et al., Philos. Trans. R. Soc. Lond., B314:355-365 (1986)), регуляторные элементы, не зависящие от света (Lagrange et al., Plant Cell 9:1469-1479 (1997); Villain et al., J. Biol. Chem. 271:32593-32598 (1996)), энхансерные элементы гена OCS (Bouchez et al., EMBO J. 8:4197-4204 (1989); Foley et al., Plant J. 3:669-679 (1993)), ACGT-элементы (Foster et al., FASEB J. 8:192-200 (1994); Izawa et al., Plant Cell 6:1277-1287 (1994); Izawa et al., J. Mol. Biol. 230:1131-1144 (1993)), отрицательные цис-элементы в генах, связанных с пластидами (Zhou et al., J. Biol. Chem. 267:23515-23519 (1992); Lagrange et al., Mol. Cell Biol. 13:2614-2622

(1993); Lagrange et al., *Plant Cell* 9:1469-1479 (1997); Zhou et al., *J. Biol. Chem.* 267:23515-23519 (1992)), бокс-элементы проламина (Forde et al., *Nucleic Acids Res.* 13:7327-7339 (1985); Colot et al., *EMBO J.* 6:3559-3564 (1987); Thomas et al., *Plant Cell* 2:1171-1180 (1990); Thompson et al., *Plant Mol. Biol.* 15:755-764 (1990); Vicente et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7685-7690 (1997)), элементы в энхансерах из гена тяжелой цепи IgM (Gillies et al., *Cell* 33:717-728 (1983); Whittier et al., *Nucleic Acids Res.* 15:2515-2535 (1987)). Примеры промоторов включают описанные в патенте США № 6437217 (промотор RS81 маиса), патенте США № 5641876 (промотор актина риса), патенте США № 6426446 (промотор RS324 маиса), патенте США № 6429362 (промотор PR-1 маиса), патенте США № 6232526 (промотор А3 маиса), патенте США № 6177611 (конститутивные промоторы маиса), патентах США №№ 5322938, 5352605, 5359142 и 5530196 (промотор 35S), патенте США № 6433252 (промотор L3 олеозина маиса, P-Zm.L3), патенте США № 6429357 (промотор 2 актина риса, а также интрон 2 актина риса), патенте США № 5837848 (промотор, специфичный для корней), патенте США № 6294714 (индуцируемые светом промоторы), патенте США № 6140078 (индуцируемые солями промоторы), патенте США № 6252138 (индуцируемые патогенами промоторы), патенте США № 6175060 (индуцируемые недостаточностью фосфора промоторы), патенте США № 6635806 (промотор гена гамма-коиксина, P-γ.Gcx), публикации заявки на выдачу патента США № 09/757089 (промотор альдозазы хлоропластов маиса), и патенте США № 8772466 (фактор транскрипции маиса ядерный фактор В (NFB2)).

Подходящие конститутивные промоторы для применения в растительной клетке-хозяине включают, например, основной промотор промотора Rsyn7 и других конститутивных промоторов, раскрытых в WO 1999/43838 и патенте США № 6072050; основной промотор 35S CaMV (Odell, et al., (1985) *Nature* 313:810-812); промотор актина риса (McElroy, et al., (1990) *Plant Cell* 2:163-171); убиквитиновый промотор (Christensen, et al., (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:619-632 и Christensen, et al., (1992) *Plant Mol. Biol.* 18:675-689); pEMU (Last, et al., (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81:581-588); MAS (Velten, et al., (1984) *EMBO J.* 3:2723-2730); промотор ALS (патент США № 5659026) и т.п. Другие конститутивные промоторы включают, например, раскрытые в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611. Подходящие конститутивные промоторы также включают промоторы, которые характеризуются значительной экспрессией почти во всех тканях, однако характеризуются низкой экспрессией в пыльце, в том числе без ограничения промоторы вируса полосатости банана (*Acuminata Yunnan*) (BSV(AY)), раскрытые в патенте США US 8338662; промоторы вируса полосатости банана (*Acuminata Vietnam*) (BSV(AV)), раскрытые в патенте США US 8350121, и промоторы вируса полосатости банана (*Mysore*) (BSV(MYS)), раскрытые в патенте США US 8395022.

В зависимости от требуемого результата может быть полезно экспрессировать ген с помощью индуцируемого промотора. Особый интерес для регуляции экспрессии нуклеотидных последовательностей согласно вариантам осуществления у растений представляют собой индуцируемые ранением промоторы. Такие индуцируемые ранением промоторы могут реагировать на повреждение, вызванное питанием насекомым, и они включают промотор гена ингибитора протеиназы (pin II) картофеля (Ryan, (1990) *Ann. Rev. Phytopath.* 28:425-449; Duan, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:494-498); wun1 и wun2, патент США № 5428148; win1 и win2 (Stanford, et al., (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:200-208); система (McGurl, et al., (1992) *Science* 225:1570-1573); WIP1 (Rohmeier, et al., (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:783-792; Eckelkamp, et al., (1993) *FEBS Letters* 323:73-76); гена MPI (Corderok, et al., (1994) *Plant J.* 6 (2): 141-150) и т.п., включенные в данный документ с помощью ссылки.

Кроме того, в способах и нуклеотидных конструкциях согласно вариантам осуществления можно использовать индуцируемые патогеном промоторы. Такие индуцируемые патогеном промоторы включают промоторы из белков, связанных с патогенезом (PR-белков), которые индуцируются после заражения патогеном; например PR-белков, SAR-белков, бета-1,3-глюканазы, хитиназы и т.д. См., например, Redolfi, et al., (1983) *Neth. J. Plant Pathol.* 89:245-254; Uknes, et al., (1992) *Plant Cell* 4: 645-656 и Van Loon, (1985) *Plant Mol. Virol.* 4:111-116. См. также WO 1999/43819, включенную в данный документ с помощью ссылки.

Представляют интерес промоторы, которые экспрессируются локально в месте заражения патогеном или рядом с ним. См., например, Marineau, et al., (1987) *Plant Mol. Biol.* 9:335-342; Matton, et al., (1989) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-331; Somsisch, et al., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2427-2430; Somsisch, et al., (1988) *Mol. Gen. Genet.* 2:93-98 и Yang, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14972-14977. См. также Chen, et al., (1996) *Plant J.* 10:955-966; Zhang, et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2507-2511; Warner, et al., (1993) *Plant J.* 3:191-201; Siebertz, et al., (1989) *Plant Cell* 1:961-968; патент США № 5750386 (индуцируемый нематодами); а также источники, приведенные в данных документах. Особый интерес представляет индуцируемый промотор для гена PRms маиса, экспрессия которого индуцируется патогеном *Fusarium moniliforme* (см., например, Cordero, et al., (1992) *Physiol. Mol. Plant Path.* 41:189-200).

Регулируемые химическими веществами промоторы можно использовать для модулирования экспрессии гена в растении посредством применения экзогенного химического регулятора. В зависимости от цели промотор может представлять собой индуцируемый химическим веществом промотор, при этом применение химического вещества индуцирует экспрессию гена или репрессируемый химическим веще-

ством промотор, при этом применение химического вещества подавляет экспрессию гена. Индуцируемые химическими веществами промоторы известны в уровне техники и включают без ограничения промотор In2-2 маиса, который активируется антитодами к бензолсульфонамидным гербицидам, промотор GST маиса, который активируется гидрофобными электрофильными соединениями, которые применяются в качестве предвсходовых гербицидов, и промотор PR-1a табака, который активируется салициловой кислотой. Другие регулируемые химическими веществами промоторы, представляющие интерес, включают чувствительные к стероидам промоторы (см., например, индуцируемый глюкокортикоидом промотор в Schena, et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10421-10425 и McNellis, et al., (1998) Plant J. 14(2):247-257), а также индуцируемые тетрациклинами и репрессируемые тетрациклинами промоторы (см., например, Gatz, et al., (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237 и патенты США №№ 5814618 и 5789156), включенные в данный документ с помощью ссылки.

Для целенаправленного воздействия на повышенную экспрессию полипептида PIP-72 в конкретной ткани растения можно использовать предпочтительные в отношении ткани промоторы. Предпочтительные для ткани промоторы включают промоторы, обсуждаемые в Yamamoto, et al., (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata, et al., (1997) Plant Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen, et al., (1997) Mol. Gen. Genet. 254 (3):337-343; Russell, et al., (1997) Transgenic Res. 6 (2): 157-168; Rinehart, et al., (1996) Plant Physiol. 112 (3) : 1331-1341; Van Camp, et al., (1996) Plant Physiol. 112(2):525-535; Canevascini, et al., (1996) Plant Physiol. 112 (2) :513-524; Yamamoto, et al., (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Lam, (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:181-196; Orozco, et al., (1993) Plant Mol Biol. 23(6):1129-1138; Matsuoka, et al., (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90 (20):9586-9590 и Guevara-Garcia, et al., (1993) Plant J. 4(3):495-505. Такие промоторы можно модифицировать в случае необходимости для получения слабой экспрессии.

Промоторы, предпочтительные для листа, известны в уровне техники. См., например, Yamamoto, et al., (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kwon, et al., (1994) Plant Physiol. 105:357-67; Yamamoto, et al., (1994) Plant Cell Physiol. 35 (5) : 773-778; Gotor, et al., (1993) Plant J. 3:509-18; Orozco, et al., (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138 и Matsuoka, et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (20):9586-9590.

Известны промоторы, предпочтительные для корня, или промоторы, специфичные в отношении корня, и их можно выбирать из многих доступных из литературных источников или выделенных de novo из различных совместимых видов. См., например, Hire, et al., (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207-218 (специфичный в отношении корня сои ген глутаминсинтетазы); Keller and Baumgartner, (1991) Plant Cell 3 (10):1051-1061 (специфичный в отношении корня регуляторный элемент в гене GRP 1.8 фасоли); Sanger, et al., (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (специфичный в отношении корня промотор гена маннопинсинтазы (MAS) из *Agrobacterium tumefaciens*) и Miao, et al., (1991) Plant Cell 3(1):11-22 (кДНК-клон полной длины, кодирующий цитозольную глутаминсинтетазу (GS), которая экспрессируется в корнях и корневых клубеньках сои). См. также Bogusz, et al., (1990) Plant Cell 2(7):633-641, где описаны два промотора, специфичные в отношении корня, выделенные из генов гемоглобина от азотфиксирующего растения *Parasponia andersonii*, не относящегося к бобовым, и родственного растения *Trema tomentosa*, не относящегося к бобовым и не являющегося азотфиксирующим. Промоторы этих генов были связаны с репортерным геном  $\beta$ -глюкуронидазы и введены как в *Nicotiana tabacum*, не относящееся к бобовым, так и в бобовое растение *Lotus corniculatus*, и при этом в обоих случаях специфичная в отношении корней промоторная активность сохранялась. Leach и Aoyagi (1991) описывают свой анализ промоторов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии генов roIC и roID *Agrobacterium rhizogenes*, индуцирующих разрастание корней (см. Plant Science (Limerick) 79(1):69-76). Они пришли к выводу, что в этих промоторах энхансер и предпочтительные для ткани ДНК-детерминанты разделены. Teeri et al. (1989) применяли слияние гена с lacZ для того, чтобы показать, что ген из T-DNA *Agrobacterium*, кодирующий октопинсинтазу, является особенно активным в эпидермисе кончика корня и что ген TR2' является специфичным в отношении корня в интактном растении и стимулируется при ранении в ткани листа, что является особенно необходимой комбинацией характеристик для применения с инсектицидным или ларвицидным геном (см. EMBO J. 8 (2):343-350). Ген TR1', слитый с nptII (неомицинофосфотрансферазой II), продемонстрировал аналогичные характеристики. Дополнительные промоторы, предпочтительные для корня, включают промотор гена VfENOD-GRP3 (Kuster, et al., (1995) Plant Mol. Biol. 29(4):759-772) и промотор rolB (Carana, et al., (1994) Plant Mol. Biol. 25(4): 681-691. См. также, патенты США №№ 5837876; 5750386; 5633363; 5459252; 5401836; 5110732 и 5023179. Регуляторные последовательности, предпочтительные для корня, *Arabidopsis thaliana* раскрыты в патентной заявке US 20130117883. Промоторы RCc3, предпочтительные для корней сорго (*Sorghum bicolor*), раскрыты в заявке на выдачу патента США US 20120210463. Промоторы, предпочтительные для корней маиса, раскрыты в публикации заявки на выдачу патента США 20030131377, патентах США №№ 7645919 и 8735655. Промоторы, специфические по отношению к корневому чехлику 1 маиса (*ZmRCP1*), раскрыты в публикации заявки на выдачу патента США 20130025000. Промоторы, предпочтительные для корней маиса, раскрыты в публикации заявки на выдачу патента США 20130312136.

Промоторы, "предпочтительные для семени", включают как промоторы, "специфичные в отношении семени" (промоторы, которые активны во время развития семени, такие как промоторы запасных белков семени), так и промоторы "прорастания семени" (промоторы, которые активны во время прорас-

тания семени). См. Thompson, et al., (1989) *BioEssays* 10:108, включенную в данный документ с помощью ссылки. Такие промоторы, предпочтительные для семени, включают без ограничения *Cim1* (индуцируемый цитокинином транскрипт); *CZ19B1* (зеин маиса весом 19 кДа) и *milps* (мио-инозитол-1-фосфатсинтаза); (см. патент США № 6225529, включенный в данный документ с помощью ссылки). Гамма-зеин и *Glb-1* являются специфичными в отношении эндосперма промоторами. В случае двудольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промотор гена ингибитора трипсина Кунитца 3 (*KTi3*) (Jofuku and Goldberg, (1989) *Plant Cell* 1:1079-1093),  $\beta$ -фазеолина бобов, напина,  $\beta$ -конглицинина, глицинина 1, лектина сои, круциферина и т.п. В случае однодольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промоторы из генов зеина весом 15 кДа, зеина весом 22 кДа, зеина весом 27 кДа, g-зеина, *waxy*, *shrunk1*, *shrunk2*, глобулина 1 маиса и т.д. См. также WO 2000/12733, где раскрыты промоторы, предпочтительные для семени, из генов *end1* и *end2*, включенную в данный документ с помощью ссылки. У двудольных растений промоторы, специфичные в отношении семени, включают без ограничения промотор гена белков семенной оболочки из *Arabidopsis*, *pBAN*; а также промоторы генов раннего развития семян из *Arabidopsis*, *p26*, *p63* и *p63tr* (патенты США №№ 7294760 и 7847153). Промотор, который характеризуется "предпочтительной" экспрессией в конкретной ткани, экспрессируется в такой ткани в большей степени, чем по меньшей мере в одной другой растительной ткани. Для некоторых предпочтительных для ткани промоторов показана экспрессия почти исключительно в конкретной ткани.

Если требуется низкий уровень экспрессии, то будут применять слабые промоторы. Как правило, используемый в данном документе термин "слабый промотор" относится к промотору, который управляет экспрессией кодирующей последовательности на низком уровне. Под низким уровнем экспрессии подразумевают уровни от приблизительно 1/1000 транскриптов до приблизительно 1/100000 транскриптов, до приблизительно 1/500000 транскриптов. В качестве альтернативы понятно, что термин "слабые промоторы" также охватывает промоторы, которые управляют экспрессией только в небольшом количестве клеток и не управляют в других, при этом обеспечивается общий низкий уровень экспрессии. Если промотор управляет экспрессией на неприемлемо высоких уровнях, то части промоторной последовательности можно удалить или модифицировать для снижения уровней экспрессии.

Такие слабые конститутивные промоторы включают, например, основной промотор промотора *Rsyn7* (WO 1999/43838 и патент США № 6072050), основной промотор 35S *CaMV* и т.п. Другие конститутивные промоторы включают, например, раскрытые в патентах США №№ 5608149; 5608144; 5604121; 5569597; 5466785; 5399680; 5268463; 5608142 и 6177611, включенных в данный документ с помощью ссылки.

Приведенный выше перечень промоторов не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой подходящий промотор.

Как правило, кассета экспрессии будет содержать селективируемый маркерный ген для отбора трансформированных клеток. Селективируемые маркерные гены используют для отбора трансформированных клеток или тканей. Маркерные гены включают гены, кодирующие устойчивость к антибиотику, такие как гены, кодирующие неомицинфосфотрансферазу II (NEO) и гигромицинфосфотрансферазу (HPT), а также гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидным соединениям, таким как глюфосинат аммония, бромоксинил, имидазолины и 2,4-дихлорфеноксиацетат (2,4-D). Дополнительные примеры подходящих селективируемых маркерных генов включают без ограничения гены, кодирующие устойчивость к хлорамфениколу (Herrera Estrella, et al., (1983) *EMBO J.* 2:987-992); метотрексату (Herrera Estrella, et al., (1983) *Nature* 303:209-213 и Meijer, et al., (1991) *Plant Mol. Biol.* 16:807-820); стрептомицину (Jones, et al., (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210:86-91); спектиномицину (Bretagne-Sagnard, et al., (1996) *Transgenic Res.* 5:131-137); блеомицину (Hille, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 7:171-176); сульфонамиду (Guerineau, et al., (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:127-136); бромоксинилу (Stalker, et al., (1988) *Science* 242:419-423); глифосату (Shaw, et al., (1986) *Science* 233:478-481 и заявки на выдачу патентов США с серийными №№ 10/004357 и 10/427692); фосфинотрицину (DeBlock, et al., (1987) *EMBO J.* 6:2513-2518). См. в целом Yarranton, (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3:506-511; Christopherson, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6314-6318; Yao, et al., (1992) *Cell* 71:63-72; Reznikoff, (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2419-2422; Barkley, et al., (1980) в *The Operon*, pp. 177-220; Hu, et al., (1987) *Cell* 48:555-566; Brown, et al., (1987) *Cell* 49:603-612; Figge, et al., (1988) *Cell* 52:713-722; Deuschle, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5400-5404; Fuerst, et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2549-2553; Deuschle, et al., (1990) *Science* 248:480-483; Gossen, (1993) диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Гейдельбергский университет; Reines, et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:1917-1921; Labow, et al., (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-3356; Zambretti, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3952-3956; Baim, et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5072-5076; Wyborski, et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4647-4653; Hillenand-Wissman, (1989) *Topics Mol. Struc. Biol.* 10:143-162; Degenkolb, et al., (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:1591-1595; Kleinschmidt, et al., (1988) *Biochemistry* 27:1094-1104; Bonin, (1993) диссертация на соискание ученой степени кандидата наук, Гейдельбергский университет; Gossen, et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551; Oliva, et al., (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:913-919; Hlavka, et al., (1985) *Handbook of Experimental Phar-*

macology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlin) и Gill, et al., (1988) Nature 334:721-724. Такие раскрытия включены в данный документ с помощью ссылки.

Приведенный выше перечень селективируемых маркерных генов не предназначен для ограничения. В вариантах осуществления можно применять любой селективируемый маркерный ген.

#### Трансформация растений

Способы согласно вариантам осуществления включают введение полипептида или полинуклеотида в растение. "Введение", используемое в данном документе, означает включение в растение полинуклеотида или полипептида таким образом, что последовательность попадает внутрь клетки растения. Способы согласно вариантам осуществления не зависят от конкретного способа введения полинуклеотида или полипептида в растение, нужно лишь, чтобы полинуклеотид или полипептиды проникали внутрь по меньшей мере одной клетки растения. В уровне техники известны способы введения полинуклеотида или полипептидов в растения, в том числе без ограничений способы стабильной трансформации, способы транзиентной трансформации и способы трансформации, опосредованной вирусами.

"Стабильная трансформация", используемая в данном документе, означает, что нуклеотидная конструкция, введенная в растение, интегрируется в геном растения и может наследоваться его потомством. "Транзиентная трансформация", используемая в данном документе, означает, что полинуклеотид вводят в растение и он не интегрируется в геном растения, или в растение вводят полипептид. "Растение", используемое в данном документе, относится к целым растениям, органам растения (например, листьям, стеблям, корням и т.д.), семенам, растительным клеткам, частям растения для вегетативного размножения, зародышам и их потомству. Растительные клетки могут быть дифференцированными или недифференцированными (например, клетками каллуса, клетками суспензионных культур, протопластами, клетками листьев, клетками корней, клетками флоэмы и пыльцой).

Протоколы трансформации, а также протоколы для введения нуклеотидных последовательностей в растения могут изменяться в зависимости от типа растения или растительной клетки, т.е. класса однодольных или двудольных, на которые нацелена трансформация. Подходящие способы введения нуклеотидных последовательностей в растительные клетки и последующая вставка в геном растения включают микроинъекцию (Crossway, et al., (1986) Biotechniques 4:320-334), электропорацию (Riggs, et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606), трансформацию, опосредованную *Agrobacterium* (патенты США №№ 5563055 и 5981840), прямой перенос генов (Paszowski, et al., (1984) EMBO J. 3:2717-2722) и баллистическое ускорение частиц (см., например, патенты США №№ 4945050; 5879918; 5886244 и 5932782; Tomes, et al., (1995) в Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips, (Springer-Verlag, Berlin) и McCabe, et al., (1988) Biotechnology 6:923-926) и трансформацию гена *Lecl* (WO 00/28058). Относительно трансформации картофеля см. Tu, et al., (1998) Plant Molecular Biology 37:829-838 и Chong, et al., (2000) Transgenic Research 9:71-78.

Дополнительные процедуры трансформации можно найти в Weissinger, et al., (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477; Sanford, et al., (1987) Particulate Science and Technology 5:27-37 (лук репчатый); Christou, et al., (1988) Plant Physiol. 87:671-674 (соя); McCabe, et al., (1988) Bio/Technology 6:923-926 (соя); Finer and McMullen, (1991) In Vitro Cell Dev. Biol. 27P:175-182 (соя); Singh, et al., (1998) Theor. Appl. Genet. 96:319-324 (соя); Datta, et al., (1990) Biotechnology 8:736-740 (рис); Klein, et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4305-4309 (маис); Klein, et al., (1988) Biotechnology 6:559-563 (маис); патенты США №№ 5240855; 5322783 и 5324646; Klein, et al., (1988) Plant Physiol. 91:440-444 (маис); Fromm, et al., (1990) Biotechnology 8:833-839 (маис); Hooykaas-Van Slogteren, et al., (1984) Nature (London) 311:763-764; патент США № 5736369 (злаки); Bytebier, et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5345-5349 (Liliaceae); De Wet, et al., (1985) в The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman, et al., (Longman, New York), pp. 197-209 (пыльца); Kaeppler, et al., (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 и Kaeppler, et al., (1992) Theor. Appl. Genet. 84:560-566 (трансформация, опосредованная прокалыванием клеток путем встряхивания их в суспензии микроигл); D'Halluin, et al., (1992) Plant Cell 4:1495-1505 (электропорация); Li, et al., (1993) Plant Cell Reports 12:250-255 и Christou and Ford, (1995) Annals of Botany 75:407-413 (рис); Osjoda, et al., (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (маис при участии *Agrobacterium tumefaciens*), все из которых включены в данный документ с помощью ссылки.

В конкретных вариантах осуществления последовательности согласно вариантам осуществления можно вводить в растение с применением ряда способов транзиентной трансформации. Такие способы транзиентной трансформации включают без ограничения введение полипептида PIP-72 или его вариантов и фрагментов и полинуклеотида, кодирующего элемент сайленсинга, непосредственно в растение или введение в растение транскрипта полипептида PIP-72 и элемента сайленсинга. Такие способы включают, например, микроинъекцию или бомбардировку частицами. См., например, Crossway, et al., (1986) Mol. Gen. Genet. 202:179-185; Nomura, et al., (1986) Plant Sci. 44:53-58; Hepler, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:2176-2180 и Hush, et al., (1994) The Journal of Cell Science 107:775-784, все из которых включены в данный документ с помощью ссылки. В качестве альтернативы растению можно транзиентно трансформировать с помощью полинуклеотида для полипептида PIP-72 с применением методик, известных из уровня техники. Такие методики включают применение вирусной векторной системы и осаждение полинуклеотида таким способом, который исключает последующее высвобождение ДНК. Таким

образом, может происходить транскрипция ДНК, связанной с частицами, однако частота, с которой она высвобождается для интеграции в геном, в значительной степени снижена. Такие способы включают применение частиц, покрытых полиэтиленгликолем (PEI; № по кат. Sigma P3143).

В уровне техники известны способы нацеленной вставки полинуклеотида в конкретное местоположение в геноме растения. В одном варианте осуществления вставку полинуклеотида в требуемое местоположение в геноме выполняют с использованием системы сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853, все из которых включены в данный документ с помощью ссылки. Вкратце, полинуклеотид согласно вариантам осуществления может содержаться в кассете для переноса, фланкированной двумя неидентичными сайтами рекомбинации. Кассету для переноса вводят в растение, имеющее в своем геноме стабильно встроенный целевой сайт, который фланкирован двумя неидентичными сайтами рекомбинации, которые соответствуют сайтам кассеты для переноса. Обеспечивают подходящую рекомбиназу, и кассета для переноса интегрируется в целевой сайт. Полинуклеотид, представляющий интерес, таким образом, интегрируется в конкретное хромосомное положение в геноме растения.

Векторы для трансформации растений могут состоять из одного или нескольких ДНК-векторов, необходимых для достижения трансформации растения. Например, общепринятой практикой в области техники является использование векторов для трансформации растений, которые состоят из более одного смежного сегмента ДНК. В уровне техники эти векторы зачастую называют "бинарными векторами". Бинарные векторы, а также векторы с плазмидами-помощниками наиболее часто применяются при трансформации, опосредованной *Agrobacterium*, при этом размер и сложность сегментов ДНК, необходимых для достижения эффективной трансформации, являются очень большими, и предпочтительным является разделение функций на отдельных молекулах ДНК. Бинарные векторы обычно содержат плазмидный вектор, который содержит действующие в *cis*-положении последовательности, требуемые для переноса T-DNA (как, например, левой границы и правой границы), селективируемый маркер, который разрабатывают таким образом, что он способен экспрессироваться в растительной клетке, и "ген, представляющий интерес" (ген, разработанный таким образом, что он способен экспрессироваться в растительной клетке, из которой требуется получить трансгенные растения). Также в этом плазмидном векторе присутствуют последовательности, требуемые для репликации в бактериях. Действующие в *cis*-положении последовательности расположены так, чтобы обеспечить возможность эффективного переноса в растительные клетки и экспрессии в них. Например, селективируемый маркерный ген и пестицидный ген расположены между левой и правой границами. Часто второй плазмидный вектор содержит действующие в *trans*-положении факторы, которые опосредуют перенос T-DNA из *Agrobacterium* в растительные клетки. Эта плазида часто содержит функции вирулентности (гены *Vir*), что обеспечивает возможность заражения растительных клеток *Agrobacterium* и перенос ДНК путем расщепления по граничным последовательностям и переноса ДНК, опосредованного *vir*, как понятно из уровня техники (Hellens and Mullineaux, (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Для трансформации растений можно применять несколько типов штаммов *Agrobacterium* (например, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105 и т.п.). Второй плазмидный вектор не является необходимым для трансформации растений другими способами, такими как бомбардировка микрочастицами, микроинъекция, электропорация, с помощью полиэтиленгликоля и т.д.

В целом способы трансформации растений включают перенос гетерологичной ДНК в целевые растительные клетки (например, незрелые или зрелые зародыши, суспензионные культуры, недифференцированный каллус, протопласты и т.д.), с последующим применением соответствующего отбора с максимальным пороговым значением (в зависимости от селективируемого маркерного гена) для выделения трансформированных растительных клеток из группы нетрансформированной клеточной массы. После интеграции гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки затем применяют соответствующий отбор с максимальным пороговым значением в среде для уничтожения нетрансформированных клеток и отделения и размножения предположительно трансформированных клеток, которые переживают эту обработку с отбором, посредством регулярного переноса на свежую среду. С помощью продолжающегося пассирования и проверки с помощью соответствующего отбора идентифицируют и размножают клетки, которые трансформированы плазмидным вектором. Затем можно применять молекулярные и биохимические способы для подтверждения присутствия интегрированного гетерологичного гена, представляющего интерес, в геноме трансгенного растения.

Как правило, эксплантаты переносят на свежую порцию той же среды и культивируют обычным способом. Впоследствии трансформированные клетки дифференцируются в побеги после помещения в среду для регенерации, дополненную средством отбора с максимальным пороговым значением. Затем побеги переносят на селективную среду для выращивания растений с получением укоренившихся побегов или саженцев. Затем трансгенный саженец выращивают до зрелого растения и получают фертильные семена (например, Hiei, et al., (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida, et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Как правило, эксплантаты переносят на свежую порцию той же среды и культивируют обычным способом. Общее описание методик и способов для получения трансгенных растений приведены в Ayres and Park, (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 и Bommineni and Jauhar, (1997)

Maydica 42:107-120. Поскольку трансформированный материал содержит множество клеток, то как трансформированные, так и нетрансформированные клетки присутствуют в любой части подвергнутого воздействию целевого каллуса, или ткани, или группы клеток. Возможность уничтожать нетрансформированные клетки и обеспечивать размножение трансформированных клеток приводит в результате к трансформированным растительным культурам. Зачастую возможность удаления нетрансформированных клеток является ограничивающим фактором для быстрого получения трансформированных растительных клеток и успешного выращивания трансгенных растений.

Из клеток, которые были трансформированы, можно вырастить растения в соответствии с традиционными способами. См., например, McCormick, et al., (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. Эти растения затем можно выращивать и опылять либо с использованием такой же трансформированной линии, либо других линий, и получать гибрид с конститутивной или индуцируемой экспрессией требуемого идентифицированного фенотипического свойства. Можно вырастить два или более поколений для того, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемого фенотипического свойства стабильно поддерживается и наследуется, а затем собрать семена, чтобы убедиться в том, что экспрессия требуемого фенотипического свойства была достигнута.

Нуклеотидные последовательности согласно вариантам осуществления можно обеспечить в растении путем приведения растения в контакт с вирусом или вирусными нуклеиновыми кислотами. Как правило, такие способы включают встраивание нуклеотидной конструкции, представляющей интерес, в вирусную молекулу ДНК или РНК. Понятно, что рекомбинантные белки согласно вариантам осуществления можно первоначально синтезировать как часть вирусного полипротеина, который позже может быть процессирован путем протеолиза *in vivo* или *in vitro* с получением требуемого полипептида РР-72. Также понятно, что такой вирусный полипротеин, содержащий по меньшей мере часть аминокислотной последовательности полипептида РР-72 согласно вариантам осуществления, может обладать требуемой пестицидной активностью. Такие вирусные полипротеины и нуклеотидные последовательности, которые их кодируют, охвачены вариантами осуществления. Способы получения растений с нуклеотидными конструкциями и продукции кодируемых белков в растениях, которые включают вирусные молекулы ДНК или РНК, известны в уровне техники. См., например, патенты США №№ 5889191; 5889190; 5866785; 5589367 и 5316931; включенные в данный документ с помощью ссылки.

Способы трансформации хлоропластов известны в уровне техники. См., например, Svab, et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab and Maliga, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab and Maliga, (1993) EMBO J. 12:601-606. Способ основан на доставке генной пушкой ДНК, содержащей селективируемый маркер, и нацеливании ДНК в геном пластид с помощью гомологичной рекомбинации. Кроме того, трансформацию пластид можно осуществлять трансактивацией молчащего трангена, находящегося в пластидах, путем экспрессии, предпочтительной для определенной ткани, РНК-полимеразы, кодируемой ядерным геномом и функционирующей в пластиде. О такой системе сообщали в McBride, et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Варианты осуществления дополнительно относятся к материалу для размножения трансформированного растения согласно вариантам осуществления, в том числе без ограничения семенам, клубням, клубнелуковицам, луковичам, листьям и черенкам корней и побегов.

Варианты осуществления можно использовать для трансформации любых видов растений, в том числе без ограничения однодольных и двудольных. Примеры растений, представляющих интерес, включают без ограничения кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. tara*, *B. juncea*), в частности виды *Brassica*, пригодные в качестве источников масла из семян растений, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, пennisетум рогозовидный (*Pennisetum glaucum*), просо культурное (*Panicum miliaceum*), щетинник итальянский (*Setaria italica*), просо пальчатое (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*), пшеницу (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель (*Solanum tuberosum*), разновидности арахиса (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофейное дерево (*Coffea* spp.), кокосовую пальму (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (*Citrus* spp.), шоколадное дерево (*Theobroma cacao*), чайное растение (*Camellia sinensis*), банан (*Musa* spp.), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуаву (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*), маслину (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), кешью (*Anacardium occidentale*), макадамию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), разновидности сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (*Saccharum* spp.), разновидности овса, ячмень, овощи, декоративные растения и хвойные деревья.

Овощи включают разновидности томата (*Lycopersicon esculentum*), салат-латук (например, *Lactuca sativa*), разновидности зеленой фасоли (*Phaseolus vulgaris*), разновидности лимской фасоли (*Phaseolus limensis*), разновидности гороха (*Lathyrus* spp.) и предшественной рода *Cucumis*, таких как огурец (*C. sativus*), канталупа (*C. cantalupensis*) и дыня мускусная (*C. melo*).

Декоративные растения включают азалию (*Rhododendron* spp.), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), разновидности розы (*Rosa* spp.), разновидности тюльпана (*Tulipa* spp.), разновидности нарцисса (*Narcissus* spp.), разновидности петунии (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus*

сaryophyllus), пуансеттию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные, которые можно использовать при практическом осуществлении вариантов осуществления, включают, например, разновидности сосны, такие как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна желтая (*Pinus ponderosa*), сосна скрученная широкохвойная (*Pinus contorta*) и сосна лучистая (*Pinus radiata*); псевдотсугу Мензиса (*Pseudotsuga menziesii*); тсугу канадскую (*Tsuga canadensis*); ель сизую (*Picea glauca*); секвойю (*Sequoia sempervirens*); разновидности настоящей пихты, такие как пихта миловидная (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); а также разновидности туйи, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и кипарисовик нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения согласно вариантам осуществления включают культурные растения (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, *Brassica*, сою, хлопчатник, сафлор, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак и т.д.), такие как растения кукурузы и сои.

Разновидности газонной травы включают без ограничения: мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс однолетний (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяницу красную Чуинга (*Festuca rubra*); полевицу тонкую (*Agrostis tenuis*); полевицу болотную (*Agrostis palustris*); житняк пустынный (*Agropyron desertorum*); житняк гребенчатый (*Agropyron cristatum*); овсяницу длиннолистную (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежу сборную (*Dactylis glomerata*); плевел многолетний (*Lolium perenne*); овсяницу красную (*Festuca rubra*); полевицу белую (*Agrostis alba*); мятлик обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяницу овечью (*Festuca ovina*); костер безостый (*Bromus inermis*); овсяницу тростниковую (*Festuca arundinacea*); тимофеевку луговую (*Phleum pratense*); полевицу собачью (*Agrostis canina*); бескильницу расставленную (*Puccinellia distans*); пырей Смита (*Agropyron smithii*); свиной палец (*Cynodon spp.*); узкобороздник однобокий (*Stenotaphrum secundatum*); зойсию (*Zoysia spp.*); гречку заметную (*Paspalum notatum*); аксонопс афинский (*Axonopus affinis*); эремохлою змеихвостую (*Eremochloa ophiuroides*); кикуйю (*Pennisetum clandestinum*); паспалум влагалищный (*Paspalum vaginatum*); бутелую изящную (*Bouteloua gracilis*); бизонову траву (*Buchloe dactyloids*); боковой овес (*Bouteloua curtipendula*).

Растения, представляющие интерес, включают зерновые растения, которые дают семена, представляющие интерес, масличные растения и бобовые растения. Семена, представляющие интерес, включают семена зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и т.д. Масличные растения включают хлопчатник, сою, сафлор, подсолнечник, *Brassica*, кукурузу, пшеницу, пальму, кокосовую пальму, лен, клещевину, маслину и т.д. Бобовые растения включают разновидности бобов и разновидности гороха. Бобы включают гуар, рожковое дерево, пажитник, сою, разновидности обыкновенной фасоли, вигну китайскую, золотистую фасоль, лимскую фасоль, стручковую фасоль, разновидности чечевицы, турецкий горох и т.д.

#### Оценка трансформации растений

После введения гетерологичной чужеродной ДНК в растительные клетки трансформацию или интеграцию гетерологичного гена в геном растения подтверждают с помощью различных способов, таких как анализ нуклеиновых кислот, белков и метаболитов, связанных с интегрированным геном.

ПЦР-анализ представляет собой быстрый способ скрининга трансформированных клеток, ткани или побегов в отношении присутствия встроеного гена на ранней стадии перед высаживанием в почву (Sambrook and Russell, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). ПЦР проводят с применением олигонуклеотидных праймеров, специфичных в отношении гена, представляющего интерес, или исходных последовательностей вектора на основе *Agrobacterium* и т.д.

Трансформацию растений можно подтвердить с помощью Саузерн-блот анализа геномной ДНК (Sambrook and Russell, (2001) выше). В целом общую ДНК экстрагируют из трансформанта, нарезают соответствующими ферментами рестрикции, фракционируют в агарозном геле и переносят на нитроцеллюлозную или найлоновую мембрану. Затем мембрану или "блот" анализируют с помощью зонда, например целевого фрагмента ДНК с радиоактивной меткой <sup>32</sup>P, с целью подтверждения интеграции внедренного гена в геном растения в соответствии со стандартными методиками (Sambrook и Russell, (2001) выше).

При нозерн-блот анализе РНК выделяют из специфичных тканей трансформанта, фракционируют в агарозном геле, содержащем формальдегид, и переносят на найлоновый фильтр в соответствии со стандартными процедурами, которые обычно применяют в области техники (Sambrook и Russell, (2001) выше). Затем экспрессию РНК, кодируемой пестицидным геном, тестировали с помощью гибридизации фильтра с радиоактивным зондом, полученным из пестицидного гена, посредством способов, известных в уровне техники (Sambrook и Russell, (2001) выше).

Вестерн-блот, биохимические анализы и подобные можно проводить в отношении трансгенных растений для подтверждения присутствия белка, кодируемого пестицидным геном, при помощи стандартных процедур (Sambrook и Russell, 2001, выше) с применением антител, которые связываются с одним или несколькими эпитопами, присутствующими на полипептиде PIP-72.

Пакетирование признаков PIP-72 и элементов сайленсинга в трансгенном растении

Трансгенные растения могут содержать пакет из одного или нескольких инсектицидных полинуклеотидов, раскрытых в данном документе, с одним или несколькими дополнительными полинуклеотидами, что приводит к продуцированию или супрессии нескольких инсектицидных полипептидных по-

следовательностей. Трансгенные растения, содержащие пакеты из последовательностей полинуклеотидов, можно получить либо с помощью традиционных способов скрещивания, либо посредством способов генной инженерии, либо применяя и то и другое. Данные способы включают без ограничения скрещивание отдельных линий, при этом каждая содержит полинуклеотид, представляющий интерес, трансформацию трансгенного растения, содержащего раскрытые в данном документе ген или элемент сайленсинга, дополнительным геном или элементом сайленсинга и котрансформацию генов и/или элементов сайленсинга в одну растительную клетку. Термин "пакетированный", используемый в данном документе, предусматривает состояние, при котором в одном растении присутствуют несколько признаков (т.е. оба признака включены в ядерный геном, один признак включен в ядерный геном и один признак включен в геном пластиды или оба признака включены в геном пластиды). В одном неограничивающем примере "пакетированные признаки" предусматривают молекулярный пакет, в котором последовательности физически граничат друг с другом. "Признак", используемый в данном документе, относится к фенотипу, обусловленному конкретной последовательностью или группами последовательностей. Котрансформацию генов можно проводить с применением единых векторов для трансформации, содержащих несколько генов или нескольких векторов, которые несут отдельные гены. Если последовательности пакетированы с помощью генетической трансформации растений, то представляющие интерес полинуклеотидные последовательности можно комбинировать в любое время и в любом порядке. Признаки можно вводить одновременно в протоколе котрансформации с представляющими интерес полинуклеотидами, представленными любой комбинацией кассет для трансформации. Например, если будут вводиться две последовательности, то эти две последовательности могут содержаться в отдельных кассетах для трансформации (транс) или содержаться в одной кассете для трансформации (цис). Экспрессия этих последовательностей может управляться одним и тем же промотором или различными промоторами. В определенных случаях может потребоваться введение кассеты для трансформации, которая будет супрессировать экспрессию представляющего интерес полинуклеотида. Ее можно комбинировать с любой комбинацией других кассет супрессии или кассет сверхэкспрессии для получения требуемой комбинации признаков в растении. Кроме того, считается, что полинуклеотидные последовательности можно пакетировать в требуемом местоположении в геноме с применением системы для сайт-специфичной рекомбинации. См., например, WO 1999/25821, WO 1999/25854, WO 1999/25840, WO 1999/25855 и WO 1999/25853, все из которых включены в данный документ с помощью ссылки.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько полинуклеотидов, кодирующих полипептиды полипептидов PIP-72 или их фрагментов или вариантов, могут быть пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими один или несколько полипептидов, характеризующихся инсектицидной активностью или агрономическими признаками, изложенными выше, и необязательно могут дополнительно предусматривать один или несколько полинуклеотидов, предусмотренных для сайленсинга генов одного или нескольких целевых полинуклеотидов, которые обсуждаются ниже.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие один или несколько раскрытых в данном документе полипептидов PIP-72, пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими пестицидные белки, раскрытые в данном документе.

В одном варианте осуществления полинуклеотиды, кодирующие один или несколько раскрытых в данном документе полипептидов PIP-72, пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими полипептиды PIP-47 согласно WO 2015/023846, которая включена с помощью ссылки во всей своей полноте.

#### Сайленсинг генов

В некоторых вариантах осуществления пакетированный признак может быть в форме, применяемой для сайленсинга одного или нескольких полинуклеотидов, представляющих интерес, что приводит к супрессии одного или нескольких целевых полипептидов вредителя. В некоторых вариантах осуществления сайленсинг достигается благодаря применению элемента сайленсинга.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, пакетированы с одним или несколькими элементами сайленсинга, характеризующимися инсектицидной активностью.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RyanR (SEQ ID NO: 992), HP2 (SEQ ID NO: 994) или RPS10 (SEQ ID NO: 995). В одном варианте осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, пакетированы с полинуклеотидами, кодирующими элемент сайленсинга, раскрытый в публикациях заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 или US 2015/0257389. В одном варианте осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, пакетированы с полинуклеотидами, кодирующими элемент сайленсинга, содержащий любую из SEQ ID NO: 982-991, 993 или SEQ ID NO: 561-572 из публикаций заявок на выдачу патентов США №№ US 2014/0275208 и US 2015/0257389.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, и полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе элементы

сайленсинга, пакетированы с одним или несколькими дополнительными признаками устойчивости к насекомым.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе полипептиды PIP-72, и полинуклеотиды, кодирующие раскрытые в данном документе элементы сайленсинга, подлежащие пакетированию с одним или несколькими дополнительными признаками устойчивости к насекомым, можно пакетировать с одним или несколькими дополнительными признаками, проявляющимися в растении (например, устойчивость к гербициду, устойчивость к грибкам, устойчивость к вирусам, переносимость стрессов, устойчивость к заболеваниям, мужская стерильность, сила стебля и т.п.), или признаками, проявляющимися в урожае (например, повышенная урожайность, модифицированные разновидности крахмала, улучшенный профиль масел, сбалансированное содержанием аминокислот, высокое содержание лизина или метионина, повышенная усвояемость, улучшенное качество волокон, устойчивость к засухе и т.п.). Таким образом, варианты осуществления полинуклеотида можно применять для обеспечения полного комплекса агрономических признаков, обеспечивающих улучшенное качество сельскохозяйственной культуры, с возможностью гибкого и экономически эффективного контроля любого количества сельскохозяйственных вредителей.

Некоторые варианты осуществления относятся к понижающей регуляции экспрессии целевых генов у видов насекомых-вредителей с помощью интерферирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК).

Элементы сайленсинга, которые могут быть пакетированы с одним или несколькими полинуклеотидами PIP-72, включают в себя следующее: элементы сайленсинга Н-субъединицы вакуолярной АТФазы (публикация заявки на выдачу патента США 2012/0198586), рибосомального белка насекомых, такого как рибосомальный белок L19 (публикация согласно РСТ 2012/0198586), рибосомальный белок L40 или рибосомальный белок S27A; субъединицу протеасомы насекомого, такую как белок Rpn6, Pros 25, белок Rpn2, белок бета 1 субъединицы протеасомы или белок бета 2 Pros;  $\beta$ -коатомера СОР1-везикулы насекомого,  $\gamma$ -коатомера СОР1-везикулы,  $\beta'$ -коатомерного белка или  $\zeta$ -коатомера СОР1-везикулы; белка тетраспанина 2А насекомого, который представляет собой предполагаемый белок трансмембранного домена; белка насекомого, принадлежащего к семейству актина, такого как актин 5С; белка убиквитина-5Е насекомого; белка Sec23 насекомого, который представляет собой активатор ГТФазы, вовлеченной во внутриклеточный транспорт белков; белка "crinkled" насекомого, который представляет собой нестандартный миозин, который вовлечен в двигательную активность; белка "crooked neck" насекомого, который вовлечен в регуляцию ядерного альтернативного сплайсинга mRNA; белка G-субъединицы вакуолярной Н-АТФазы насекомого и Tbp-1 насекомого, такого как Tat-связывающий белок. В публикации согласно РСТ WO 2007/035650 описаны элементы сайленсинга, направленные на Snf7; в публикации заявки на выдачу патента США 2011/0054007 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RPS10; в публикации заявки на выдачу патента США US 2015/0257389 описаны полинуклеотидные элементы сайленсинга, целенаправленно воздействующие на RyanR и PAT3; в публикации заявки на выдачу патента США 2012/0164205 описаны элементы сайленсинга, направленные на гомологичную последовательность Chd3, гомологичную последовательность бета-тубулина, гомологичную последовательность весом 40 кДа V-АТФазы, гомологичную последовательность EFloc, гомологичную последовательность субъединицы p28 протеасомы 26S, гомологичную последовательность эпоксидгидролазы ювенильного гормона, гомологичную последовательность белка хлоридных каналов, зависящих от набухания, гомологичную последовательность белка глюкоза-6-фосфат-1-дегидрогеназы, гомологичную последовательность белка Act42A, гомологичную последовательность фактора 1 АДФ-рибозилирования, гомологичную последовательность белка фактора транскрипции ПВ, гомологичные последовательности хитиназы, гомологичную последовательность фермента, конъюгирующего убиквитин, гомологичную последовательность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, гомологичную последовательность убиквитина В, гомолог эстеразы ювенильного гормона и гомологичную последовательность альфа-тубулина.

#### Пестицидная и инсектицидная активность

"Вредитель" включает без ограничения насекомых, грибки, бактерии, нематод, клещей, иксодовых клещей и т.п. Насекомые-вредители включают насекомых, выбранных из отрядов Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera и т. д., в частности Lepidoptera и Coleoptera.

Специалистам в данной области будет понятно, что не все соединения в равной степени эффективны в отношении всех вредителей. Соединения согласно вариантам осуществления проявляют активность в отношении насекомых-вредителей, которые могут включать экономически важных вредителей агрономических, лесных, тепличных продуктов, продуктов питомников декоративных растений, продуктов пищи и волокнистых продуктов, продуктов, связанных со здоровьем людей и животных, продуктов, связанных с домашней и коммерческой структурой, товаров для дома и продуктов для хранения.

Личинки представителей отряда Lepidoptera включают без ограничения личинки совок, подгрызающих совок, пядениц и представителей подсемейства Heliothinae семейства Noctuidae, Spodoptera frugiperda JE Smith (совки травяной); S. exigua Hubner (совки малой); S. litura Fabricius (табачной совки, гусе-

ницу, поедающую соцветия); *Mamestra configurata* Walker (совки Берта); *M. brassicae* Linnaeus (совки капустной); *Agrotis ipsilon* Hufnagel (совки-ипсилон); *A. orthogonia* Morrison (совки прямоугольной); *A. subterranea* Fabricius (совки зернистой); *Alabama argillacea* Hubner (совки хлопковой американской); *Trichoplusia ni* Hubner (совки ни); *Pseudoplusia includens* Walker (соевой совки); *Anticarsia gemmatilis* Hubner (гусеницу совки, питающуюся бархатными бобами); *Hypena scabra* Fabricius (совки клеверной); *Heliothis virescens* Fabricius (табачной листовертки); *Pseudaletia unipuncta* Haworth (совки луговой); *Aethes mindara* Barnes и McDunnough (шершавой совки); *Euxoa messoria* Harris (чернобокой совки); *Earias insulana* Boisduval (совки хлопковой египетской); *E. vittella* Fabricius (совки пятнистой); *Helicoverpa armigera* Hubner (совки щетинконогой резедовой); *H. zea* Boddie (совки кукурузной или хлопковой совки); *Melanchra picta* Harris (совки американской); *Egira (Xylomyges) curialis* Grote (цитрусовой совки); огневки, чехлоноска, бабочек, гусеницы которых строят паутинные гнезда, узкокрылых огневок и вредителей, скелетирующих листья, из семейства *Pyrulidae*, *Ostrinia nubilalis* Hubner (мотылька стеблевого кукурузного); *Amyeloides transitella* Walker (совки, гусеницы которых поедают орехи и плоды); *Anagasta kuehniella* Zeller (огневки мельничной); *Cadra cautella* Walker (огневки сухофруктовой); *Chilo suppressalis* Walker (желтой рисовой огневки); *C. partellus* (сортовой огневки); *Corcyra cephalonica* Stainton (огневки рисовой); *Crambus caliginosellus* Clemens (огневки кукурузной); *C. teterrellus* Zincken (огневки мятликовой); *Snaphalocrocis medinalis* Guenee (листовертки рисовой); *Desmia funeralis* Hubner (виноградной листовертки); *Diaphania hyalinata* Linnaeus (огневки дыни); *D. nitidalis* Stoll (огневки огурцов-пикули); *Diatraea grandiosella* Dyar (огневки кукурузной юго-западной); *D. saccharalis* Fabricius (огневки сахарного тростника); *Eoreuma loftini* Dyar (мексиканской рисовой огневки); *Ephestia elutella* Hubner (огневки табачной (шоколадной)); *Galleria mellonella* Linnaeus (большой восковой моли); *Herpetogramma licarsisalis* Walker (огневки-травянки); *Homoeosoma electellum* Hulst (огневки подсолнечниковой); *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (малой кукурузной огневки); *Achroia grisella* Fabricius (малой восковой моли); *Loxostege sticticalis* Linnaeus (лугового мотылька); *Orthaga thyrisalis* Walker (чайной моли); *Maruca testulalis* Geyer (огневки акациевой); *Plodia interpunctella* Hubner (моли индийской мучной); *Scirpophaga incertulas* Walker (стеблевой рисовой огневки); *Udea rubigalis* Guenee (огневки ржаво-коричневой); а также листовертков, листоверткопчоек, плодоядок и гусениц-вредителей плодов из семейства *Tortricidae*, *Acleris gloverana* Walsingham (западной черноголовой листовертки); *A. variana* Fernald (восточной черноголовой листовертки); *Archips argyospila* Walker (листовертки плодовых деревьев); *A. rosana* Linnaeus (европейской листовертки); и других видов *Archips*, *Adoxophyes orana* Fischer von Rosslerstamm (листовертки сетчатой); *Cochylis hospes* Walsingham (полосатой подсолнечниковой моли); *Cydia latiferreana* Walsingham (лещинной плодоядки); *C. pomonella* Linnaeus (яблонной плодоядки); *Platynota flavedana* Clemens (листовертки изменчивой); *P. stultana* Walsingham (листовертки всеядной); *Lobesia botrana* Denis и Schiffermuller (листовертки европейской виноградной); *Spilonota ocellana* Denis и Schiffermuller (листовертки почковой); *Endopiza viteana* Clemens (листовертки виноградной); *Eupoecilia ambiguella* Hubner (листовертки гроздевой); *Bonagota salubricola* Meyrick (листовертки бразильской яблочной); *Grapholita molesta* Busck (плодоядки восточной персиковой); *Suleima helianthana* Riley (листовертки подсолнечниковой); *Argyrotaenia* spp.; *Choristoneura* spp.

Другие выбранные сельскохозяйственные вредители из отряда *Lepidoptera* включают в себя без ограничения *Alsophila pometaria* Harris (осеннего плодового червя); *Anarsia lineatella* Zeller (моль фруктовую полосатую); *Anisota senatoria* J.E. Smith (сатурнию оранжевую дубовую); *Antheraea pernyi* Guerin-Meneville (китайского дубового шелкопряда); *Bombyx mori* Linnaeus (тутового шелкопряда); *Bucculatrix thurberiella* Busck (кривоусую хлопковую моль); *Colias eurytheme* Boisduval (люцерновую желтушку); *Datana integerrima* Grote и Robinson (хохлатку ореховую); *Dendrolimus sibiricus* Tschetwerikov (сибирского шелкопряда); *Ennomos subsignaria* Hubner (пяденицу ильмовую); *Erannis tiliaria* Harris (пяденицу липовую); *Euproctis chrysorrhoea* Linnaeus (шелкопряда золотистого); *Harrisina americana* Guerin-Meneville (пироморфиду американскую); *Hemileuca oliviae* Cockrell (гусеницу бабочки-сатурнии); *Hypphantria cunea* Drury (американскую белую бабочку); *Keiferia lycopersicella* Walsingham (томатную моль); *Lambdina fiscellaria fiscellaria* Hulst (пяденицу гемлоковую восточную); *L. fiscellaria lugubrosa* Hulst (пяденицу гемлоковую западную); *Leucoma salicis* Linnaeus (волнянку ивовую); *Lymantria dispar* Linnaeus (непарного шелкопряда); *Manduca quinquemaculata* Haworth (бразника пятиточечного, томатного бразника); *M. sexta* Haworth (томатного бразника, табачного бразника); *Operophtera brumata* Linnaeus (пяденицу зимнюю); *Palaemonia vernata* Peck (пяденицу весеннюю); *Papilio cresphontes* Cramer (парусника кресфонтес, "апельсиновую собаку"); *Phryganidia californica* Packard (коконопряда кольчатого калифорнийского); *Phyllocnistis citrella* Stainton (цитрусовую минирующую мушку); *Phyllonorycter blancardella* Fabricius (моль-пестрянку плодную нижнестороннюю); *Pieris brassicae* Linnaeus (белянку капустную большую); *P. rapae* Linnaeus (белянку капустную малую); *P. napi* Linnaeus (белянку брюквенную); *Platyptilia carduidactyla* Riley (пальцекрылку артишоковую); *Plutella xylostella* Linnaeus (моль капустную); *Pectinophora gossypiella* Saunders (розового коробочного червя); *Pontia protodice* Boisduval и Leconte (клетчатую белянку); *Sabulodes aegrotata* Guenee (всеядную пяденицу); *Schizura concinna* J.E. Smith (хохлатку); *Sitotroga cerealella* Olivier (моль ячменную ангумузскую); *Thaumetopoea pityocampa* Schiffermuller (походного шелкопряда соснового); *Tineola bisselliella* Hummel (моль комнатную); *Tuta absoluta* Meyrick (томат-

ную моль); *Yponomeuta padella* Linnaeus (горностаевую моль плодовую); *Heliothis subflexa* Guenee; *Malacosoma* spp. и *Orgyia* spp.

Представляют интерес личинки и имаго представителей отряда Coleoptera, в том числе долгоносиков из семейств Anthribidae, Bruchidae и Curculionidae (в том числе без ограничения: *Anthonomus grandis* Boheman (долгоносика хлопкового); *Lissorhoptus oryzophilus* Kuschel (долгоносика рисового водяного); *Sitophilus granarius* Linnaeus (долгоносика амбарного); *S. oryzae* Linnaeus (долгоносика рисового); *Hypera punctata* Fabricius (долгоносика точечного); *Cylindrocaptus adpersus* LeConte (долгоносика подсолнечникового стеблевого); *Smicronyx fulvus* LeConte (красного подсолнечникового долгоносика); *S. sordidus* LeConte (серого подсолнечникового долгоносика); *Sphenophorus maidis* Chittenden (долгоносика маисового)); земляных блошек, огуречных листоедов, корневых червей, листоедов, картофельных жуков и листовых минеров семейства Chrysomelidae (в том числе без ограничения: *Leptinotarsa decemlineata* Say (колорадского жука); *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (западного кукурузного жука); *D. barberi* Smith и Lawtence (северного кукурузного жука); *D. undecimpunctata howardi* Barber (южного кукурузного жука); *Chaetocnema pulicaria* Melsheimer (земляной кукурузной блошки); *Phyllotreta cruciferae* Goeze (блошки крестоцветной); *Phyllotreta striolata* (полосатой блошки); *Colaspis brunnea* Fabricius (листоеда виноградного); *Oulema melanopus* Linnaeus (пьявицы красногрудой); *Zygogramma exclamationis* Fabricius (подсолнечникового листоеда)); жуков из семейства Coccinellidae (в том числе без ограничения *Epilachna varivestis* Mulsant (мексиканской фасоловой коровки)); майских жуков и других жуков из семейства Scarabaeidae (в том числе без ограничения: *Popillia japonica* Newman (хрущика японского); *Cyclocephala borealis* Arrow (дупляка северного, хруща); *C. immaculata* Olivier (дупляка южного, хруща); *Rhizotrogus majalis* Razoumowsky (хруща европейского); *Phyllophaga crinita* Burmeister (хруща); *Ligyris gibbosus* De Geer (жука морковного)); кожеедов семейства Dermestidae; проволочников из семейства Elateridae, *Eleodes* spp., *Melanotus* spp.; *Conoderus* spp.; *Limonius* spp.; *Agriotes* spp.; *Ctenicera* spp.; *Aeolus* spp.; короедов из семейства Scolytidae и жуков из семейства Tenebrionidae.

Представляют интерес имаго и незрелые особи представителей отряда Diptera, в том числе минирующих мушек *Agromyza parvicornis* Loew (кукурузной минирующей мушки); галлиц (в том числе без ограничения: *Contarinia sorghicola* Coquillett (галлицы сортовой); *Mayetiola destructor* Say (гессенской мухи); *Sitodiplosis mosellana* Gehin (злаковой оранжевой галлицы); *Neolasioptera murfeldiana* Felt, (подсолнечниковой галлицы)); плодовых мушек (Tephritidae), *Oscinella frit* Linnaeus (плодовых мушек); цветочных мух (в том числе без ограничения: *Delia platura* Meigen (мухи ростковой); *D. coarctata* Fallen (мухи озимой) и других представителей *Delia* spp., *Meromyza americana* Fitch (американской меромизы); *Musca domestica* Linnaeus (комнатных мух); *Fannia canicularis* Linnaeus, *F. femoralis* Stein (малых комнатных мух); *Stomoxys calcitrans* Linnaeus (жигалок осенних)); мух полевых, жигалок, мух мясных, *Chrysomya* spp.; *Phormia* spp. и других мух-вредителей, слепней *Tabanus* spp.; носоглоточных оводов *Gastrophilus* spp.; *Oestrus* spp.; бычьих оводов *Hypoderma* spp.; пестряков *Chrysops* spp.; *Melophagus ovinus* Linnaeus (кровососок овечьих) и других представителей *Brachycera*, комаров *Aedes* spp.; *Anopheles* spp.; *Culex* spp.; мошек *Prosimulium* spp.; *Simulium* spp.; мокрецов, москитов, сциарид и других представителей *Nematocera*.

В качестве представляющих интерес насекомых включены имаго и насекомые на стадии нимфы представителей отрядов Hemiptera и Homoptera, таких как без ограничения хермесы из семейства Adelgidae, слепняки из семейства Miridae, цикады из семейства Cicadidae, цикадки, *Empoasca* spp.; представители семейства Cicadellidae, насекомые надсемейства Fulgoroidea из семейств Cixiidae, Flatidae, Fulgoroidea, Issidae и Delphacidae, горбатки из семейства Membracidae, листоблошки из семейства Psyllidae, белокрылки из семейства Aleyrodidae, тли из семейства Aphididae, филлоксеры из семейства Phylloxeridae, мучнистые червецы из семейства Pseudococcidae, червецы из семейств Asterolecanidae, Coccidae, Dactylopiidae, Diaspididae, Eriococcidae, Ortheziidae, Phoenicococcidae и Margarodidae, кружевницы из семейства Tingidae, щитники из семейства Pentatomidae, клопы-черепашки, *Blissus* spp.; и другие наземники из семейства Lygaeidae, пенницы из семейства Cercopidae, краевики из семейства Coreidae, а также красноклопы и красноклопы хлопковые из семейства Pygmaeoridae.

Важные с точки зрения сельского хозяйства представители отряда Homoptera дополнительно включают без ограничения: *Acyrtosiphon pisum* Harris (тлю гороховую); *Aphis craccivora* Koch (тлю люцерновую); *A. fabae* Scopoli (тлю свекловичную); *A. gossypii* Glover (тлю хлопковую, тлю бахчевую); *A. maidiradicis* Forbes (тлю кукурузную корневую); *A. pomi* De Geer (тлю яблоневую); *A. spiraeicola* Patch (тлю зеленую цитрусовую); *Aulacorthum solani* Kaltentbach (тлю картофельную обыкновенную); *Chaetosiphon fragaefolii* Cockerell (тлю земляничную американскую); *Diuraphis noxia* Kurdjumov/Mordvilko (русскую пшеничную тлю); *Dysaphis plantaginea* Paaserini (тлю яблоневую розовую); *Eriosoma lanigerum* Hausmann (тлю яблоневую кровяную); *Brevicoryne brassicae* Linnaeus (капустную тлю); *Hyalopterus pruni* Geoffroy (тлю сливовую опыленную); *Lipaphis erysimi* Kaltentbach (тлю ложнокапустную); *Metopolophium dirhodum* Walker (розанно-злаковую тлю); *Macrosiphum euphorbiae* Thomas (большую картофельную тлю); *Myzus persicae* Sulzer (тлю персиковую, тлю оранжевую); *Nasonovia ribisnigri* Mosley (тлю салатную зеленую); *Pemphigus* spp. (разновидности тли корневой и тли галловой); *Rhopalosiphum maidis* Fitch (тлю сортовую); *R. padi* Linnaeus (тлю черемуховую обыкновенную); *Schizaphis graminum* Rondani (тлю злаковую обыкновенную); *Sipha flava* Forbes (тлю желтую сахарного тростника); *Sitobion avenae* Fabricius (тлю

листовую); *Therioaphis maculata* Buckton (пятнистую люцерновую тлю); *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (тлю померанцевую) и *T. citricida* Kirkaldy (тлю цитрусовую); *Melanaphis sacchari* (тлю сахарного тростника); *Adelges* spp. (хермесов); *Phylloxera devastatrix* Pergande (филлоксеру гикори); *Bemisia tabaci* Gennadius (белокрылку табачную, белокрылку хлопковую); *B. argentifolii* Bellows и Perring (белокрылку магнолиевую); *Dialeurodes citri* Ashmead (белокрылку цитрусовую); *Trialeurodes abutiloneus* (белокрылку полосатокрылую) и *T. vaporariorum* Westwood (белокрылку тепличную); *Empoasca fabae* Harris (цикадку картофельную); *Laodelphax striatellus* Fallen (темную цикадку); *Macrolestes quadrilineatus* Forbes (цикадку астровую); *Nephotettix cincticeps* Uhler (цикадку зеленую); *N. nigropictus* Stal (рисовую цикадку); *Nilaparvata lugens* Stal (бурую рисовую цикадку); *Peregrinus maidis* Ashmead (цикадку кукурузную); *Sogatella furcifera* Horvath (цикадку белоспинную); *Sogatodes orizicola* Muir (дельфацида рисового); *Typhlocyba pomaria* McAtee (цикадку яблоневою); *Erythroneoura* spp. (разновидности цикадки виноградной); *Magisicada septendecim* Linnaeus (периодическую цикаду); *Icerya purchasi* Maskell (червеца австралийского желобчатого); *Quadraspidiotus perniciosus* Comstock (щитовку калифорнийскую); *Planococcus citri* Risso (мучнистого червеца цитрусового); *Pseudococcus* spp. (другие разновидности мучнистого червеца); *Sacopsylla rugicola* Foerster (листоблошку грушевую); *Trioxa diospyri* Ashmead (листоблошку хурмовую).

Виды, представляющие интерес с точки зрения сельского хозяйства, из отряда Hemiptera включают без ограничения: *Acrosternum hilare* Say (щитника зеленого); *Anasa tristis* De Geerm (клопа-ромбовика печального); *Blissus leucopterus leucopterus* Say (клопа-черепашку); *Corythuca gossypii* Fabricius (кружевницу хлопковую); *Cyrtopeltis modesta* Distant (клопа томатного); *Dysdercus suturellus* Herrich-Schaffer (красноклопа хлопкового); *Euschistus servus* Say (клопа коричневого вонючего); *E. variolarius* Palisot de Beauvois (щитника однопятнистого); *Graptostethus* spp. (комплекс разновидностей клопа-наземника); *Leproglossus corculus* Say (клопа-краевика соснового); *Lygus lineolaris* Palisot de Beauvois (клопа лугового); *L. hesperus* Knight (слепняка западного матового); *L. pratensis* Linnaeus (клопика полевого); *L. rugulipennis* Poppius (клопа травяного европейского); *Lygocoris pabulinus* Linnaeus (зеленого слепняка); *Nezara viridula* Linnaeus (зеленого овощного клопа); *Oebalus pugnax* Fabricius (клопа-щитника рисового); *Oncopeltus fasciatus* Dallas (клопа молочайного большого); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (клопа-слепняка хлопкового).

Кроме того, варианты осуществления могут быть эффективными в отношении Hemiptera, таких как *Calocoris norvegicus* Gmelin (клопик картофельный); *Orthops campestris* Linnaeus; *Plesiocoris rugicollis* Fallen (клоп яблоневый северный); *Cyrtopeltis modestus* Distant (томатный клоп); *Cyrtopeltis notatus* Distant (клоп-слепняк); *Spanagonicus albofasciatus* Reuter (слепняк белоточечный); *Diaphnocoris chlorionis* Say (клоп-слепняк гледичии); *Laboridicola allii* Knight (слепняк луковый); *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (слепняк хлопковый); *Adelphocoris rapidus* Say (клоп быстрый); *Poecilopsus lineatus* Fabricius (слепняк четырехлинейный); *Nysius ericae* Schilling (низиус вересковый); *Nysius raphanus* Howard (ложная черепашка); *Nezara viridula* Linnaeus (зеленый овощной клоп); *Eurygaster* spp.; *Coreidae* spp.; *Pyrrhocoridae* spp.; *Tinidae* spp.; *Blostomatidae* spp.; *Reduviidae* spp. и *Cimicidae* spp.

Также включены имаго и личинки представителей отряда Acari (клещей), таких как *Aceria tosicella* Keifer (галловый клещ пшеничный); *Petrobia latens* Müller (петробия многоядная); клещики паутиные и клещики красные семейства Tetranychidae, *Panonychus ulmi* Koch (красный плодовой клещ); *Tetranychus urticae* Koch (обыкновенный паутиный клещ); *T. mcDanieli* McGregor (клещик Макданиела); *T. cinnabarinus* Boisduval (красный паутиный клещик); *T. turkestanus* Ugarov и Nikolski (туркестанский паутиный клещик); плоские клещи семейства Tenuipalpidae, *Brevipalpus lewisi* McGregor (оранжевый клещ); ржавчинные и почковые клещи семейства Eriophyidae и другие клещи, питающиеся листьями, а также клещи, важные для здоровья человека и животных, т.е. пылевые клещи семейства Epidermoptidae, железницы семейства Demodicidae, зерновые клещи семейства Glycyphagidae, иксодовые клещи отряда Ixodidae, *Ixodes scapularis* Say (черноногий клещ); *I. holocyclus* Neumann (австралийский паралитический клещ); *Dermacentor variabilis* Say (клещ иксодовый собачий); *Amblyomma americanum* Linnaeus (иксодовый клещ *Amblyomma*) и конские и чесоточные клещи семейств Psoroptidae, Psymotidae и Sarcoptidae.

Представляющими интерес насекомыми-вредителями из отряда Thysanura являются, например, *Leprisma saccharina* Linnaeus (чешуйница); *Thermobia domestica* Packard (термобия).

Дополнительные охватываемые вредители-артроподы включают: пауков из отряда Araneae, таких как *Loxosceles reclusa* Gertsch и Mulaik (бурый паук-отшельник) и *Latrodectus mactans* Fabricius (черная вдова), а также многоножек из отряда Scutigeraomorpha, таких как *Scutigera coleoptrata* Linnaeus (обыкновенная мухоловка).

Насекомое-вредитель, представляющее интерес, включает надсемейство щитников и других родственных насекомых, в том числе без исключения виды, принадлежащие к семейству Pentatomidae (*Nezara viridula*, *Halyomorpha halys*, *Piezodorus guildini*, *Euschistus servus*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus heros*, *Euschistus tristigmus*, *Acrosternum hilare*, *Dichelops furcatus*, *Dichelops melacanthus* и *Bagrada hilaris* (клопа из рода *Bagrada*)), семейству Plataspidae (*Megacopta cribraria* полушаровидного щитника) и семейству Cydnidae (*Scaptocoris castanea* - коричневого клопа-землекопа), а также виды Lepidoptera, в том числе без ограничения моль капустную, например *Helicoverpa zea* Boddie; соевую совку, например *Pseudoplusia includens* Walker, и гусеницу совки, питающуюся бархатными бобами, например *Anticarsia gemmatalis* Hübner.

Способы измерения пестицидной активности хорошо известны в уровне техники. См., например, Czaplá and Lang, (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews, et al., (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293 и патент США № 5743477, все из которых включены в данный документ с помощью ссылки в полном объеме. Как правило, белок смешивают и применяют в анализах питания. См., например, Marrone, et al., (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Такие анализы могут включать приведение растений в контакт с одним или несколькими вредителями и определение способности растения выживать и/или вызывать гибель вредителей.

Нематоды включают паразитических нематод, таких как галловые, цистообразующие и ранящие нематоды, в том числе *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp. и *Globodera* spp.; в частности, представители цистообразующих нематод, в том числе без ограничения *Heterodera glycines* (соевая цистообразующая нематода); *Heterodera schachtii* (цистообразующая нематода свеклы); *Heterodera avenae* (цистообразующая нематода злаков), а также *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* (цистообразующие нематоды картофеля). Ранящие нематоды включают *Pratylenchus* spp.

#### Средство для обработки семян

Для защиты и для повышения продукции урожая и улучшения технологий усовершенствования признаков дополнительные средства для обработки семян могут обеспечивать дополнительную гибкость культурных растений и экономически эффективный контроль в отношении насекомых, сорняков и заболеваний. Семенной материал можно обрабатывать, обычно обрабатывать поверхность с помощью композиции, содержащей комбинации химических или биологических гербицидов, антидотов гербицидов, инсектицидов, фунгицидов, ингибиторов и усилителей прорастания, питательных веществ, регуляторов и активаторов роста растений, бактерицидов, нематоцидов, авицидов и/или моллюскоцидов. Эти соединения обычно составляют вместе с дополнительными носителями, поверхностно-активными веществами или вспомогательными средствами, способствующими нанесению, традиционно используемыми в области техники, связанной с получением составов. Покрытия можно наносить с помощью пропитки материала для размножения жидким составом или с помощью покрытия комбинированным влажным или сухим составом. Примеры различных типов соединений, которые можно применять в качестве средств для обработки семян, представлены в *The Pesticide Manual: A World Compendium*, C.D.S. Tomlin Ed., Published by the British Crop Production Council, который включен в данный документ с помощью ссылки.

Некоторые средства для обработки семян, которые можно применять в отношении семян сельскохозяйственных культур, включают без ограничения одно или несколько из абсцизовой кислоты, ацибензолар-S-метила, авермектина, амитрола, азаконазола, азоспириллума, азадирахтина, азоксистробина, *Bacillus* spp. (в том числе один или несколько из видов *cereus*, *firmus*, *megaterium*, *pumilis*, *sphaericus*, *subtilis* и/или *thuringiensis*), *Bradyrhizobium* spp. (в том числе один или несколько из *betae*, *canariense*, *elkanii*, *iriomotense*, *japonicum*, *liaonigense*, *pachyrhizi* и/или *yuanmingense*), каптана, карбоксина, хитозана, клотианидина, меди, циазипира, дифеноконазола, этидиазола, фипронила, флудиоксонила, флуоксастробина, флуквинконазола, флуразола, флуксофенима, белка гарпина, имазалила, имидаклоприда, ипконазола, изофлавоноидов, липохитоолигосахаридов, манкозеба, марганца, манеба, мефеноксама, металаксилла, метконазола, миклобутанила, PCNB, пенфлуфена, пинезиллума, пентиопирада, перметрина, пикоксистробина, протиоконазола, пираклостробина, ринаксипира, S-метолахлора, сапонина, седаксана, TCMТВ, тебуконазола, тиабендазола, тиаметоксама, тиокарба, тирама, толклофос-метила, триадименола, триходермы, трифлуксистробина, тритриконазола и/или цинка. Покрытие семян PCNB, относящееся к номеру регистрации EPA 00293500419, содержит квинтозен и терразол. TCMТВ обозначает 2-(тиоцианометилтио)бензотиазол.

Сорта семян и семена со специфическими трансгенными признаками можно тестировать для определения того, какие дополнительные средства для обработки семян и нормы внесения могут дополнять такие сорта и трансгенные признаки для повышения урожайности. Например, сорт с хорошей потенциальной урожайностью, но восприимчивостью к пыльной головне, может выиграть от применения средства для обработки семян, которое обеспечивает защиту от пыльной головни, сорт с хорошей потенциальной урожайностью, но восприимчивостью к цистообразующим нематодам, может выиграть от применения средства обработки семян, которое обеспечивает защиту от цистообразующей нематоды, и т.д. Аналогично сорт, включающий трансгенный признак, который обеспечивает устойчивость к насекомым, может выиграть от второго механизма действия, придаваемого средством для обработки семян, сорт, включающий трансгенный признак, который придает устойчивость к гербициду, может выиграть от средства обработки семян с антидотом, который повышает устойчивость растений к такому гербициду, и т.д. Кроме того, хорошее укоренение и ранняя всхожесть, которые являются результатом правильного применения средства для обработки семян, могут приводить к более эффективному использованию азота, лучшей способности переносить засуху и общему повышению потенциальной урожайности сорта или сортов, содержащих определенный признак, в комбинации со средством для обработки семян.

Способы уничтожения насекомого-вредителя и контроля популяции насекомых

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются способы уничтожения насекомого-вредителя, включающие приведение насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством рекомбинантного полипептида PIP-72 и полинуклеотида, кодирующего элемент сайленсинга.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются способы уничтожения насекомого-вредителя, включающие приведение насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством одного или нескольких рекомбинантных пестицидных белков с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32, любой из SEQ ID NO: 528 - SEQ ID NO: 768, любой из SEQ ID NO: 825 - SEQ ID NO: 844, SEQ ID NO: 771, SEQ ID NO: 772 или SEQ ID NO: 852 или их вариантом и одного или нескольких элементов сайленсинга для мишени, раскрытых в публикации заявки на выдачу патента США № US 2014/0275208 или US 2015/0257389.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются способы контроля популяции насекомого-вредителя, предусматривающие приведение популяции насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством одного или нескольких рекомбинантных полипептидов PIP-72 и одного или нескольких полинуклеотидов, кодирующих элемент(ы) сайленсинга. "Осуществление контроля популяции вредителей" или "контроль вредителя", используемые в данном документе, относятся к любому эффекту в отношении вредителя, который приводит к ограничению вреда, который наносит вредитель. Контроль вредителя включает без ограничений уничтожение вредителя, подавление развития вредителя, изменение плодовитости или роста вредителя таким образом, что вредитель оказывает меньше вреда в отношении растения, снижение количества производимого потомства, получение менее приспособленных вредителей, получение вредителей, более восприимчивых к нападению хищников или удержание вредителей от поедания растения.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются способы контроля популяции насекомого-вредителя, устойчивого к пестицидному белку, предусматривающие приведение популяции насекомого-вредителя в контакт с инсектицидно эффективным количеством одного или нескольких рекомбинантных полипептидов PIP-72 и элементом сайленсинга.

В некоторых вариантах осуществления предусматриваются способы защиты растения от насекомого-вредителя, предусматривающие экспрессию в растении или его клетке рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего один или несколько полипептидов PIP-72, и элемента(ов) сайленсинга.

#### Стратегии управления устойчивостью насекомых (IRM)

Было доказано, что экспрессия  $\delta$ -эндотоксинов *B. thuringiensis* в трансгенных растениях кукурузы является эффективным средством контроля важных с точки зрения сельского хозяйства насекомых-вредителей (Perlak, et al., 1990; 1993). Однако возникли насекомые, которые устойчивы к  $\delta$ -эндотоксинам *B. thuringiensis*, экспрессирующимся в трансгенных растениях. Такая устойчивость, если она станет широко распространенной, будет явно ограничивать коммерческое значение идиопазмы, содержащей гены, кодирующие такие  $\delta$ -эндотоксины *B. thuringiensis*.

Одним способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении целевых вредителей и одновременного снижения развития устойчивых к инсектицидам вредителей является применение полученных нетрансгенных (т.е. с неинсектицидным белком) рефугиев (раздел неинсектицидных сельскохозяйственных культур/кукурузы) для применения с трансгенными сельскохозяйственными культурами, вырабатывающих один инсектицидный белок, активный в отношении целевых вредителей. Управление по охране окружающей среды Соединенных Штатов Америки ([epa.gov/oppbpd/biopesticides/pips/bt\\_corn\\_refuge\\_2006.htm](http://epa.gov/oppbpd/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm), доступ к которому можно получить с использованием префикса [www](http://www)) публикует требования по применению трансгенных сельскохозяйственных культур, вырабатывающих один Vt-белок, активный в отношении целевых вредителей. В дополнение, Национальная ассоциация кукурузоводов на своем веб-сайте: ([ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn](http://ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn), доступ к которому можно получить с использованием префикса [www](http://www)) также предлагает аналогичные руководства, касающиеся требований к рефугиям. Из-за потерь, обусловленных насекомыми в пределах зоны рефугиев, более крупные рефугии могут снижать общую урожайность.

Другим способом повышения эффективности трансгенных инсектицидов в отношении целевых вредителей и одновременного снижения развития устойчивых к инсектицидам вредителей будет хранение инсектицидных генов, которые эффективны в отношении групп насекомых-вредителей и которые проявляют свои эффекты посредством отличающихся механизмов действия.

Экспрессия в растении двух или более инсектицидных композиций, токсичных для одного вида насекомых, при этом каждый инсектицид экспрессируется на эффективных уровнях, будет представлять собой другой способ для достижения контроля развития устойчивости. Это основано на принципе, что эволюция устойчивости к двум отдельным механизмам действия значительно менее вероятно, чем только к одному. Например, Roush описывает стратегии двух токсинов, также называемые "создание пирамиды" или "пакетирование", для управления инсектицидными трансгенными сельскохозяйственными культурами. (The Royal Society. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. (1998) 353:1777-1786). Пакетирование или создание пирамиды из двух различных белков, каждый из которых эффективен в отношении целевых вредителей, и при этом отсутствует перекрестная устойчивость или она невелика, может обеспечивать возможность применения меньшего рефугия. Управление по охране окружающей среды США требует существенно меньший (как правило 5%) структурированный рефугий для высаживания кукурузы, не

являющейся Vt, чем для продуктов с одним признаком (как правило 20%). Существуют различные способы обеспечения эффектов IRM рефугия, в том числе различные геометрические паттерны высаживания в полях и смеси семян "в мешке", как дополнительно обсуждается у Roush.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды PIP-72 и полинуклеотид, кодирующий элемент сайленсинга, по настоящему раскрытию применимы в качестве стратегии управления устойчивостью насекомых в комбинации (т.е. в составе пирамиды) с другими пестицидными белками, включающими без ограничения Vt-токсина, инсектицидные белки *Xenorhabdus sp.* или *Photorhabdus sp.* и т.п.

Предусматриваются способы контроля в отношении заражения (заражений) трансгенного растения насекомыми отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*, которые обеспечивают управление устойчивостью насекомых, включающие экспрессию в растении по меньшей мере двух различных инсектицидных белков, характеризующихся отличающимися механизмами действия.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения трансгенного растения насекомыми из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* и содействия в управлении устойчивостью насекомых включают инсектицидный полипептид PIP-72 и элемент сайленсинга в отношении насекомых из отрядов *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля заражения трансгенного растения насекомыми из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* и обеспечения управления устойчивостью насекомых включают экспрессию в трансгенном растении полипептида PIP-72 и полинуклеотида, кодирующего элемент сайленсинга, инсектицидных в отношении насекомых из отрядов *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*, характеризующихся отличающимися механизмами действия.

Также предусматриваются способы снижения вероятности появления устойчивости у насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* к трансгенным растениям, экспрессирующим в растениях инсектицидные белки для контроля видов насекомых, включающие экспрессию полипептида PIP-72 и полинуклеотида, кодирующего элемент сайленсинга, инсектицидных в отношении видов насекомых, в комбинации со вторым инсектицидным белком в отношении вида насекомого, характеризующихся отличающимися механизмами действия.

Также предусматриваются средства для эффективного управления устойчивостью насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* к трансгенным растениям, включающие совместную экспрессию на высоких уровнях в растениях двух или более инсектицидных белков, токсичных для насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*, но при этом каждый характеризуется отличающимся механизмом осуществления его активности применительно к уничтожению, где два или более инсектицидных белков включают полипептид PIP-72 и белок Cry. Также предусматриваются средства для эффективного управления устойчивостью насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera* к трансгенным растениям, включающие совместную экспрессию на высоких уровнях в растениях двух или более инсектицидных белков, токсичных в отношении насекомых из отряда *Lepidoptera* и/или *Coleoptera*, но каждый при этом характеризуется отличающимся механизмом осуществления его активности применительно к уничтожению, где присутствуют два или более инсектицидных белков.

Приведенное выше описание различных проиллюстрированных вариантов осуществления согласно настоящему раскрытию не подразумевается как исчерпывающее или для ограничения настоящего изобретения точной раскрытой формой. Хотя конкретные варианты осуществления и примеры описаны в данном документе для иллюстративных целей, в пределах объема возможны различные эквивалентные модификации, как будет понятно специалистам в данной области. Представленные в данном документе идеи можно применять для других целей, отличающихся от примеров, описанных выше. Варианты осуществления можно осуществлять на практике с помощью способов, отличающихся от подробно описанных в вышеизложенном описании и примерах. В свете вышеизложенных идей возможны многочисленные модификации и вариации настоящего изобретения, и, следовательно, они находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Эти и другие изменения можно делать в вариантах осуществления в свете вышеизложенного подробного описания. В целом, в нижеследующей формуле изобретения используемые термины не должны рассматриваться как ограничивающие варианты осуществления до конкретных вариантов осуществления, раскрытых в данном описании и формуле изобретения.

Полное раскрытие каждого приводимого документа (в том числе патентов, патентных заявок, статей из журналов, рефератов, руководств, книг или других раскрытий) в разделах "Предпосылки изобретения", "Подробное описание" и "Примеры" включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Были сделаны попытки обеспечения точности в отношении применяемых чисел (например количества, температуры, концентраций и т.д.), но должны предусматриваться некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, молекулярный вес представляет собой средний молекулярный вес; температура приведена в градусах Цельсия и давление является атмосферным или практически атмосферным.

#### **Экспериментальная часть**

Пример 1. Инсектицидная активность трансгенных растений, экспрессирующих PIP-72 и элемент сайленсинга на основе dsRNA для RyanR.

Анализ в отношении кукурузных жуков проводили путем заражения растений, которые недавно были пересажены из лотков в горшки объемом примерно 3 л. Почвенная смесь была разной, однако она должна содержать много торфа, кусков коры и других почвоулучшителей, чтобы сделать среду более легкой и способствовать аэрации и здоровому росту корней. Через 2 дня после пересадки растения заражали яйцами западного кукурузного жука в количестве 200 штук, находящимися во взвешенном состоянии в воде. Время для яиц выбирали так, чтобы "выклев" происходил в течение нескольких дней после заражения. Растения поддерживали стандартными тепличными способами полива и внесения удобрения. Через 19 дней растения удаляли из горшков и почву вымывали из корней с целью выявления повреждений в результате питания. Оценки проводили с использованием шкалы поражения узлов, разработанной Nowatzki et al. (2005) *J. of Economic Entomology*, 98, 1-8. Балл поражения узлов основан на количестве узлов корней с повреждениями, при этом 0 указывает на отсутствие повреждений, а 3 указывает на то, что 3 узла корней съедены до длины менее 2 см. При применении пакетированных конструкций видно значительное уменьшение степени повреждения в результате питания по сравнению с отрицательными контролями (фиг. 1).

Пример 2. Экспрессия элемента сайленсинга на основе dsRNA для RyanR в трансгенном маисе с пакетированными PIP-72 и элементом сайленсинга на основе dsRNA для RyanR.

Анализ РНК с помощью QuantiGene® Plex 2.0 (Affymetrix®) применяли для выявления смысловой цепи транскрипта dsRNA, целенаправленно воздействующего на RyanR (DvSSJ, SEQ ID NO: 993), в трансгенных растениях. Двухцепочечную РНК, целенаправленно воздействующую на RyanR, получали с помощью транскрипции *in vitro*. Очищенную dsRNA количественно определяли при OD260 и использовали в качестве стандарта для количественного выявления. Трансгенные корни (приблизительно 45 мг) собирали от каждого отдельного растения T0 и обрабатывали для выявления с помощью QuantiGene® в соответствии с руководством пользователя QuantiGene® 2.0. Данные экспрессии РНК вычисляли как пикограмм на мг свежего корня (или пг/мг). Пакетированные конструкции продемонстрировали значительную экспрессию dsRNA, целенаправленно воздействующей на RyanR, при этом без выявления ее в отрицательном контроле (фиг. 2).

Пример 3. Экспрессия полипептида PIP-72 в трансгенном маисе с пакетированными PIP-72 и элементом сайленсинга на основе dsRNA для RyanR.

Абсолютную степень экспрессии белка PIP-72Aa определяли с использованием LC-MS/MS (жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией) согласно *J Agric Food Chem*, 2011 Apr 27; 59(8):3551-8). После лиофилизации и измельчения 10 мг образцов листьев экстрагировали с помощью 600 мкл буфера PBST (фосфатно-солевого буферного раствора и 0,05% Твин 20). Примерно 500 мг свежих замороженных образцов корней экстрагировали с помощью 1000 мкл буфера PBST. После центрифугирования супернатант собирали и количество полностью экстрагированных белков (TEP) измеряли с помощью анализа Брэдфорда. Образцы нормализовали с помощью TEP. В общей сложности 50 мкл нормализованного экстракта добавляли к 100 мкл буферного раствора ABCT для расщепления (100 мМ бикарбоната аммония и 0,05% Твин 20). Стандартную кривую получали путем внесения различных количеств стандарта рекомбинантного белка в 50 мкл аликвоты экстракта отрицательного образца. Соответствующее количество буферного раствора ABCT для расщепления добавляли в каждой точке стандартной кривой, чтобы поддерживать общие объемы одинаковыми между образцами и стандартами. Образцы и стандарты восстанавливали с помощью 6 мкл 0,25 М дитиотреитола при 50°C в течение 30 мин и затем алкилировали с помощью 6 мкл 0,3 М йодацетамида при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. К каждому образцу добавляли 1 мкг трипсина (10 мкл) и обеспечивали возможность расщеплению протекать при 37°C в течение ночи (~18 ч) перед добавлением 10 мкл 10% (об./об.) муравьиной кислоты. Белок PIP-72Aa количественно определяли с помощью мониторинга его сигнатурного триптического пептида QETWDR с помощью MRM (мониторинга множественных реакций)-перехода 417.7/577.3 с использованием Waters UPLC (сверхэффективная жидкостная хроматография) в сочетании с AB SCIEX Q-TRAP 5500. При анализе температуру автодозатора поддерживали при 8°C. Вводили 10 мкл объема на колонку VEN 50×2,1 мм, 1,7 мкм C18 (Waters), поддерживаемую при 60°C. Подвижные фазы состояли из 0,1% муравьиной кислоты (MPA) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (MPB), а LC проводили при скорости потока 1,0 мл/мин с линейным градиентом 2-10% MPB в течение 1,5 мин. Концентрации белка в неизвестных образцах рассчитывали путем интерполяции в стандартную кривую с использованием программного обеспечения Analyst версии 1.6.2 (AB Sciex). Пакетированные конструкции продемонстрировали значительную экспрессию PIP-72, при этом без ее выявления в отрицательном контроле (фиг. 3).

Пример 4. Опосредованная Agrobacterium стабильная трансформация маиса.

Для опосредованной Agrobacterium трансформации маиса в отношении трансгенного маиса с пакетированными PIP-72 и элементом сайленсинга на основе dsRNA для RyanR применяли способ согласно Zhao (патент США № 5981840 и публикация международной патентной заявки № WO 1998/32326). Вкратце, незрелые зародыши выделяли из маиса и зародыши приводили в контакт с суспензией Agrobacterium, где бактерии были способны переносить полинуклеотид, кодирующий полипептид PIP-72, и по-

линуклеотид, кодирующий элемент сайленсинга, целенаправленно воздействующий на RyanR, по меньшей мере в одну клетку по меньшей мере одного из незрелых зародышей (стадия 1: стадия заражения). На этой стадии незрелые зародыши погружали в суспензию *Agrobacterium* для инициации инокуляции. Зародыши в течение некоторого времени культивировали совместно с *Agrobacterium* (стадия 2: стадия совместного культивирования). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде с антибиотиком, но без селективного средства, для исключения *Agrobacterium* и для обеспечения фазы покоя для инфицированных клеток. Затем инокулированные зародыши культивировали на среде, содержащей селективное средство, и выделяли растущий трансформированный каллус (стадия 4: стадия отбора). Незрелые зародыши культивировали на твердой среде с селективным средством, что приводило к селективному росту трансформированных клеток. Затем каллус регенерировали с получением растений (стадия 5: стадия регенерации) и каллусы, выращенные на селективной среде, культивировали на твердой среде для регенерации растений.

Трансгенные растения маиса, положительные в отношении экспрессии инсектицидных белков, тестировали на пестицидную активность с использованием стандартных биологических анализов, известных в уровне техники. Такие способы включают, например, биологические анализы с иссечением корня и биологические анализы целого растения. См., например, публикацию заявки на выдачу патента США № US 2003/0120054 и международную публикацию № WO 2003/018810.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Инсектицидная ДНК-конструкция, содержащая i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PIP-72, обладающий инсектицидной активностью, и ii) элемент сайленсинга, обладающий инсектицидной активностью, где указанный PIP-72 включает последовательность по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и указанный элемент сайленсинга нацелен на: (a) SEQ ID NO: 992 или (b) полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 993.

2. ДНК-конструкция по п.1, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, и элемент сайленсинга функционально связаны с гетерологичным регуляторным элементом.

3. ДНК-конструкция по п.1 или 2, где элемент сайленсинга представляет собой смысловой супрессионный элемент, антисмысловой супрессионный элемент, двухцепочечную РНК, siRNA, amiRNA, miRNA или шпилечный супрессионный элемент.

4. Клетка-хозяин, содержащая i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PIP-72, обладающий инсектицидной активностью, и ii) элемент сайленсинга, обладающий инсектицидной активностью, где указанный PIP-72 включает последовательность по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и указанный элемент сайленсинга нацелен на: (a) SEQ ID NO: 992 или (b) полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 993.

5. Клетка-хозяин по п.4, где молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид PIP-72, и элемент сайленсинга функционально связаны с гетерологичным регуляторным элементом.

6. Клетка-хозяин по п.4 или 5, где элемент сайленсинга представляет собой смысловой супрессионный элемент, антисмысловой супрессионный элемент, двухцепочечную РНК, siRNA, amiRNA, miRNA или шпилечный супрессионный элемент.

7. Трансгенное растение или его потомство, обладающие инсектицидной активностью, содержащие ДНК-конструкцию по п.1, 2 или 3.

8. Трансгенное растение или его потомство, обладающие инсектицидной активностью, содержащие i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PIP-72, обладающий инсектицидной активностью, и ii) элемент сайленсинга, обладающий инсектицидной активностью, где указанный PIP-72 включает последовательность по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и указанный элемент сайленсинга нацелен на: (a) SEQ ID NO: 992 или (b) полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 993, которые граничат друг с другом.

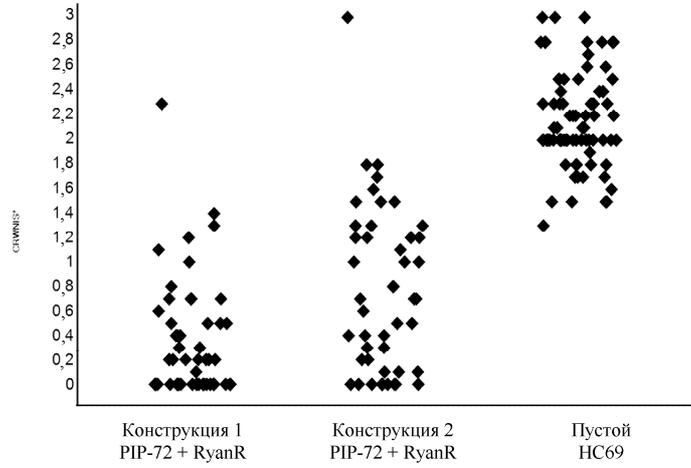
9. Трансгенное растение или его потомство, обладающие инсектицидной активностью, полученные скрещиванием отдельных линий, где одна из скрещиваемых отдельных линий содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PIP-72, обладающий инсектицидной активностью, а другая линия содержит элемент сайленсинга, обладающий инсектицидной активностью, где указанный PIP-72 включает последовательность по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и указанный элемент сайленсинга нацелен на: (a) SEQ ID NO: 992 или (b) полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 993.

10. Инсектицидная композиция, содержащая i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PIP-72, обладающий инсектицидной активностью, и ii) элемент сайленсинга, обладающий инсектицидной активностью, где указанный PIP-72 включает последовательность по меньшей мере с 70% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 2 и указанный элемент сайленсинга нацелен на: (a) SEQ ID NO: 992 или (b) полинуклеотид, включающий последовательность SEQ ID NO: 993.

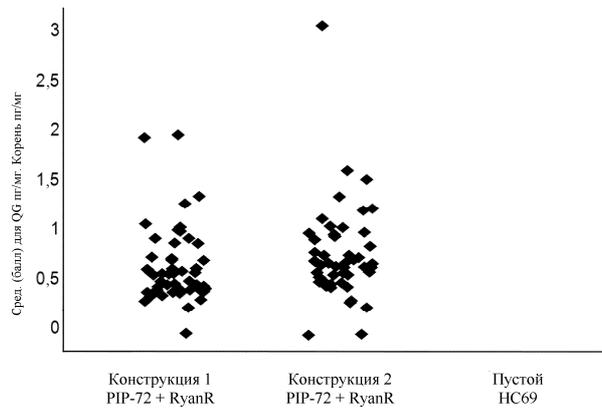
11. Композиция по п.10, где элемент сайленсинга представляет собой смысловой супрессионный элемент, антисмысловой супрессионный элемент, двухцепочечную РНК, siRNA, amiRNA, miRNA или

шпилечный супрессионный элемент.

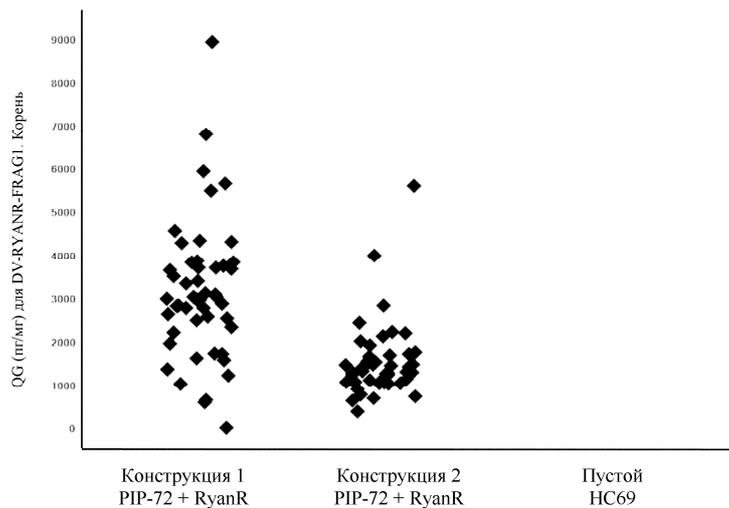
12. Способ контроля популяции насекомого-вредителя, включающий приведение популяции насекомого-вредителя в контакт с трансгенным растением по п.7, 8 или 9.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

