

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992637** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2020.03.17

(51) Int. Cl. *C12N 9/22* (2006.01)  
*C12N 15/82* (2006.01)  
*C12N 15/52* (2006.01)  
*A01H 5/00* (2018.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.05.11

---

(54) **СОЗДАНИЕ ГЕНА, УСТОЙЧИВОГО К ГЕРБИЦИДАМ, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) 201710329242.9

(72) Изобретатель:  
Гао Саиксиа, Джианг Линджиан (CN)

(32) 2017.05.11

(33) CN

(74) Представитель:  
Зуйков С.А. (RU)

(86) PCT/CN2018/086501

(87) WO 2018/205995 2018.11.15

(71) Заявитель:

**ИНСТИТУТЕ ОФ ГЕНЕТИСС  
АНД ДЕВЕЛОПМЕНТАЛ  
БИОЛОГЙ, ЧИНЕСЕ АСАДЕМЙ  
ОФ ССИЕНСЕС; ЧАЙНА  
АГРИКАЛЧЕРАЛ ЮНИВЕСИТИ  
(CN)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к области генной инженерии растений. В частности, настоящее изобретение относится к способу создания новых растений, устойчивых к гербицидам, посредством методов редактирования основания и к способу скрининга сайтов эндогенных мутаций генов, способных придавать растениям устойчивость к гербицидам. Настоящее изобретение также относится к использованию идентифицированных сайтов эндогенных мутаций генов в размножении сельскохозяйственных культур.

**A1**

**201992637**

**201992637**

**A1**

## **Создание гена, устойчивого к гербицидам, и его применение**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области генной инженерии растений. В частности, настоящее изобретение относится к способу создания новых растений, устойчивых к гербицидам, посредством методов редактирования основания и к способу скрининга эндогенных мутаций генов, способных придавать растениям устойчивость к гербицидам. Настоящее изобретение также относится к применению идентифицированных эндогенных мутаций генов при размножении сельскохозяйственных культур.

### **Предпосылки создания изобретения**

Сорняки являются основной угрозой для сельскохозяйственных культур, которые не только влияют на урожайность и качество сельскохозяйственных культур, но и распространяют вредителей и болезни сельскохозяйственных культур. Поэтому эффективная борьба с сорняками является необходимым условием для достижения высоких урожаев в сельском хозяйстве. Традиционная ручная прополка неэффективна и приводит к высоким издержкам, и поэтому ее постепенно заменили на опрыскивание химическими гербицидами сельскохозяйственных культур в период их роста. В настоящее время, в сельскохозяйственном производстве Китая, площадь и количество используемых гербицидов превысили использование пестицидов и фунгицидов.

Рабочие механизмы гербицидов можно разделить на три категории: первая категория представляет собой ингибирование ферментов, участвующих в системе фотосинтеза растений; вторая категория представляет собой ингибирование клеточного метаболизма, такого как, ингибирование синтеза аминокислот или жирных кислот; третья категория представляет собой ингибирование роста/деления клеток, включая ингибирование сборки микротрубочек или вмешательство в гормональные системы растений. Ферменты, которые ингибируют гербициды, также являются чувствительными у многих сельскохозяйственных культур; поэтому при борьбе с сорняком многие гербициды могут нанести серьезный ущерб сельскохозяйственной культуре. В этой связи, большое значение имеет повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к гербицидам.

Существует две основные стратегии повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к гербицидам. Одной из них является целенаправленная устойчивость, означающая, что ферменты, ингибируемые гербицидами, были подвернуты мутациям таким образом, что гербициды не могут эффективно ингибировать их физиологическую активность. Эта стратегия обычно включает устойчивость к имидазолинону, глифосату, сульфонилмочевине, атразину и тому подобному. Второй стратегией является детоксикация, то есть, защита физиологической функции фермента-мишени посредством быстрой деградации гербицидов. Эта стратегия обычно включает эндогенную ферментную систему P450 растений и устойчивость к глюфоzinату, 2,4-D, дикамбе и тому подобному посредством трансгенов.

В настоящее время существуют два различных технических подхода к достижению устойчивости растений к гербицидам: i) традиционное размножение сельскохозяйственных

культур, включающее химический мутагенез, радиационный мутагенез и тому подобное; и ii) трансгены, то есть, включение генов, устойчивых к гербицидам, в интересующие растения. Однако вероятность получения мутаций, устойчивых к гербицидам (особенно множественных мутаций в одном и том же гене), посредством традиционного размножения очень мала, и существует вероятность продуцирования сцепленных нежелательных мутаций. Трансгенная технология может только ввести гены, известные своей устойчивостью к гербицидам, в интересующее растение, чтобы придать ожидаемую устойчивость к гербицидам.

В данной области техники все еще существует потребность в более простых и более эффективных способах получения растений, устойчивых к гербицидам, и новых генов, устойчивых к гербицидам.

### **Описание чертежей**

**Фигура 1.** показывает скрининг устойчивых мутаций в ALS риса.

**Фигура 2.** показывает скрининг устойчивых мутаций в ACCase риса.

**Фигура 3.** показывает скрининг устойчивых мутаций в ALS пшеницы.

### **Подробное описание изобретения**

#### **I. Определение**

В настоящем изобретении, если не указано иное, научно-техническая терминология, используемая в настоящем документе, относятся к значениям, обычно понятным специалисту в данной области техники. Кроме того, вся используемая в настоящем документе терминология и экспериментальные методики, относящиеся к химии белков и нуклеотидов, молекулярной биологии, культивированию клеток и тканей, микробиологии, иммунологии, относятся к терминологии и стандартным способам, которые обычно используются в данной области техники. Например, используемая в настоящем документе стандартная технология рекомбинации ДНК и молекулярного клонирования хорошо известна специалисту в данной области техники и подробно описана в следующих ссылках: Сэмбрук, Дж., Фрич, Е.Ф. и Маниатис, Т., Молекулярное клонирование: Инструкция по проведению лабораторных работ; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Колд Спринг Харбор, 1989 (именуемый в дальнейшем «Сэмбрук и др.»). Вместе с тем, для того, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и пояснения для соответствующих терминов.

Термины «нуклеаза Cas9» и «Cas9» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо, и они относятся к РНК-направленной нуклеазе, включая белок Cas9 или его фрагменты (например, белок, содержащий активный домен расщепления ДНК Cas9 и/или gРНК-связывающий домен Cas9). Cas9 представляет собой компонент системы редактирования генома CRISPR/Cas (кластеризованные регуляторные разделенные промежутками короткие палиндромные повторы и связанная с ними система), которая нацелена и расщепляет последовательность-мишень ДНК с образованием двухцепочечных разрывов (DSB) ДНК под

управлением направляющей РНК.

В настоящем документе, термины «направляющая РНК» и «gРНК» могут использоваться взаимозаменяемо, и они обычно состоят из молекул crРНК и tracrРНК, образуя комплексы посредством частичного комплемента, при этом, crРНК содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности-мишени для гибридизации, и которая направляет комплекс CRISPR (Cas9+crРНК+tracrРНК) для специфического связывания с последовательностью-мишенью. Однако известно, что в данной области техники можно сконструировать одиночную направляющую РНК (sgРНК), которая содержит характеристики как crРНК, так и tracrРНК.

Термин «дезаминаза» относится к ферменту, который катализирует реакцию дезаминирования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дезаминаза относится к цитидиндезаминазе, которая катализирует дезаминирование цитидина или дезоксицитидина в урацил или дезоксиуридин, соответственно.

Термин «геном» в том значении, в котором он применяется к растительным клеткам, охватывает не только хромосомную ДНК, обнаруженную в ядре, но и ДНК органеллы, обнаруженную в субклеточных компонентах (например, митохондриальных, пластидных) клетки.

В контексте настоящего документа, термин «растение» включает целое растение и любого потомка, клетку, ткань или часть растения. Термин «части растения» включает любую часть(и) растения, включая, например, и без ограничения: семя (включая зрелое семя и незрелое семя); черенок растения; растительную клетку; культуру растительных клеток; орган растения (например, пыльцу, зародыши, цветки, плоды, побеги, листья, корни, стебли и эксплантаты). Растительная ткань или орган растения может представлять собой семя, протопласт, каллус или любую другую группу растительных клеток, которая организована в структурную или функциональную единицу. Растительная клетка или культура ткани может быть способна к регенерации растения, обладающего физиологическими и морфологическими характеристиками растения, из которого была получена клетка или ткань, и к регенерации растения, имеющего, по существу, тот же генотип, что и растение. И наоборот, некоторые растительные клетки не способны к регенерации для продуцирования растений. Регенерируемыми клетками в растительной клетке или в культуре ткани могут быть зародыши, протопласты, меристематические клетки, каллус, пыльца, листья, пыльники, корни, корневые кончики, кисть нитей рыльца, цветки, зерна, колосовые цветорасположения, початки, шелуха или цветоножки.

Части растения включают части растения, подходящие для сбора, и части, подходящие для размножения растений. Части растения, подходящие для размножения, включают, например, и без ограничения: семя; плод; черенок; саженец; клубень; и корневище. Часть растения, подходящая для сбора, может представлять собой любую подходящую часть растения, включая, например, и без ограничения: цветок; пыльцу; саженец; клубень; лист; стебель; плод; семя; и корень.

Растительная клетка представляет собой структурную и физиологическую единицу растения и включает протопласт клеток без клеточной стенки и растительные клетки с клеточной

стенкой. Растительная клетка может быть представлена в виде выделенной одиночной клетки или совокупности клеток (например, рыхлый каллус и культивируемая клетка) и может представлять собой часть более высокоорганизованной единицы (например, растительной ткани, органа растения и растения). Таким образом, растительная клетка может представлять собой протопласт, клетку, продуцирующую гамету, или клетку, или набор клеток, которые могут регенерироваться в целое растение. Как таковое, семя, которое содержит множество растительных клеток и способно регенерироваться в целое растение, считается «растительной клеткой» в вариантах осуществления изобретения по настоящему документу.

В контексте настоящего изобретения, термин «протопласт» относится к растительной клетке, у которой клеточная стенка полностью или частично удалена, причем ее двухслойная липидная мембрана лишена оболочки, и, таким образом, включает протопласты, у которых клеточная стенка полностью удалена, и сферопласты, у которых клеточная стенка удалена только частично, но этим не ограничивается. Как правило, протопласт представляет собой выделенную растительную клетку без клеточных стенок, которая обладает способностью к регенерации в культуру клеток или целое растение.

Термин «потомство» растения содержит любое последующее поколение растения.

Термин «генетически модифицированное растение» включает растение, которое содержит в своем геноме экзогенный полинуклеотид. Например, экзогенный полинуклеотид стабильно интегрирован в геном, в результате чего полинуклеотид передается последующим поколениям. Экзогенный полинуклеотид может быть интегрирован в геном отдельно или как часть конструкции рекомбинантной ДНК. Модифицированный ген или регуляторная последовательность экспрессии означает, что в геноме растения, упомянутая последовательность содержит, по меньшей мере, одно замещение нуклеотида, делецию или присоединение. Например, генетически модифицированное растение, полученное по настоящему изобретению, может содержать, по меньшей мере, одно замещение С на Т относительно растения дикого типа (соответствующее растение, которое не является генетически модифицированным).

Термин «экзогенный» в отношении последовательности означает последовательность, которая происходит из чужеродного вида или, если она происходит из одного и того же вида, означает последовательность, которая, по существу, модифицирована из его нативной формы, в композиции и/или геномном локусе, полученную посредством преднамеренного вмешательства человека.

Термины «полинуклеотид», «последовательность нуклеиновой кислоты», «нуклеотидная последовательность» или «фрагмент нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо для обозначения полимера РНК или ДНК, который является одно- или двухцепочечным, при необходимости, содержащим синтетические, неприродные или измененные нуклеотидные основания. Нуклеотиды (обычно встречающиеся в своей 5'-монофосфатной форме) обозначены одним буквенным обозначением следующим образом: «А» – аденилат или дезоксиаденилат (для РНК или ДНК, соответственно), «С» – цитидилат или дезоксицитидилат, «G» – гуанилат или

дезоксигуанилат, «U» – уридилат, «T» – дезокситимидилат, «R» – пурины (A или G), «Y» – пиримидины (C или T), «K» – G или T, «H» – A, C или T, «I» – инозин и «N» – любой нуклеотид.

Термины «полипептид», «пептид», «аминокислотная последовательность» и «белок» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера, построенного из аминокислотных остатков. Эти термины применяются к полимерам аминокислот, в которых, по меньшей мере, один аминокислотный остаток представляет собой искусственный химический аналог соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам аминокислот. Термины «полипептид», «пептид», «аминокислотная последовательность» и «белок» также включают модификации, включая, но не этим ограничиваясь, гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксильное и ADP-рибозильное.

В контексте настоящего документа, термин «экспрессионная конструкция» относится к вектору, подходящему для экспрессии интересующей нуклеотидной последовательности в растении, например, к рекомбинантному вектору. Термин «экспрессия» относится к продуцированию функционального продукта. Например, экспрессия нуклеотидной последовательности может относиться к транскрипции нуклеотидной последовательности (например, к транскрипции для продуцирования мРНК или функциональной РНК) и/или к трансляции РНК в предшественник белка или в зрелый белок.

Термин «экспрессионная конструкция», применяемый в настоящем изобретении, может означать фрагмент линейной нуклеиновой кислоты, кольцевую плазмиду, вирусный вектор или, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, РНК, которую можно транслировать (например, мРНК).

Термин «экспрессионная конструкция», применяемый в настоящем изобретении, может содержать интересующие регуляторные последовательности и нуклеотидные последовательности, которые получены из разных источников, или интересующие регуляторные последовательности и нуклеотидные последовательности, полученные из одного и того же источника, но расположение которых отличается от расположения, которое обычно встречается в природе.

Термины «регуляторная последовательность» или «регуляторный элемент» используются взаимозаменяемо и относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенным против хода транскрипции (5' некодирующие последовательности), внутри или по ходу транскрипции (3' некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК или стабильность, или на трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторный элемент экспрессии растения относится к нуклеотидной последовательности, способной контролировать транскрипцию, процессинг РНК или стабильность, или трансляцию интересующей нуклеотидной последовательности в растении.

Регуляторные последовательности могут включать, но этим не ограничиваются, промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны и последовательности распознавания полиаденилирования.

Термин «промотор» относится к фрагменту нуклеиновой кислоты, способному контролировать транскрипцию другого фрагмента нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, промотор представляет собой промотор, способный контролировать транскрипцию гена в растительной клетке, независимо от того, происходит ли он из растительной клетки или нет. Промотор может представлять собой конститутивный промотор или тканеспецифичный промотор, или промотор, регулируемый развитием, или индуцируемый промотор.

Термин «конститутивный промотор» относится к промотору, который обычно вызывает экспрессию генов в большинстве типов клеток в большинстве случаев. Термины «тканеспецифичный промотор» и «тканепредпочтительный промотор» используются взаимозаменяемо и относятся к промотору, который экспрессирован преимущественно, но не обязательно, исключительно в одной ткани или органе, но который также может быть экспрессирован в одной специфической клетке или одном типе клетки. Термин «промотор, регулируемый развитием» относится к промотору, активность которого устанавливается событиями развития. Термин «индуцируемый промотор» селективно экспрессирует последовательность ДНК, функционально сцепленную с ним, в последовательный или экзогенный стимул (окружающая среда, гормоны или химические сигналы и так далее).

В контексте настоящего документа, термин «функционально сцепленный» означает, что регуляторный элемент (например, но этим не ограничиваясь, промоторная последовательность, последовательность терминации транскрипции и так далее) ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты (например, с кодирующей последовательностью или открытой рамкой считывания), в результате чего транскрипция нуклеотидной последовательности контролируется и регулируется транскрипционным регуляторным элементом. Методы функционального сцепления области регуляторного элемента с молекулой нуклеиновой кислоты известны в данной области техники.

Термин «введение» молекулы нуклеиновой кислоты (например, плазида, фрагмент линейной нуклеиновой кислоты, РНК и так далее) или белка в растение означает трансформацию растительной клетки посредством нуклеиновой кислоты или белка для того, чтобы нуклеиновая кислота или белок могли функционировать в растительной клетке. В контексте настоящего документа, термин «трансформация», включает стабильную трансформацию и транзистентную трансформацию.

Термин «стабильная трансформация» относится к введению экзогенной нуклеотидной последовательности в геном растения, что приводит к генетически стабильному наследованию. После стабильной трансформации, последовательность экзогенной нуклеиновой кислоты стабильно интегрируется в геном растения и его любые последующие поколения.

Термин «транзистентная трансформация» относится к введению молекулы нуклеиновой кислоты или белка в растительную клетку с выполнением своей функции без стабильного наследования. При транзистентной трансформации, последовательность экзогенной нуклеиновой

кислоты не интегрируется в геном растения.

II. Система редактирования основания для генерирования растений, устойчивых к гербицидам

Настоящее изобретение предлагает систему для редактирования основания гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, в геноме растения, содержащую, по меньшей мере, одно из следующих (i)-(v):

- i) белок слияния, редактирующий основание, и направляющую РНК;
- ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и направляющую РНК;
- iii) белок слияния, редактирующий основание, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- v) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;

при этом, упомянутый белок слияния, редактирующий основание, содержит нуклеазный домен CRISPR, инактивированный нуклеазой (например, домен Cas9, инактивированный нуклеазой), и домен дезаминазы, причем упомянутая направляющая РНК может нацеливать упомянутый белок слияния, редактирующий основание, на последовательность-мишень в гене, относящемся к устойчивости к гербицидам, в геноме растения.

Ген, относящийся с устойчивостью к гербицидам, может представлять собой ген, кодирующий белок, обладающий важной физиологической активностью в растении, который может ингибироваться гербицидом. Мутация в таком гене, относящемся к устойчивости к гербицидам, может обратить вспять ингибирование гербицида и сохранить его физиологическую активность. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, ген, относящийся к устойчивости к гербицидам, может кодировать белок, который способен к деградации гербицидов. Увеличение экспрессии такого гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, или усиление его деградационной активности может привести к повышенной устойчивости к гербицидам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, гены, относящиеся к устойчивости к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, ген *PsbA* (устойчивый к атразину и тому подобному), ген *ALS* (ацетолактатсинтаза) (устойчивый к сульфонилмочевине, имидазолидину и тому подобному), ген *EPSPS* (5-енолпируват оксалаат-3-фосфатсинтаза) (устойчивый к глифосату), ген *ACCase* (ацетил-КоА карбоксилаза) (устойчивый к сетоксидиму и тому подобному), ген *PPO* (протопорфириногенаоксидаза) (устойчивый к карфентразон-этилу и



тому подобному) и ген HPPD (p-гидроксифенилпируватдиоксигеназа) (устойчивый к мезотриону и тому подобному), PDS (фитоендегидрогеназа) (устойчивый к дифлюфеникану и тому подобному), GS (глутаминсинтетаза) (мишень гербицидов, например, глюфосинат), DOXPS (мишень гербицидов, например, кломазон), P450 (участвующий в деградации гербицидов).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацелена на, по меньшей мере, одну из SEQ ID NO: 19-78.

В настоящем изобретении не существует конкретного ограничения для нуклеазы CRISPR, инактивированной нуклеазой, которая может быть использована в настоящем изобретении, при условии, что она сохраняет способность нацеливания на специфическую ДНК под руководством гРНК, например, могут быть использованы ДНК, полученные из Cas9, Spf1 и тому подобных. Нуклеаза Cas9, инактивированная нуклеазой, является предпочтительной.

Домен расщепления ДНК нуклеазы Cas9, как известно, содержат два субдомена: субдомен нуклеазы HNH и субдомен RuvC. Субдомены HNH расщепляют цепь, которая комплементарна гРНК, тогда как субдомен RuvC расщепляет некомплементарную цепь. Мутации в этих субдоменах могут инактивировать нуклеазу Cas9 с образованием «Cas9, инактивированной нуклеазой». Cas9, инактивированная нуклеазой, сохраняет способность связываться с ДНК, будучи направленной гРНК. Таким образом, в принципе, при слиянии с дополнительным белком, Cas9, инактивированная нуклеазой, может просто нацеливать упомянутый дополнительный белок на практически любую последовательность ДНК посредством коэкспрессии с помощью соответствующей направляющей РНК.

Цитидиндезаминаза может катализировать дезаминирование цитидина (С) в ДНК с образованием урацила (U). Если Cas9, инактивированная нуклеазой, слита с цитидиндезаминазой, то белок слияния может нацеливаться на последовательность-мишень в геноме растения в направлении направляющей РНК. Двухцепочечная ДНК не расщепляется из-за потери нуклеазной активности Cas9, в то время как домен дезаминазы в белке слияния способен преобразовывать цитидин одноцепочечной ДНК, продуцируемый в процессе образования комплекса Cas9-направляющая РНК-ДНК, в U, а затем можно достичь замещения С на Т посредством репарации ошибочного спаривания основания.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, дезаминаза представляет собой цитидиндезаминазу, например, дезаминазу семейства комплекса редактирования мРНК аполипопротеина В (АРОВЕС). В частности, описанная в настоящем документе дезаминаза представляет собой дезаминазу, которая может принимать одноцепочечную ДНК в качестве субстрата.

Примеры цитидиндезаминазы могут быть использованы в настоящем изобретении, но не ограничиваются дезаминазой АРОВЕС1, цитидиндезаминазой, индуцируемой активацией (AID), АРОВЕС3G или CDA1.

В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, цитидиндезаминаза содержит аминокислотную последовательность, показанную в положениях 9-

235 SEQ ID NO: 10 или 11.

Cas9, инактивированная нуклеазой, по настоящему изобретению может быть получена из Cas9 различных видов, например, полученных из Cas9 *S. pyogenes* (SpCas9, аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 5). Мутации как в субдомене нуклеазы HNH, так и в субдомене RuvC SpCas9 (включая, например, мутации D10A и H840A) инактивируют нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*, что приводит к гибели нуклеазы Cas9 (dCas9). Инактивация одного из субдоменов посредством мутации позволяет Cas9 приобрести никазную активность, то есть, приводит к никазу Cas9 (nCas9), например, nCas9 только с мутацией D10A.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Cas9, инактивированная нуклеазой, по настоящему изобретению содержит замещения аминокислоты D10A и/или H840A относительно Cas9 дикого типа.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Cas9, инактивированная нуклеазой, по настоящему изобретению имеет никазную активность. Вне зависимости от какой-либо теории, считается, что для репарации ошибочного спаривания эукариот используются разрывы на цепочке ДНК для удаления и репарации ошибочного спаривания основания в цепочке ДНК. Ошибочное спаривание U: G, образованное цитидиндезаминазой, может быть репарировано в C: G. Посредством введения разрыва на цепи, содержащей неотредактированный G, можно будет, в преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения, репарировать ошибочное спаривание U: G в желаемое U:A или T:A. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, Cas9, инактивированная нуклеазой, представляет собой никазу Cas9, которая сохраняет активность расщепления субдомена HNH Cas9, тогда как активность расщепления субдомена RuvC инактивируется. Например, Cas9, инактивированная нуклеазой, содержит замещение аминокислоты D10A относительно Cas9 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, Cas9, инактивированная нуклеазой, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, Cas9, инактивированная нуклеазой, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, домен дезаминазы слит с N-концом домена Cas9, инактивированного нуклеазой. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, домен дезаминазы слит с C-концом домена Cas9, инактивированного нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, домен дезаминазы и домен Cas9, инактивированный нуклеазой, слиты посредством линкера. Линкер может представлять собой нефункциональную аминокислотную последовательность, не имеющую вторичной или более высокой структуры, которая составляет от 1 до 50 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 20-25, 25-50) или более аминокислот в длину. Например, линкер может быть гибким линкером, таким как, GGGGS, GS, GAP, (GGGGS) x3, GGS,

(GGS) x7 и тому подобное. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, линкер представляет собой линкер XTEN, как показано в SEQ ID NO: 8.

В клетках, урацил-ДНК-гликозилаза катализирует удаление U из ДНК и инициирует эксцизионную репарацию основания ДНК (BER), которая приводит к репарации U: G в C: G. Таким образом, без какого-либо теоретического ограничения, включение ингибитора урацил-ДНК-гликозилазы в белок слияния, редактирующий основание, по настоящему изобретению, или система по настоящему изобретению будет способна повысить эффективность редактирования основания.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, дополнительно содержит ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы (UGI). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, по настоящему изобретению дополнительно содержит последовательность ядерной локализации (NLS). В целом, по меньшей мере, одна NLS в белке слияния, редактирующем основание, должна иметь достаточную мощность, чтобы содействовать накоплению белка слияния, редактирующего основание, в ядре растительной клетки в количестве, достаточном для функции редактирования основания. В целом, мощность активности ядерной локализации определяется по количеству и положению последовательностей NLS и, по меньшей мере, по одной специфической NLS, используемой в белке слияния, редактирующем основание, или в комбинации таких белков.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательности NLS белка слияния, редактирующего основание, по настоящему изобретению могут быть расположены на N-конце и/или на C-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит, примерно, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательностей NLS. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательностей NLS на или вблизи N-конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательностей NLS на или вблизи C-конца. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит комбинацию последовательностей, например, по меньшей мере, одну NLS на N-конце и, по меньшей мере, одну NLS на C-конце. Если имеется более одной NLS, то каждая NLS может быть выбрана независимо от других NLS. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит две NLS, например, две NLS расположены на N-конце и C-конце, соответственно.

В целом, NLS состоит из, по меньшей мере, одной короткой последовательности

положительно заряженного лизина или аргинина, экспонированных на поверхности белка, но в данной области техники также известны и другие типы NLS. Неограничивающие примеры последовательностей NLS включают KKRKV (нуклеотидная последовательность 5'--AAGAAGAGAAAGGTC-3'), PKKKRKV (нуклеотидная последовательность 5'-CCCAAGAAGAAGAGGAAGGTG-3' или CCAAAGAAGAAGAGGAAGGTT) или SGGSPKKRKV (нуклеотидная последовательность 5'-TCGGGGGGGAGCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTG-3').

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, N-конец белка слияния, редактирующего основание, содержит NLS с аминокислотной последовательностью, показанной посредством PKKKRKV. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, C-конец белка слияния, редактирующего основание, содержит NLS с аминокислотной последовательностью, показанной посредством SGGSPKKRKV.

Кроме того, белок слияния, редактирующий основание, по настоящему изобретению также может включать и другие последовательности локализации, например, последовательности цитоплазматической локализации, последовательности хлоропластной локализации, последовательности митохондриальной локализации и тому подобное, в зависимости от расположения ДНК, подлежащей редактированию.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белок слияния, редактирующий основание, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11.

Чтобы получить эффективную экспрессию в растениях, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния, редактирующий основание, является кодон-оптимизированной для растения, основание которого подлежит редактированию.

Кодон-оптимизация относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиления экспрессии в интересующих клетках-хозяевах путем замены, по меньшей мере, одного кодона (например, примерно, или более 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности на кодоны, которые чаще или чаще всего используются в генах этой клетки-хозяина при сохранении нативной аминокислотной последовательности. Различные виды проявляют конкретную погрешность при измерении для определенных кодонов конкретной аминокислоты. Погрешность при измерении в кодонах (различия в частоте использования кодонов между организмами) зачастую соотносится с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая считается, в свою очередь, зависимой, помимо прочего, от свойств транслируемых кодонов и наличия молекул конкретной транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных транспортных РНК в клетке обычно является отражением кодонов, используемых чаще всего в синтезе пептидов. Соответственно, гены могут быть адаптированы к оптимальной экспрессии генов в данном организме, исходя из оптимизации кодона. Таблицы частоты использования кодонов легкодоступны, например, в «Базе данных частоты использования

кодонов» по адресу [www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/), и эти таблицы могут быть адаптированы множеством способов. См. Накамура, Ю., и др. «Таблица использования кодонов, составленная на основе международных баз данных последовательностей ДНК: по состоянию на 2000 год» *Nucl. Acids Res.* 28:292 (2000).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния, редактирующий основание, представлена в SEQ ID NO: 12 или 13.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК представляет собой одиночную направляющую РНК (sgРНК). Способы конструирования подходящих sgРНК в соответствии с заданной последовательностью-мишенью известны в данной области техники. См., например, Ван, Ю. и др. Одновременное редактирование трех гомоаллелей в гексаплоидной пшенице обыкновенной придает передающуюся по наследству устойчивость к мучнистой росе. *Nat. Biotechnol.* 32, 947-951 (2014); Шань, К. и др. Целенаправленная модификация генома сельскохозяйственных растений с использованием системы CRISPR-Cas. *Nat. Biotechnol.* 31, 686-688 (2013); Лян, З. и др. Целенаправленный мутагенез у *Zea mays* с использованием TALEN и системы CRISPR/Cas. *J. Genet Genomics.* 41, 63–68 (2014).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния, редактирующий основание, и/или нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК, функционально сцеплена с регуляторным элементом экспрессии растения, например, с промотором.

Примеры промоторов, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но этим не ограничиваются, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (Оделл и др. (1985) *Nature* 313: 810-812), промотор Ubi-1 кукурузы, промотор U6 пшеницы, промотор U3 риса, промотор U3 кукурузы, актиновый промотор риса, промотор TrpPro5 (Заявка на патент США № 10/377,318; поданная 16 марта 2005 года), промотор рЕМU (Ласт и др. *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588), промотор MAS (Велтен и др. (1984) *EMBO J.* 3: 2723-2730), промотор гистона H3 кукурузы (Лепетит и др. *Mol. Gen. Genet.* 231: 276-285 и Атанассова и др. (1992) *Plant J.* 2 (3): 291-300) и промоторы ALS3 *Brassica napus* (Заявка PCT WO 97/41228). Промоторы, которые можно использовать в настоящем изобретении, также включают обычно используемые тканеспецифичные промоторы, как описано в работе Мур и др. (2006) *Plant J.* 45 (4): 651-683.

### III. Способ продуцирования растений, устойчивых к гербицидам, путем редактирования основания

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербициду, содержащий введение в растение системы по настоящему изобретению для редактирования основания гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, в геноме растения, в результате чего направляющая РНК нацеливает белок слияния, редактирующий основание, на последовательность-мишень гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, в

растении, что приводит к, по меньшей мере, одному нуклеотидному замещению в последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно содержит этап скрининга растений на устойчивость к гербицидам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ген, относящийся к устойчивости к гербицидам, кодирует белок, относящийся к устойчивости к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белки, относящиеся к устойчивости к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, PsbA (устойчивый к атразину и тому подобному), ALS (устойчивый к сульфонилмочевине, имидазолидинону и тому подобному), EPSPS (устойчивый к глифосату), ACCase (устойчивый к сетоксидиму и тому подобному), PPO (устойчивый к карфентразон-этилу и тому подобному) и HPPD (устойчивый к мезотриону и тому подобному), PDS (устойчивый к дифлюфеникану и тому подобному), GS (мишень гербицидов, например, глюфосинат), DOXPS (мишень гербицидов, например, кломазон), P450 (участвующий в деградации гербицидов).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение представляет собой замещение С на Т. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение представляет собой замещение С на А или С на G. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение находится в некодирующей области в гене, относящемся к устойчивости к гербицидам, в таких как, области регуляции экспрессии. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение приводит к аминокислотному замещению в белке, относящемся к устойчивости к гербицидам, кодируемом геном. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение и/или аминокислотное замещение придают растению устойчивость к гербицидам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, нуклеотидное замещение и/или аминокислотное замещение, которые придают растению устойчивость к гербицидам, могут представлять собой любое известное замещение, которое придает растению устойчивость к гербицидам в гене, относящемся к устойчивости к гербицидам. Посредством способа по настоящему изобретению, одиночные мутации, двойные мутации или множественные мутации, способные придавать устойчивость к гербицидам, могут быть созданы *in situ* в растениях без необходимости в трансгене. Мутации могут быть известны в данной области техники, или их можно вновь идентифицировать посредством способов по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий модификацию гена ALS в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в ALS, которая придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из A122T, P197S, P197L, P197F, R198C, D204N, A205T, D204N+A205T, G654K, G655D, G655S,

G655N, G654K+G655D, G654K+G655S, G654K+G655N, G659N, P197S, P197L, P197F, D204N, A205T, D204N+A205T, G654D, G654S, G654N, G655D, G655S, G655N, G654D+G655D, G654D+G655S, G654D+G655N, G654S+G655D, G654S+G655S, G654S+G655N, G654N+G655D, G654N+G655S, G654N+G655N, A122T или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность ALS в *Arabidopsis thaliana*, учетный номер в Genbank: NP\_190425). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из P197A, P197F, P197S, P197Y, P197F+R198C, G654E+G655S, G654K+G655S, G654E+G659N, P197F+G654E+G655S или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность ALS в *Arabidopsis thaliana*, учетный номер в Genbank: NP\_190425).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), выбранную из группы, состоящей из A122, P197, R198, D204, A205, G654, G655, G659 или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность ALS в *Arabidopsis thaliana*, учетный номер в Genbank: NP\_190425).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ALS представляет собой ALS риса, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ALS представляет собой ALS пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 17 (частичная последовательность, Genbank ID: AAO53548.1).

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий модификацию гена *PsbA* в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в *PsbA*, которая придает растению устойчивость к гербицидам.

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий модификацию гена *EPSPS* в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в *EPSPS*, которая придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из группы, состоящей из T102I, A103V, T102I+A103V, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность *EPSPS* генома пшеницы A, учетный номер в Genbank: ALK27163).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), выбранную из группы, состоящей из T102 и/или A103, при этом, положения аминокислот относятся к SEQ ID NO:4.

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к

гербицидам, содержащий модификацию гена ACCase в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в ACCase, которая придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из S1768F, R1793K, A1794T, R1793K+A1794T, R1825H, D1827N, R1825H+D1827N, L1815F, A1816V, R1817Stop, L1815F+R1817Stop, A1816V+R1817Stop, L1815F+A1816V, L1815F, A1816V,+R1817Stop, A1837V, G1854D, G1855D, G1855S, G1854N, G1854D+G1855D, G1854D+G1855S, G1854D+G1855N, D1971N, D1972N, D1971N+D1972N, G1983D, P1993S, P1993L, P1993F, R1994C, P1993S+R1994C, P1993L+R1994C, P1993F+R1994C, S2003F, A2004V, T2005I, S2003F+A2004V, S2003F+T2005I, A2004V+T2005I, T2007I, A2008V, T2007I+A2008V, R2028K, W2027C, G2029D, G2029S, G2029N, R2028K+G2029D, R2028K+G2029S, R2028K+G2029N, T2047I, R2070Q, G2071R, R2070Q+G2071R, A2090T, E2091K, A2090T+E2091K, A2090V, E2106K, S2119N, R2220Q, S2119N+R2220Q, A1813V, R1793K, A1794T, R1793K+A1794T, E1796K, E1797K, E1796K+E1797K, T1800M, L1801F, T1800M+L1801F, A1813V, G1854D, G1854S, G1854N, G1855D, G1855S, G1855N, G1854D+G1855D, G1854D+G1855S, G1854D+G1855N, G1854S+G1855D, G1854S+G1855S, G1854S+G1855N, G1854N+G1855D, G1854N+G1855S, G1854N+G1855N, S1849F, H1850Y, S1849F+H1850Y, D1874N, D1875N, D1874N+D1875N, R2028K, G2029D, G2029S, G2029N, R2028K+G2029D, R2028K+G2029S, R2028K+G2029N, L2024F, T2047I, R2070C, A2090V, G1983D, E1989K, R1990Q, E1989K+R1990Q, P1993S, P1993L, P1993F, R1994C, P1993S+R1994C, P1993L+R1994C, P1993F+R1994C, T2007I, A2008V, T2007I+A2008V, S2003L, A2004V, T2005I, S2003L+A2004V, S2003L+T2005I, A2004V+T2005I, S2003L, A2004V+T2005I, L2099F, E2106K, R2220K, G2119D, R2220K+G2119D, или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность ACCase *Alopecurus myosuroides*, учетный номер в Genbank: CAC84161.1). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из W2027C, W2027C+R2028K, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1 (аминокислотная последовательность ACCase *Alopecurus myosuroides*, учетный номер в Genbank: CAC84161.1).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), выбранную из группы, состоящей из S1768, R1793, A1794, R1825, D1827, L1815, A1816, R1817, A1837, G1854, G1855, D1971, D1972, G1983, P1993, R1994, S2003, A2004, T2005, T2007, A2008, R2028, G2029, T2047, R2070, G2071, A2090, E2091, E2106, S2119, R2220, A1813, E1796, E1797, T1800, L1801, S1849, H1850, D1874, D1875, L2024, E1989, R1990, L2099 или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ACCase представляет собой ACCase риса, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 14 (Genbank ID: B9FK36). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ACCase представляет



собой ACCase пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 15 (Genbank ID: ACD46684.1).

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий модификацию гена PPO в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в PPO, которая придает растению устойчивость к гербицидам.

Настоящее изобретение предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий модификацию гена HPPD в растении посредством способа редактирования основания по настоящему изобретению, что приводит к, по меньшей мере, одной аминокислотной мутации в HPPD, которая придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из P277S, P277L, V364M, C413Y, G414D, G414S, G414N, G415E, G415R, G415K, G414D+G415E, G414D+G415R, G414D+G415K, G414S+G415E, G414S+G415R, G414S+G415K, G414N+G415E, G414N+G415R, G414N+G415K, C413Y +G415E, C413Y +G415R, C413Y +G415K, C413Y +G414D, C413Y +G414S, C413Y +G414N, C413Y+G414D+G415E, C413Y+ G414D+G415R, C413Y+ G414D+G415K, C413Y+ G414S+G415E, C413Y+ G414S+G415R, C413Y+ G414S+G415K, C413Y+ G414N+G415E, C413Y+ G414N+G415R, C413Y+ G414N+G415K, P277S, P277L, V366I, C413Y, G414D, G414S, G414N, G415E, G415R, G415K, G414D+G415E, G414D+G415R, G414D+G415K, G414S+G415E, G414S+G415R, G414S+G415K, G414N+G415E, G414N+G415R, G414N+G415K, C413Y +G415E, C413Y+G415R, C413Y+G415K, C413Y+G414D, C413Y+G414S, C413Y+G414N, C413Y+G414D+G415E, C413Y+G414D+G415R, C413Y+G414D+G415K, C413Y+G414S+G415E, C413Y+G414S+G415R, C413Y+G414S+G415K, C413Y+G414N+G415E, C413Y+G414N+G415R, C413Y+G414N+G415K или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID No:3 (аминокислотная последовательность HPPD риса, учетный номер в Genbank: XP\_015626163).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), выбранную из группы, состоящей из P277, V364, C413, G414, G415, V366 или из любой их комбинации, при этом, положения аминокислот относятся к SEQ ID NO: 3.

Конструкция последовательности-мишени, которую может распознать и на которую может нацеливаться комплекс Cas9 и направляющей РНК, находится в пределах уровня технических навыков специалиста обычной квалификации в данной области техники. В целом, последовательность-мишень представляет собой последовательность, которая комплементарна лидерной последовательности из, примерно, 20 нуклеотидов, содержащихся в направляющей РНК, и 3'-конец которой непосредственно примыкает к мотиву, примыкающему к протоспейсеру (РАМ) NGG.

Например, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения,

последовательность-мишень имеет структуру: 5'-N<sub>X</sub>-NGG-3', при этом, N выбран независимо из A, G, C и T; X представляет собой целое число  $14 \leq X \leq 30$ ; N<sub>X</sub> представляет собой X непрерывных нуклеотидов, а NGG представляет собой последовательность PAM. В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения, X равно 20.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, направляющая РНК нацелена на, по меньшей мере, одну из SEQ ID NO: 19-78.

Система редактирования основания по настоящему изобретению имеет широкое окно дезаминирования в растениях, например, окно дезаминирования длиной в 7 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению, по меньшей мере, одно основание С в положениях с 3 по 9 последовательности-мишени замещено на Т. Например, если таковые присутствуют, то любое одно, два, три, четыре, пять, шесть или семь оснований С в положениях с 3 по 9 в последовательности-мишени могут быть заменены на Т. Например, если в последовательности-мишени в положениях с 3 по 9 имеется четыре основания С, то любое одно, два, три, четыре основания С могут быть заменены на Т. Основания С могут представлять собой непрерывные нуклеотиды, или они могут быть разделены другими нуклеотидами. Таким образом, если в последовательности-мишени имеется множество оснований С, то с помощью способа по настоящему изобретению можно получить различные комбинации мутаций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способы дополнительно содержат скрининг растений, имеющих желаемые нуклеотидные замещения. Нуклеотидные замещения в растениях могут быть определены посредством T7EI, PCR/RE или способов секвенирования, см., например, Шань, К., Ван, Ю., Ли, Дж. и Гао, Ц. Редактирование генома у риса и пшеницы с использованием системы CRISPR/Cas. *Nat. Protoc.* 9, 2395-2410 (2014).

В способах по настоящему изобретению, система редактирования основания может быть введена в растения различными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Способы, которые можно использовать для введения в растения системы редактирования основания по настоящему изобретению, включают, но этим не ограничиваются, бомбардировку частицами, PEG-опосредованную трансформацию протопласта, опосредованную *Agrobacterium* трансформацию, опосредованную вирусом трансформацию растения, метод пылевой трубки и метод инъекции завязи. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система редактирования основания вводится в растения посредством транзientной трансформации.

В способах по настоящему изобретению, модификация последовательности-мишени может быть осуществлена просто посредством введения или продуцирования белка слияния, редактирующего основание, и направляющей РНК в растительные клетки, и модификация может стабильно наследоваться без необходимости стабильной трансформации растений посредством системы редактирования основания. Это позволяет избежать потенциальных нецелевых эффектов стабильной системы редактирования основания, а также позволяет избежать интеграции экзогенных нуклеотидных последовательностей в геном растения, что приводит, таким образом, к повышению биобезопасности.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, введение выполняют в отсутствие селективного давления, что позволяет избежать интеграции экзогенных нуклеотидных последовательностей в геном растения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, введение содержит трансформацию системы редактирования основания по настоящему изобретению в выделенные растительные клетки или ткани, и затем регенерацию трансформированных растительных клеток или тканей в интактное растение. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, регенерацию выполняют в отсутствие селективного давления, то есть, во время культивирования ткани селективный агент не используется против селективного гена, переносимого на экспрессионный вектор. Без использования селективного агента можно повысить эффективность регенерации растения, чтобы получить модифицированное растение, которое не содержит экзогенных нуклеотидных последовательностей.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, система редактирования основания по настоящему изобретению может быть трансформирована в конкретный сайт на интактном растении, например, на лист, кончик побега, пыльцевую трубку, колосовое цветорасположение молодого растения или гипокотиль. Это особенно подходит для трансформации растений, которые трудно регенерировать посредством культивирования ткани.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, белки, экспрессируемые *in vitro*, и/или молекулы РНК, транскрибируемые *in vitro*, непосредственно трансформируются в растение. Белки и/или молекулы РНК способны достигать редактирования основания в растительных клетках и впоследствии подвергаются деградации клетками, чтобы избежать интеграции экзогенных нуклеотидных последовательностей в геном растения.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растение, устойчивое к гербицидам, является нетрансгенным.

Растения, которые могут быть использованы в способах по настоящему изобретению, включает однодольные и двудольные растения. Например, растение может представлять собой сельскохозяйственную культуру, например, пшеницу, рис, кукурузу, сою, подсолнечник, сорго, канолу, люцерну, хлопок, ячмень, просо, сахарный тростник, помидор, табак, маниок или картофель. Растение также может представлять собой овощную культуру, включая, но этим не ограничиваясь, капусту, браунколь, огурец, помидор. Растение также может представлять собой цветочную культуру, включая, но этим не ограничиваясь, гвоздики, пион, розы и тому подобное. Растение также может представлять собой плодовую культуру, включая, но этим не ограничиваясь, арбуз, дыню, клубнику, чернику, виноград, яблоко, цитрусовые, персик. Растение также может представлять собой лекарственное растение китайской медицины, включая, но этим не ограничиваясь, *Radix isatidis*, лакричник, женьшень и *Saposhnikovia divaricata*. Растение также может представлять собой *Arabidopsis thaliana*.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно содержит получение потомства растения, устойчивого к гербицидам.

В другом аспекте, настоящее изобретение также предлагает растение, устойчивое к гербицидам, или его потомство, или его части, при этом, растение получают вышеупомянутым способом по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растение, устойчивое к гербицидам, является нетрансгенным.

В другом аспекте, настоящее изобретение также предлагает способ размножения растения, содержащий скрещивание первого растения, устойчивого к гербицидам, полученного вышеописанным способом по настоящему изобретению, со вторым растением, не имеющим устойчивости к гербицидам, и, таким образом, вводящий устойчивость к гербицидам во второе растение.

Настоящее изобретение также охватывает растение, устойчивое к гербицидам, или их потомство, полученное способами по настоящему изобретению.

#### IV. Идентификация вариантов белков, относящихся к устойчивости к гербицидам

Посредством способа по настоящему изобретению можно легко получить большое количество мутантов генов, относящихся к устойчивости к гербицидам, путем целенаправленной модификации оснований генов, относящихся к устойчивости к гербицидам, и затем путем скрининга на устойчивость можно идентифицировать новые мутации устойчивости к гербицидам.

Таким образом, настоящее изобретение также предлагает способ идентификации варианта белка, относящегося к устойчивости к гербицидам, который способен придавать растению устойчивость к гербицидам, причем упомянутый способ содержит:

i) генерирование растения, устойчивого к гербицидам, посредством способа, описанного в Разделе III выше; и

ii) определение последовательности гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, и/или кодируемого белка, относящегося к устойчивости к гербицидам, в полученном растении, устойчивом к гербицидам, что позволяет идентифицировать последовательность варианта.

V. Варианты белков, относящихся к устойчивости к гербицидам, нуклеиновые кислоты, экспрессионные конструкции и их применение.

Настоящее изобретение также предлагает вариант белка, относящегося к устойчивости к гербицидам, который идентифицирован посредством способа в соответствии с приведенным выше Разделом IV настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также предлагает вариант ACCase растения, по сравнению с ACCase дикого типа, причем упомянутый вариант ACCase содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, выбранном из 1768, 1793, 1796, 1797, 1794, 1800, 1801, 1813, 1813, 1815, 1825, 1827, 1815, 1816, 1817, 1837, 1838, 1849, 1850, 1854, 1855, 1874, 1875, 1971, 1872, 1983, 1989, 1990, 1993, 1994, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008, 2024, 2027, 2028, 2029, 2047, 2070, 2071, 2090, 2091, 2090, 2106, 2099, 2106, 2119, 2220, при этом, аминокислотное положение относится к SEQ ID NO:1, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам. В

некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из S1768F, R1793K, A1794T, R1793K+A1794T, R1825H, D1827N, R1825H+D1827N, L1815F, A1816V, R1817Stop, L1815F+R1817Stop, A1816V+R1817Stop, L1815F+A1816V, L1815F, A1816V,+R1817Stop, A1837V, G1854D, G1855D, G1855S, G1854N, G1854D+G1855D, G1854D+G1855S, G1854D+G1855N, D1971N, D1972N, D1971N+D1972N, G1983D, P1993S, P1993L, P1993F, R1994C, P1993S+R1994C, P1993L+R1994C, P1993F+R1994C, S2003F, A2004V, T2005I, S2003F+A2004V, S2003F+T2005I, A2004V+T2005I, T2007I, A2008V, T2007I+A2008V, R2028K, G2029D, G2029S, G2029N, R2028K+G2029D, R2028K+G2029S, R2028K+G2029N, T2047I, R2070Q, G2071R, R2070Q+G2071R, A2090T, E2091K, A2090T+E2091K, A2090V, E2106K, S2119N, R2220Q, S2119N+R2220Q, A1813V, R1793K, A1794T, R1793K+A1794T, E1796K, E1797K, E1796K+E1797K, T1800M, L1801F, T1800M+L1801F, A1813V, G1854D, G1854S, G1854N, G1855D, G1855S, G1855N, G1854D+G1855D, G1854D+G1855S, G1854D+G1855N, G1854S+G1855D, G1854S+G1855S, G1854S+G1855N, G1854N+G1855D, G1854N+G1855S, G1854N+G1855N, S1849F, H1850Y, S1849F+H1850Y, D1874N, D1875N, D1874N+D1875N, W2027C, R2028K, W2027C+R2028K, G2029D, G2029S, G2029N, R2028K+G2029D, R2028K+G2029S, R2028K+G2029N, L2024F, T2047I, R2070C, A2090V, G1983D, E1989K, R1990Q, E1989K+R1990Q, P1993S, P1993L, P1993F, R1994C, P1993S+R1994C, P1993L+R1994C, P1993F+R1994C, T2007I, A2008V, T2007I+A2008V, S2003L, A2004V, T2005I, S2003L+A2004V, S2003L+T2005I, A2004V+T2005I, S2003L, A2004V+T2005I, L2099F, E2106K, R2220K, G2119D, R2220K+G2119D, или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из W2027C, W2027C+R2028K, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ACCase представляет собой ACCase риса, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 14 (Genbank ID: B9FK36). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ACCase представляет собой ACCase пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 15 (Genbank ID: ACD46684.1).

Экспрессия такого варианта позволяет растениям (таким как, рис, кукуруза, пшеница и другие однодольные растения) получить одиночную устойчивость (устойчивость к одному гербициду) или кросс-устойчивость (устойчивость к, по меньшей мере, двум гербицидам) к циклогексеноновым гербицидам (таким как, клетодим), к гербицидам на основе арилоксифеноксипропионовых кислот (таким как, галоксифоп-Р-метил), к гербицидам на основе фенилпиразолинов (таких как, оксазолин) и к другим гербицидам-ингибиторам ACCase. ACCase является ключевым ферментом в процессе синтеза жирных кислот в растениях, и ингибирование его активности в конечном итоге приводит к гибели растений из-за дефицита жирных кислот.

Настоящее изобретение также предлагает вариант ALS растения, по сравнению с ALS дикого типа, причем упомянутый вариант ALS содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, выбранном из 122, 197, 204, 205, 653, 654, 655, 659, при этом,

аминокислотное положение относится к SEQ ID NO:2, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из A122T, P197A, P197Y, P197S, P197L, P197F, D204N, A205T, D204N+A205T, E654K, G655D, G655S, G655N, E654K+G655D, E654K+G655S, E654K+G655N, G659N, P197S, P197L, P197F, D204N, A205T, D204N+A205T, G654D, G654S, G654N, G655D, G655S, G655N, G654D+G655D, G654D+G655S, G654D+G655N, G654S+G655D, G654S+G655S, G654S+G655N, G654N+G655D, G654N+G655S, G654N+G655N, A122T или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:2. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из P197A, P197F, P197S, P197Y, P197F+R198C, G654E+G655S, G654K+G655S, G654E+G659N, P197F+G654E+G655S или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ALS представляет собой ALS риса, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, ALS представляет собой ALS пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO: 17 (частичная последовательность, Genbank ID: AAO53548.1).

Экспрессия такого варианта может позволить растениям (например, однодольным растениям, таким как, рис, кукуруза, пшеница и тому подобное, и двудольным растениям, таким как, соя, хлопок, канола и подсолнечник) иметь более высокий уровень устойчивости к гербицидам в отношении, по меньшей мере, одного из следующих гербицидов: имидазолиновые гербициды (такие как, имазамет), сульфонилмочевинные гербициды (такие как, никосульфурон), триазолиновые гербициды (такие как, флукарбазон-натрий), триазолопиримидиновые гербициды (например, пеноксиулам), пиримидин-салицилатные гербициды (например, биспирибак натрия). ALS является ключевым ферментом в синтезе аминокислот с разветвленной цепью в растениях, и ингибирование его активности в конечном итоге приводит к гибели растения из-за недостатка аминокислот с разветвленной цепью.

Настоящее изобретение также предлагает вариант HPPD растения, по сравнению с HPPD дикого типа, причем упомянутый вариант HPPD содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, выбранном из 277, 364, 366, 413, 414, 415, при этом, аминокислотное положение относится к SEQ ID NO:3, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из P277S, P277L, V364M, C413Y, G414D, G414S, G414N, G415E, G415R, G415K, G414D+G415E, G414D+G415R, G414D+G415K, G414S+G415E, G414S+G415R, G414S+G415K, G414N+G415E, G414N+G415R, G414N+G415K, C413Y +G415E, C413Y +G415R, C413Y +G415K, C413Y +G414D, C413Y +G414S, C413Y +G414N, C413Y+G414D+G415E, C413Y+ G414D+G415R, C413Y+ G414D+G415K, C413Y+ G414S+G415E, C413Y+ G414S+G415R, C413Y+ G414S+G415K, C413Y+ G414N+G415E, C413Y+ G414N+G415R,

C413Y+ G414N+G415K, P277S, P277L, V366I, C413Y, G414D, G414S, G414N, G415E, G415R, G415K, G414D+G415E, G414D+G415R, G414D+G415K, G414S+G415E, G414S+G415R, G414S+G415K, G414N+G415E, G414N+G415R, G414N+G415K, C413Y +G415E, C413Y+G415R, C413Y+G415K, C413Y+G414D, C413Y+G414S, C413Y+G414N, C413Y+G414D+G415E, C413Y+G414D+G415R, C413Y+G414D+G415K, C413Y+G414S+G415E, C413Y+G414S+G415R, C413Y+G414S+G415K, C413Y+G414N+G415E, C413Y+G414N+G415R, C413Y+G414N+G415K или из любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, HPPD представляет собой HPPD риса, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO:3. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, HPPD представляет собой HPPD пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO:18.

Экспрессия такого варианта может позволить растениям (например, однодольным растениям, таким как рис, кукуруза, пшеница и тому подобное, двудольным растениям, таким как, соя, хлопок, рапсовое семя, подсолнечник и тому подобное) получить более высокий уровень устойчивости к, по меньшей мере, одному гербициду-ингибитору HPPD (например, мезотрион, топразамезон). HPPD является ключевым ферментом в процессе синтеза хлорофилла у растений. Ингибирование активности HPPD в конечном итоге приводит к хлорозу и гибели растений. Ингибирование активности HPPD в конечном итоге приводит к хлорозу и гибели растений.

Настоящее изобретение также предлагает вариант EPSPS растения, по сравнению с EPSPS дикого типа, причем упомянутый EPSPS содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, выбранном из 102 и 103, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 4, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербициду. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, аминокислотная мутация выбрана из группы, состоящей из T102I, A103V, T102I+A103V. Фермент EPSPS является ключевым ферментом в синтезе ароматических аминокислот в растениях, и ингибирование его активности в конечном итоге приводит к гибели растения из-за недостатка ароматических аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, EPSPS представляет собой EPSPS пшеницы, и ее последовательность дикого типа показана в SEQ ID NO:4.

Экспрессия такого варианта может значительно повысить устойчивость к глифосату у растений (например, однодольных растений, таких как, рис, кукуруза, пшеница и тому подобное, и двудольных растений, таких как, соя, хлопок, рапсовое семя и подсолнечник).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, его варианты также содержат другие аминокислотные мутации, известные в данной области техники, которые способны придавать растению устойчивость к гербицидам.

Настоящее изобретение также предлагает выделенную нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также предлагает кассету экспрессии, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант настоящего изобретения, функционально сцепленный с

регуляторной последовательностью.

Настоящее изобретение также предлагает экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант настоящего изобретения, причем упомянутая нуклеотидная последовательность функционально сцеплена с регуляторной последовательностью.

Настоящее изобретение также предлагает применение вариантов, выделенных нуклеиновых кислот, кассет экспрессии и экспрессионных конструкций настоящего изобретения для генерирования растений, устойчивых к гербицидам.

Настоящее изобретение также предлагает способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий введение в растение выделенной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, кассеты экспрессии по настоящему изобретению и/или экспрессионной конструкции по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предлагает растение, устойчивое к гербицидам, которое содержит или трансформируется посредством кассеты экспрессии по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также охватывает потомство растений, устойчивых к гербицидам.

Растения включают однодольные и двудольные растения. Например, растение может представлять собой сельскохозяйственную культуру, например, пшеницу, рис, кукурузу, сою, подсолнечник, сорго, канолу, люцерну, хлопок, ячмень, просо, сахарный тростник, помидор, табак, маниок или картофель. Растение также может представлять собой овощную культуру, включая, но этим не ограничиваясь, капусту, браунколь, огурец, помидор. Растение также может представлять собой цветочную культуру, включая, но этим не ограничиваясь, гвоздики, пион, розы и тому подобное. Растение также может представлять собой плодую культуру, включая, но этим не ограничиваясь, арбуз, дыню, клубнику, чернику, виноград, яблоко, цитрусовые, персик. Растение также может представлять собой лекарственное растение китайской медицины, включая, но этим не ограничиваясь, *Radix isatidis*, лакричник, женьшень и *Saposhnikovia divaricata*. Растение также может представлять собой *Arabidopsis thaliana*.

## **Пример**

### **Пример 1. Конструкция векторов редактирования основания**

В этом примере были сконструированы векторы редактирования основания для генов, относящихся к устойчивости к гербицидам, таких как, ALS, ACCase, EPSPS и HPPD, для различных сельскохозяйственных культур.

Рис:

В соответствии с работой Юань Цзун (Цзун, Ю. и др. Точное редактирование основания в рисе, пшенице и кукурузе посредством слияния Cas9 и цитидиндезаминазы. *Nat. Biotechnol.* 2017, идентификатор цифрового объекта (doi): 10.1038/nbt.3811), были сконструированы векторы редактирования основания, нацеленные на гены OsALS, OsACCase и OsHPPD, с использованием конструкции рН-пCas9-РВЕ. Среди них – 4 одиночных сайта-мишени в OsALS (R1-R4), 3 двойных



сайта-мишени гена OsALS (R25-R27) и 20 одиночных сайтов-мишеней гена OsACCcase (R5-R24), 4 одиночных сайта-мишени OsHPPD (R28-R30). Последовательности-мишени sgPHK, участвующие в эксперименте, показаны в Таблице 1. Мутации потенциальной устойчивости показаны в Таблице 3.

Таблица 1. Ген ALS риса и последовательности-мишени sgPHK.

	Ген-мишень	Последовательность-мишень	SEQ ID NO:
R1	OsALS	<u>CCTACCCGGGCGGGCGCGTCCATG</u>	19
R2	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u>	20
R3	OsALS	<u>CCGCATGATCGGCACCGACGCCT</u>	21
R4	OsALS	<u>CCTATGATCCCAAGTGGGGGCGC</u>	22
R5	OsACCcase	TATTGATTCTGTTGTGGGCA <u>AGG</u>	23
R6	OsACCcase	<u>CCAGTGCTTATTCTAGGGCATAT</u>	24
R7	OsACCcase	<u>CCGGTGCATACAGCGTCTTGACC</u>	25
R8	OsACCcase	ATCTTGCTCGACTTGGCAT <u>CCGG</u>	26
R9	OsACCcase	TCTGCACTGAACAAGCTTCT <u>TGG</u>	27
R10	OsACCcase	<u>CCACATGCAGTTGGGTGGTCCCA</u>	28
R11	OsACCcase	<u>CCATCTTACTGTTTCAGATGACC</u>	29
R12	OsACCcase	<u>CCCTGCTGACCCTGGTCAGCTTG</u>	30
R13	OsACCcase	TTCTCGTGCTGGACAAGTGT <u>TGG</u>	31
R14	OsACCcase	TTCTGCAACCAAGACTGCGC <u>AGG</u>	32
R15	OsACCcase	CAAGACTGCGCAGGCATTGCT <u>TGG</u>	33
R16	OsACCcase	<u>CCTCGCTAACTGGAGAGGCTTCT</u>	34
R17	OsACCcase	CGACTATTGTTGAGAACCTT <u>AGG</u>	35
R18	OsACCcase	<u>CCATGGCTGCAGAGCTACGAGGA</u>	36
R19	OsACCcase	<u>CCGCATTGAGTGCTATGCTGAGA</u>	37
R20	OsACCcase	TATGCTGAGAGGACTGCAAA <u>AGG</u>	38
R21	OsACCcase	<u>CCGCAAGGGTTAATTGAGATCAA</u>	39
R22	OsACCcase	GCAATGTTCTGGAACCGCA <u>AGGG</u>	40
R23	OsACCcase	<u>CCAGGATTGCATGAGTCGGCTTG</u>	41
R24	OsACCcase	GGAGCTTATCTTGCTCGACT <u>TGG</u>	42
R25	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCTACCCGGGCGGGCGCGTCCATG</u>	43
R26	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCGCATGATCGGCACCGACGCCT</u>	44
R27	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCTATGATCCCAAGTGGGGGCGC</u>	45

R28	OsHPPD	<u>GCTGCTGCCGCTCAACGAGCCGG</u>	46
R29	OsHPPD	<u>CCAGGAGCTCGGGGTGCTCGTGG</u>	47
R30	OsHPPD	<u>CCAGAAGGGCGGCTGCGGCGGGT</u>	48

РАМ подчеркнут.

Пшеница:

В соответствии с работой Юань Цзун (Цзун, Ю. и др. Точное редактирование основания в рисе, пшенице и кукурузе посредством слияния Cas9 и цитидиндезаминазы. Nat. Biotechnol. 2017, doi:10.1038/nbt.3811), были сконструированы векторы редактирования основания, нацеленные на гены TaALS, TaACCcase, TaEPSPS и TaHPPD, с использованием рТаU6. Среди них – 4 одиночных сайта-мишени в гене TaALS (W1-W3, W16), 3 двойных сайта-мишени в гене TaALS (W31-W33), 20 одиночных сайтов гена TaACCcase (W4-W15, W17-W24), 3 одиночных сайта-мишени гена TaEPSPS (W25-W27) и 3 одиночных сайта-мишени гена TaHPPD (W28-W30) и 1 двойной сайт-мишень генов TaALS и TaACCcase одновременно (W34). Последовательности-мишени sgPHK, участвующие в эксперименте, показаны в Таблице 2. Мутации потенциальной устойчивости показаны в Таблице 4.

Таблица 2. Гены-мишени пшеницы и последовательности-мишени gPHK.

	Ген-мишень	Последовательность-мишень	SEQ ID NO:
W1	TaALS	<u>CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG</u>	49
W2	TaALS	<u>CCGCATGATCGGCACGGACGCGT</u>	50
W3	TaALS	<u>CCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC</u>	51
W4	TaACCcase	<u>CCAGTGCCTATTCTAGGGCCTAT</u>	52
W5	TaACCcase	<u>CCTATTCTAGGGCCTATGAGGAG</u>	53
W6	TaACCcase	<u>TTTACGCTTACATTTGTGACTGG</u>	54
W7	TaACCcase	<u>GGAGCATATCTTGCTCGACTTGG</u>	55
W8	TaACCcase	<u>CCCACATGCAGTTGGGTGGCCCC</u>	56
W9	TaACCcase	<u>AGCTCCCACATGCAGTTGGGTGG</u>	57
W10	TaACCcase	<u>CCATCTGACAGTTTCAGATGACC</u>	58
W11	TaACCcase	<u>CCTTGCTAACTGGAGAGGCTTCT</u>	59
W12	TaACCcase	<u>TTCATCCTTGCTAACTGGAGAGG</u>	60
W13	TaACCcase	<u>CAACAATTGTTGAGAACCTTAGG</u>	61
W14	TaACCcase	<u>AGAGCTACGTGGAGGGGCTTGGG</u>	62
W15	TaACCcase	<u>TATGCTGAGAGGACTGCAAAGGG</u>	63
W16	TaALS	<u>CCTACCCTGGCGGCGGTCCATG</u>	64
W17	TaACCcase	<u>CCCTGCTGATCCAGGCCAGCTTG</u>	65
W18	TaACCcase	<u>CCAGCTTGATTCCCATGAGCGGT</u>	66

W19	TaACCCase	<u>TTCCTCGTGCTGGGCAAGTCTGG</u>	67
W20	TaACCCase	TAAGACAGCGCAGGCAATGCT <u>GG</u>	68
W21	TaACCCase	TTCAGCTACTAAGACAGCGC <u>AGG</u>	69
W22	TaACCCase	GTAATGTTCTTGAACCTCAAGGG	70
W23	TaACCCase	<u>CCTCAAGGGTTGATTGAGATCAA</u>	71
W24	TaACCCase	<u>CCAAGAGTGCATGGGCAGGCTTG</u>	72
W25	TaEPSPS	AACTGCAATGCGGCCACTGAC <u>CGG</u>	73
W26	TaEPSPS	AACTGCAATGCGTCCATTGACCGG	74
W27	TaEPSPS	AACTGCAATGCGGCCATTGAC <u>CGG</u>	75
W28	TaHPPD	GCTGCTGCCGCTCAACGAGC <u>CGG</u>	76
W29	TaHPPD	<u>CCAGGAGCTGGGGGTGCTCGTCG</u>	77
W30	TaHPPD	<u>CCAGAAGGGTGGCTGCGGCGGGT</u>	78
W31	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG CCTACCCTGGCGGCGCGTCCATG	
W32	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG CCGCATGATCGGCACGGACGCGT	
W33	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG CCTATGATCCCAAGCGGTGGTGC	
W34	TaALS TaACCCase	CAGGTCCCCCGCCGCATGATCGG TTCAGCTACTAAGACAGCGCAGG	

РАМ подчеркнут.

Таблица 3. Мутации потенциальной устойчивости к гербицидам в рисе.

Рис	Ген-мишень	Последовательность-мишень	Мутации
R1	OsALS	<u>CCTACCCGGGCGGCGCGTCCATG</u>	A122T
R2	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u>	P197S P197L P197F
R3	OsALS	<u>CCGCATGATCGGCACCGACGCCT</u>	D204N A205T D204N GGCACCGA
R4	OsALS	<u>CCTATGATCCCAAGTGGGGGCGC</u>	G654K G655D G655S G655N G654K CAAGTGGG

			G654K CAAGTGGG G654K CAAGTGGG
R5	OsACCcase	<u>TATTGATTCTGTTGTGGGCAAGG</u>	S1768F
R6	OsACCcase	<u>CCAGTGCTTATTCTAGGGCATAT</u>	R1793K A1794T R1793K TCTAGGGCA
R7	OsACCcase	<u>CCGGTGCATACAGCGTCTTGACC</u>	R1825H D1827N R1825H AGCGTCTTG
R8	OsACCcase	ATCTTGCTCGACTTGGCAT <u>CCGG</u>	L1815F A1816V R1817Stop L1815F и R1817Stop A1816V и R1817Stop L1815F и A1816V L1815F, A1816V и R1817Stop
R9	OsACCcase	TCTGCACTGAACAAGCTTCT <u>TGG</u>	A1837V
R10	OsACCcase	<u>CCACATGCAGTTGGGTGGTCCC</u> A	G1854D G1855D G1855S G1854N G1854D TGGG1855D G1854D TGGG1855D G1854D TGGG1855D

R11	OsACCcase	<u>CCATCTTACTGTTTCAGATGACC</u>	D1971N D1972N D1971N TTTCAGATG
R12	OsACCcase	<u>CCCTGCTGACCCTGGTCAGCTTG</u>	G1983D
R13	OsACCcase	<u>TTCCTCGTGCTGGACAAGTGTG</u> G	P1993S  P1993L P1993F R1994C P1993S GCTGGACAA P1993L GCTGGACAA P1993F GCTGGACAA
R14	OsACCcase	<u>TTCTGCAACCAAGACTGCGCAG</u> G	S2003F  A2004V T2005I S2003F и A2004V S2003F и T2005I A2004V и T2005I
R15	OsACCcase	<u>CAAGACTGCGCAGGCATTGCTG</u> G	T2007I  A2008V T2007I и A2008V
R16	OsACCcase	<u>CCTCGCTAACTGGAGAGGCTTCT</u>	R2028K G2029D G2029S G2029N R2028K и G2029D

			R2028K и G2029S R2028K и G2029N
R17	OsACCCase	<u>CGACTATTGTTGAGAACCTTAGG</u>	T2047I
R18	OsACCCase	<u>CCATGGCTGCAGAGCTACGAGG</u> A	R2070Q  G2071R R2070Q и G2071R
R19	OsACCCase	<u>CCGCATTGAGTGCTATGCTGAGA</u>	A2090T E2091K A2090T и E2091K
R20	OsACCCase	TATGCTGAGAGGACTGCAAA <u>AG</u> G	A2090V
R21	OsACCCase	<u>CCGCAAGGGTTAATTGAGATCAA</u>	E2106K
R22	OsACCCase	GCAATGTTCTGGAACCGCA <u>AGG</u> G	-
R23	OsACCCase	<u>CCAGGATTGCATGAGTCGGCTTG</u>	S2119N R2220Q S2119N и R2220Q
R24	OsACCCase	GGAGCTTATCTTGCTCGACT <u>TGG</u>	A1813V
R25	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCTACCCGGGCGGCGCGTCCATG</u>	R2 +R1
R26	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCGCATGATCGGCACCGACGCCT</u>	R2 +R3
R27	OsALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u> <u>CCTATGATCCCAAGTGGGGGCGC</u>	R2 +R4
R28	OsHPPD	GCTGCTGCCGCTCAACGAG <u>CCG</u> G	P277S  P277L
R29	OsHPPD	CCAGGAGCTCGGGGTGCTCG <u>TG</u> G	V364M
R30	OsHPPD	<u>CCAGAAGGGCGGCTGCGGCGGG</u> T	C413Y

			G414D
			G414S
			G414N
			G415E
			G415R
			G415K
			G414D
			GGCTGCGG
			G414D
			GGCTGCGG
			G414D
			GGCTGCGG
			G414S
			GGCTGCGG
			G414S
			GGCTGCGG
			G414S
			GGCTGCGG
			G414N
			GGCTGCGG
			G414N
			GGCTGCGG
			G414N
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y
			GGCTGCGG
			C413Y, G414D

			GCGGGT18 C413Y, G414D GCGGGT18 C413Y, G414D GCGGGT18 C413Y, G414S GCGGGT18 C413Y, G414S GCGGGT18 C413Y, G414S GCGGGT18 C413Y, G414N GCGGGT18 C413Y, G414N GCGGGT18 C413Y, G414N GCGGGT18
--	--	--	--

Таблица 4. Мутации потенциальной устойчивости к гербицидам в пшенице.

Пшеница	Ген-мишень	последовательность-мишень	мутации
W1	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATC <u>GG</u>	P197S P197L P197F
W2	TaALS	<u>CCGCATGATCGGCACGGACGC</u> GT	D204N A205T D204N GGCACGGA
W3	TaALS	<u>CCTATGATCCCAAGCGGTGGTG</u> C	G654D G654S G654N G655D G655S G655N G654D AAGCGGTG



			G654D AAGCGGTG G654D AAGCGGTG G654S AAGCGGTG G654S AAGCGGTG G654S AAGCGGTG G654N AAGCGGTG G654N AAGCGGTG G654N AAGCGGTG
W4	TaACCa se	<u>CCAGTGCCTATTCTAGGGCCTA</u> T	R1793K  A1794T R1793K и A1794T
W5	TaACCa se	<u>CCTATTCTAGGGCCTATGAGGA</u> G	E1796K  E1797K E1796K и E1797K
W6	TaACCa se	TTTACGCTTACATTTGTGACT <u>G</u> G	T1800M  L1801F T1800M и L1801F
W7	TaACCa se	GGAGCATATCTTGCTCGACTTG G	A1813V
W8	TaACCa se	CCCACATGCAGTTGGGTGGCC CC	G1854D  G1854S G1854N G1855D G1855S G1855N G1854D CAGTTGGGT G1854D CAGTTGGGT G1854D CAGTTGGGT G1854S CAGTTGGGT

			G1854S CAGTTGGGT G1854S CAGTTGGGT G1854N CAGTTGGGT G1854N CAGTTGGGT G1854N CAGTTGGGT
W9	TaACCa se	AGCTCCCACATGCAGTTGGGT <u>GG</u>	S1849F  H1850Y S1849F и H1850Y
W10	TaACCa se	<u>CCATCTGACAGTTTCAGATGAC</u> C	D1874N  D1875N D1874N и D1875N
W11	TaACCa se	<u>CCTTGCTAACTGGAGAGGCTT</u> CT	R2028K  G2029D G2029S G2029N R2028K и G2029D R2028K и G2029S R2028K и G2029N
W12	TaACCa se	TTCATCCTTGCTAACTGGAGAG G	L2024F
W13	TaACCa se	<u>CAACAATTGTTGAGAACCCTTA</u> GG	T2047I
W14	TaACCa se	AGAGCTACGTGGAGGGGCTTG <u>GG</u>	R2070C
W15	TaACCa se	TATGCTGAGAGGACTGCAAAG <u>GG</u>	A2090V
W16	TaALS	<u>CCTACCCTGGCGGCGGTCCAT</u> G	A122T
W17	TaACCa	<u>CCCTGCTGATCCAGGCCAGCTT</u>	G1983D

	se	G	
W18	TaACCa se	<u>CCAGCTTGATTCCCATGAGCGG</u> T	E1989K R1990Q E1989K и R1990Q
W19	TaACCa se	<u>TTCCTCGTGCTGGGCAAGTCT</u> GG	P1993S P1993L P1993F R1994C P1993S и R1994C P1993L и R1994C P1993F и R1994C
W20	TaACCa se	<u>TAAGACAGCGCAGGCAATGCT</u> GG	T2007I
			A2008V
			T2007I и A2008V
W21	TaACCa se	<u>TTCAGCTACTAAGACAGCGCA</u> GG	S2003L A2004V T2005I S2003L и A2004V S2003L и T2005I A2004V и T2005I S2003L, A2004V и T2005I
W22	TaACCa se	<u>GTAATGTTCTTGAACCTCAAGG</u> G	L2099F
W23	TaACCa se	<u>CCTCAAGGGTTGATTGAGATC</u> AA	E2106K
W24	TaACCa se	<u>CCAAGAGTGCATGGGCAGGCT</u> TG	R2220K G2119D R2220K и G2119D
W25	TaEPSP S	<u>AACTGCAATGCGGCCACTGAC</u> GG	T102I A103V

			T102I ATGCGGCC
W26	TaEPSP S	AACTGCAATGCGTCCATTGAC GG	T102I A103V T102I ATGCGTCC
W27	TaEPSP S	AACTGCAATGCGGCCATTGAC <u>GG</u>	T102I A103V T102I ATGCGGCC
W28	TaHPP D	GCTGCTGCCGCTCAACGAGCC <u>GG</u>	P277S P277L
W29	TaHPP D	<u>CCAGGAGCTGGGGGTGCTCGT</u> CG	V366I
W30	TaHPP D	<u>CCAGAAGGGTGGCTGCGGCGG</u> GT	C413Y G414D G414S G414N G415E G415R G415K G414D и G415E G414D и G415R G414D и G415K G414S и G415E G414S и G415R G414S и G415K G414N и G415E G414N и G415R G414N и G415K C413Y и G415E C413Y и G415R C413Y и G415K C413Y и G414D C413Y и G414S C413Y и G414N

			C413Y, G414D и G415E C413Y, G414D и G415R C413Y, G414D и G415K C413Y, G414S и G415E C413Y, G414S и G415R C413Y, G414S и G415K C413Y, G414N и G415E C413Y, G414N и G415R C413Y, G414N и G415K
W31	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATC GG CCTACCCTGGCGGGCGGTCCAT G	W2 +W1
W32	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATC GG CCGCATGATCGGCACGGACGC GT	W2 +W3
W33	TaALS	CAGGTCCCCCGCCGCATGATC GG CCTATGATCCCAAGCGGTGGTG C	W2 +W4
W34	TaALS TaACCa se	CAGGTCCCCCGCCGCATGATC GG TTCAGCTACTAAGACAGCGCA GG	W2 +W21

Пример 2. Трансформация риса и пшеницы

Рис (трансформация *Agrobacterium*):

Векторы pH-nCas9-PBE были трансформированы в штамм *Agrobacterium* AGL1 посредством

электропорации. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, культивирование ткани и регенерация Zhonghua 11 были выполнены в соответствии с работой Шань, К. и др. (Шань, К. и др. Целенаправленная модификация генома сельскохозяйственных растений с использованием системы CRISPR-Cas. *Nat. Biotechnol.* 31, 686-688 (2013)). Во всем последующем культивировании ткани использовали селекцию гигромицина (50 мкг/мл).

Пшеница (трансформация посредством бомбардировки частицами):

Плазмидную ДНК (векторы pCas9-PBE и pTaU6 смешали в равных пропорциях, соответственно) использовали для бомбардировки зародышей Kenong 199, как было описано ранее (Чжан, К., Лю, Дж., Чжан, Ю., Ян, Ж. и Гао, Ц. Биолистическая генетическая трансформация широкой линейки сортов китайской элитной пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *J. Genet Genomics.* 42, 39-42 (2015)). После бомбардировки, зародыши обрабатывали в соответствии с данными из работы Чжан, К. и др., но во время культивирования ткани не использовали селективные агенты.

Пример 3. Установление условий скрининга на устойчивость для трансформированных растений

Выбрали гербициды, перечисленные в Таблице 5, и подготовили среду в объеме 1/2 MS, содержащую гербициды в различных концентрациях, для скрининга проростков из культуры тканей риса и пшеницы дикого типа. Через 7 дней выбрали минимальные концентрации гербицидов, ингибирующих рост растений, для последующего скрининга трансформированных растений.

Таблица 5. Гербициды, используемые для скрининга.

Гербициды	Ингибируемый ген	Селективная концентрация для риса (PPM)	Селективная концентрация для пшеницы (PPM)
Имазамет	ALS		
Никосульфурон	ALS	0,012	0,13
Пироксулам	ALS		
Флукарбазон-натрий	ALS		
Биспирибак-натрий	ALS		
феноксапроп-Р-этил	ACCCase	4,5	
цигалофоп-бутил	ACCCase	5,3	
сетоксидим	ACCCase	0,33	0,33
ПИНОКСАДЕН	ACCCase		
Галоксифоп-Р-метил	ACCCase	0,036	0,036
мезотрион	HPPD		
Глифосат	EPSPS		

#### Пример 4. Скрининг и идентификация устойчивых растений

Трансформированные растения, полученные в Примере 3, выращивали на соответствующей среде для скрининга гербицидов (Таблица 5) и наблюдали фенотипы, и выбрали устойчивые растения (Фигуры 1-3).

После извлечения ДНК устойчивых растений, проводили T7E1 и PCR/RE. По окончании, подтверждали мутации генов-мишеней посредством секвенирования по Сэнгеру.

В результате, были идентифицированы следующие мутации в эндогенных белках ALS и ACCase растения как мутации, устойчивые к гербицидам. В дополнение к мутациям C-T, система редактирования основания по настоящему изобретению также может вызывать мутации C-G/A, поэтому неожиданные устойчивые мутации отсеивали при скрининге.

Таблица 6. Устойчивые мутации в ALS риса.

Положение аминокислоты	устойчивое замещение	Никосульфурон	Пироксулам	Флукарбазон-натрий	Биспирибак-натрий	Имазамет
OsALS-P171 (соответствует AtALS-P197)	A	R	R	R	r	
	F	R	R	R	R	
	S	R	R	R	R	
	Y	R	R	R	R	
OsALS-P171, R172 (соответствует AtALS-P197, R198)	F,C	R	R	R	R	
OsALS-G628, G629 (соответствует AtALS-G654, G655)	E, S					R
OsALS-G628, G629 (соответствует AtALS-G654, G655)	K,S					R
OsALS-G628, D633 (соответствует	E,N					R

AtALS-G654, D659)						
OsALS- P171,G628, G629 (соответствует AtALS- P197,G654,G65 5)	F,E,S	R	R	R		R

Таблица 7. Устойчивые мутации в ACCase риса.

Положение аминокислоты	устойчивое замещение	Галоксифоп-Р-метил
OsACCCase-W2125 (соответствует AtACCCase-W2027)	C	R
OsACCCase-W2125,R2126 (соответствует AtACCCase-W2027,R2028)	C, K	R

Таблица 8. Мутации, устойчивые к никосульфурону в пшенице.

Положение аминокислоты	Замещение генома А	Замещение генома В	Замещение генома D
TaALS-P173 (соответствует AtALS-P197)	F(гомо)	S(гомо)	S(гомо)
	F(гомо)	F(гомо)	S(гомо)
	S(гомо)	F/S	F/S
	F(гомо)	F/S	F/S
	F/S	F/S	F/S
	F/A	F(гомо)	F/S
	F/S	F(гомо)	F/S



## Формула изобретения

1. Способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, предпочтительно, нетрансгенного растения, устойчивого к гербицидам, содержащий введение в растение системы для редактирования основания гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, в геноме растения, в результате чего направляющая РНК нацеливает белок слияния, редактирующий основание, на последовательность-мишень гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, в растении, что приводит к, по меньшей мере, одному нуклеотидному замещению в последовательности-мишени, причем упомянутая система содержит, по меньшей мере, одно из следующего (i)-(v):

- i) белок слияния, редактирующий основание, и направляющую РНК;
- ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и направляющую РНК;
- iii) белок слияния, редактирующий основание, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- v) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния, редактирующий основание, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;

отличающийся тем, что упомянутый белок слияния, редактирующий основание, содержит нуклеазный домен CRISPR, инактивированный нуклеазой (например, Cas9, инактивированная нуклеазой), и домен дезаминазы, причем упомянутая направляющая РНК может нацеливать упомянутый белок слияния, редактирующий основание, на последовательность-мишень в гене, относящемся к устойчивости к гербицидам, в геноме растения,

при этом, упомянутое, по меньшей мере, одно нуклеотидное замещение придает растению устойчивость к гербицидам,

при необходимости, упомянутый способ дополнительно содержит этап скрининга растения на устойчивость к гербицидам.

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербицидам, кодирует белок, относящийся к устойчивости к гербицидам, селективный из PsbA, ALS, EPSPS, ACCase, PPO, HPPD, PDS, GS, DOXPS, P450.

3. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый белок слияния, редактирующий основание, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или 11.

4. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что направляющая РНК нацелена на, по меньшей мере, одну из SEQ ID NO: 19-78.

5. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к

устойчивости к гербицидам, кодирует ACCase, причем, упомянутое, по меньшей мере, одно нуклеотидное замещение приводит к аминокислотным замещениям в ACCase, селектированной из W2027 и W2027+R2028, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 1.

6. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербициду, кодирует ALS, причем, упомянутое, по меньшей мере, одно нуклеотидное замещение приводит к аминокислотным замещениям в ALS, селектированной из P197A, P197F, P197S, P197Y, P197F+R198C, G654E+G655S, G654K+G655S, G654E+G659N, P197F+G654E+G655S или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 2.

7. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербициду, кодирует ALS, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), селектированную из группы, состоящей из A122, P197, R198, D204, A205, G654, G655, G659 или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO: 2

8. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербициду, кодирует ACCase, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), селектированную из группы, состоящей из S1768, R1793, A1794, R1825, D1827, L1815, A1816, R1817, A1837, G1854, G1855, D1971, D1972, G1983, P1993, R1994, S2003, A2004, T2005, T2007, A2008, R2028, G2029, T2047, R2070, G2071, A2090, E2091, E2106, S2119, R2220, A1813, E1796, E1797, T1800, L1801, S1849, H1850, D1874, D1875, L2024, E1989, R1990, L2099 или из любой их комбинации, при этом, положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1.

9. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербициду, кодирует EPSPS, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), селектированную из группы, состоящей из T102 и/или A103, при этом, положения аминокислот относятся к SEQ ID NO:4.

10. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что упомянутый ген, относящийся к устойчивости к гербициду, кодирует HPPD, направляющая РНК нацеливается на последовательность-мишень, содержащую последовательность, кодирующую аминокислоту(ы), селектированную из группы, состоящей из P277, V364, C413, G414, G415, V366 или из любой их комбинации, при этом, положения аминокислот относятся к SEQ ID NO: 3.

11. Способ идентификации варианта белка, относящегося к устойчивости к гербицидам, отличающийся тем, что упомянутый вариант способен придавать растению устойчивость к гербицидам, причем упомянутый способ содержит:

- i) генерирование растения, устойчивого к гербицидам, посредством способа по пункту 1; и
- ii) определение последовательности гена, относящегося к устойчивости к гербицидам, и/или кодируемого белка, относящегося к устойчивости к гербицидам, в полученном растении,

устойчивом к гербицидам, что позволяет идентифицировать последовательность варианта.

12. Способ по пункту 11, отличающийся тем, что упомянутый белок, относящийся к устойчивости к гербицидам, селекционирован из PsbA, ALS, EPSPS, ACCase, PPO, HPPD, PDS, GS, DOXPS, P450.

13. Вариант белка, относящегося к устойчивости к гербициду, который идентифицирован посредством способа по пункту 11 или 12, отличающийся тем, что упомянутый вариант способен придавать растению устойчивость к гербицидам.

14. Вариант ACCase, по сравнению с ACCase дикого типа, причем упомянутый вариант ACCase содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, селекционированном из 1768, 1793, 1796, 1797, 1794, 1800, 1801, 1813, 1813, 1815, 1825, 1827, 1815, 1816, 1817, 1837, 1838, 1849, 1850, 1854, 1855, 1874, 1875, 1971, 1872, 1983, 1989, 1990, 1993, 1994, 2003, 2004, 2005, 2007, 2008, 2024, 2027, 2028, 2029, 2047, 2070, 2071, 2090, 2091, 2090, 2106, 2099, 2106, 2119, 2220, отличающийся тем, что положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:1, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам.

15. Вариант ALS, по сравнению с ALS дикого типа, причем упомянутый вариант ALS содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, селекционированном из 122, 197, 204, 205, 653, 654, 655, 659, отличающийся тем, что положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:2, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам.

16. Вариант HPPD, по сравнению с HPPD дикого типа, причем упомянутый вариант HPPD содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, селекционированном из 277, 364, 366, 413, 414, 415, отличающийся тем, что положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:3, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам.

17. Вариант EPSPS, по сравнению с EPSPS дикого типа, причем упомянутый вариант EPSPS содержит аминокислотную мутацию в, по меньшей мере, одном положении, селекционированном из 102 и 103, отличающийся тем, что положение аминокислоты относится к SEQ ID NO:4, причем, упомянутый вариант придает растению устойчивость к гербицидам.

18. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант по любому из пунктов 13-17.

19. Кассета экспрессии, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант по любому из пунктов 13-17, функционально сцепленную с регуляторной последовательностью.

20. Экспрессионная конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант по любому из пунктов 13-17, причем упомянутая нуклеотидная последовательность функционально сцеплена с регуляторной последовательностью.

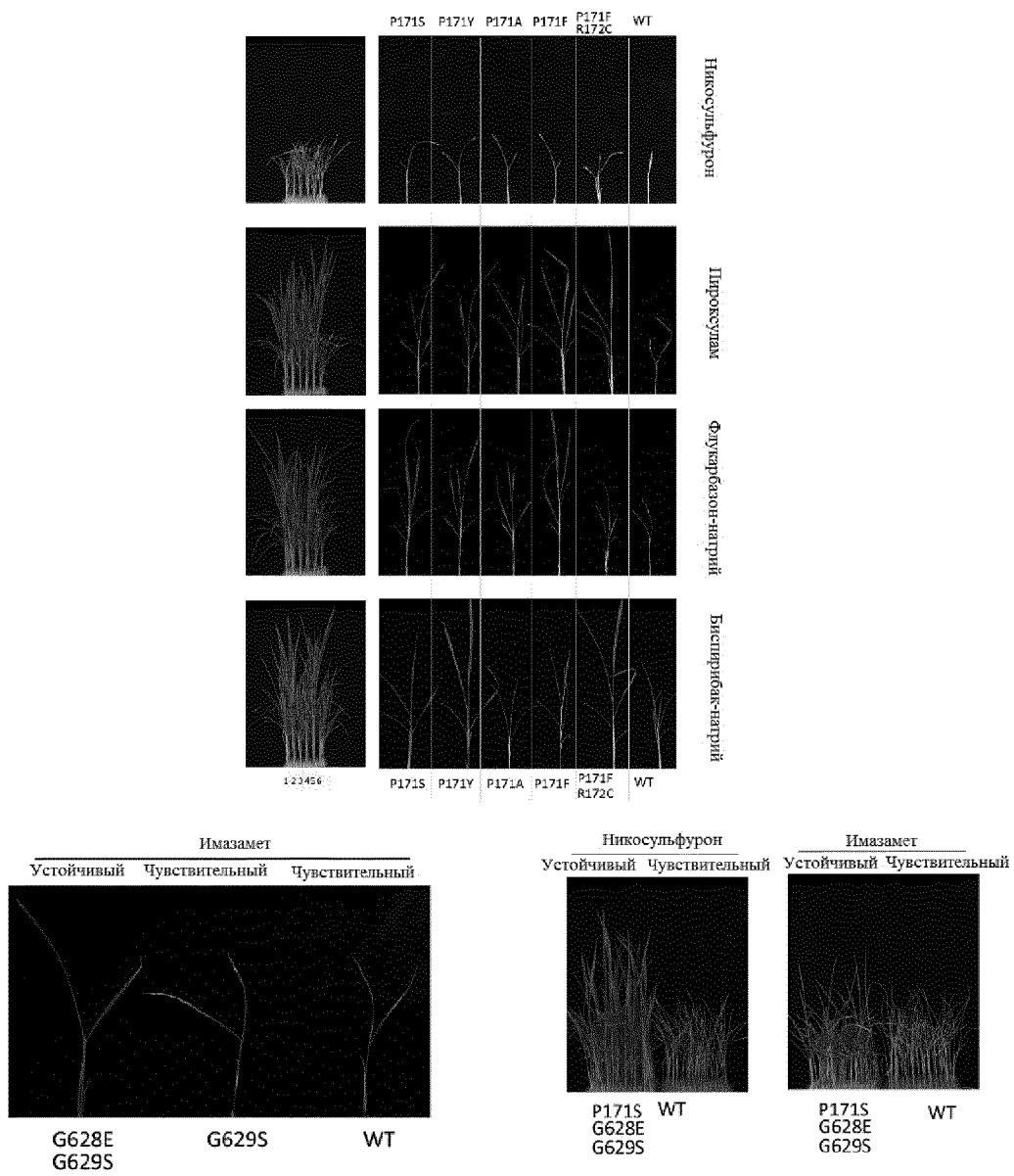
21. Использование варианта по любому из пунктов 13-17, выделенной нуклеиновой кислоты по пункту 18, кассеты экспрессии по пункту 19 и экспрессионной конструкции по пункту 20 в генерировании растений, устойчивых к гербициду.

22. Способ продуцирования растения, устойчивого к гербицидам, содержащий введение

выделенной нуклеиновой кислоты по пункту 18, кассеты экспрессии по пункту 19 и/или экспрессионной конструкции по пункту 20 в растение.

23. Растение, устойчивое к гербицидам, которое получают способом по пункту 1 или 22, или содержащее кассету экспрессии по пункту 19, или трансформируют посредством выделенной нуклеиновой кислоты по пункту 18, или посредством экспрессионной конструкции по пункту 20.

24. Способ по любому из пунктов 1-10, вариант по любому из пунктов 13-17, использование по пункту 21, способ по пункту 22 и растение, устойчивое к гербицидам, по пункту 23, отличающиеся тем, что растение селектировано из однодольных и двудольных растений, например, растение селектировано из пшеницы, риса, кукурузы, сои, подсолнечника, сорго, канолы, люцерны, хлопка, ячменя, проса, сахарного тростника, помидора, табака, маниока, картофеля, капусты, браунколя, огурца, помидора, гвоздики, пиона, розы, арбуза, дыни, клубники, черники, винограда, яблока, цитрусового, персика, *Radix isatidis*, лакричника, женьшеня, *Saposhnikovia divaricata* и *Arabidopsis thaliana*.



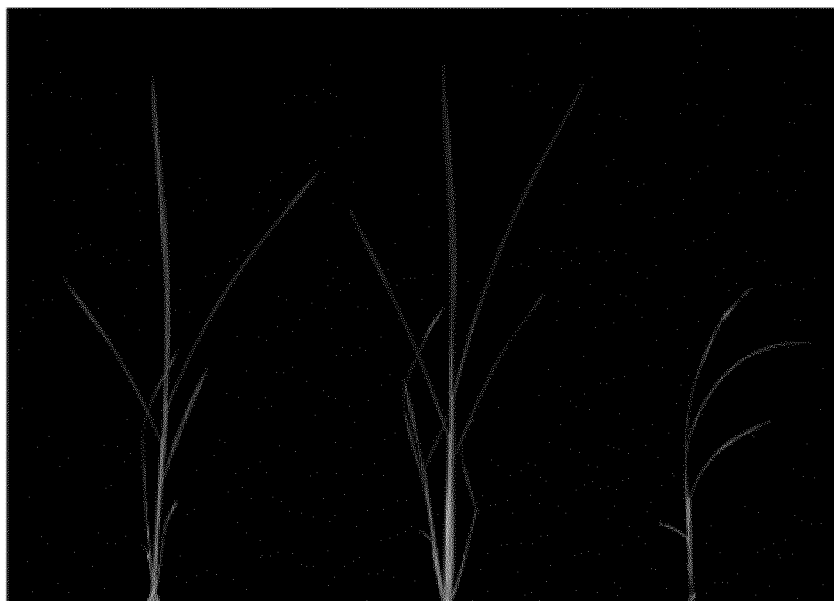
Фиг. 1

Галоксифоп-Р-метил

Устойчивый

Устойчивый

Чувствительный



W2125C

W2125C  
R2126K

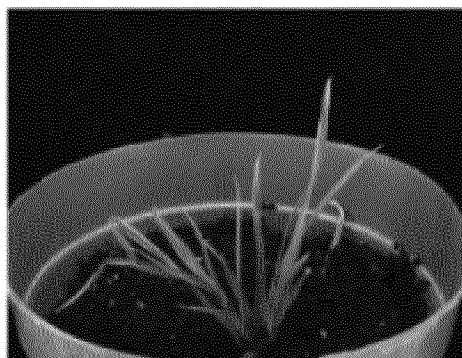
WT

**Фиг. 2**

Никосульфурон

Устойчивый

Чувствительный



W-T1-1

WT

**Фиг. 3**