

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390679** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.13**

(51) Int. Cl. **C12N 15/82 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.09.01**

(54) **ГЕНЫ СУР81Е, ПРИДАЮЩИЕ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЕРБИЦИДАМ**

(31) **63/073,276**

(32) **2020.09.01**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/048623**

(87) **WO 2022/051340 2022.03.10**

(71) Заявитель:

**КОЛОРАДО СТЕЙТ ЮНИВЕРСИТИ  
РИСЕРЧ ФАУНДЕЙШН; ДЗЕ  
БОАРД ОФ ТРАСТИС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС;  
МОНСАНТО ТЕКНОЛОДЖИ ЛЛК  
(US)**

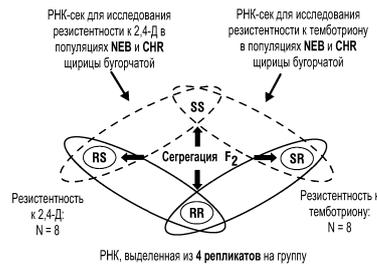
(72) Изобретатель:

**Гейнс Тодд, Родригес Алвес Де  
Фигейредо Марсело, Транел Патрик  
Джон, Джиакомини Дарси Энн, Беффа  
Роланд (US)**

(74) Представитель:

**Нагорных И.М. (RU)**

(57) Изобретение относится к растению или части растения, содержащей полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е, причем экспрессия полинуклеотида придает растению или части растения толерантность к синтетическим ауксиновым гербицидам, таким как 2,4-Д. В настоящем изобретении также предложены комплекты для выявления резистентных к гербицидам растений и способы определения того, является ли растение резистентным к гербицидам.



**A1**

**202390679**

**202390679**

**A1**

## **ГЕНЫ СУР81Е, ПРИДАЮЩИЕ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ГЕРБИЦИДАМ**

### **ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/073,276, поданной 1 сентября 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII посредством подачи документов в электронном виде и полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Указанный экземпляр в формате ASCII, созданный 26 августа 2021 г., называется P13673WO00\_ST25.txt и имеет размер 69 987 байтов.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам придания растениям толерантности к гербицидам.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

В современных североамериканских агрономических системах сорняки, если с ними не бороться, могут снизить урожайность нескольких основных культур более чем на 50%. Сегодня многие сельхозпроизводители в США в борьбе с популяциями сорняков в значительной степени полагаются на химические средства (т. е. гербициды), но эффективность этого подхода неуклонно снижается из-за растущего числа сорняков, резистентных к гербицидам. Хотя резистентность к гербицидам имеет место в США с конца 1950-х годов, широкое внедрение толерантных к гербицидам сортов сельскохозяйственных культур в середине 1990-х годов и чрезмерная зависимость от одного или двух механизмов действия гербицидов способствовали экспоненциальному увеличению числа резистентных видов сорняков за последние два десятилетия. В настоящее время в США существуют 164 вида сорняков с документально подтвержденной резистентностью к гербицидам, охватывающим один или более механизмов действия.

Понимание того, как сорняки справляются с гербицидными соединениями, чтобы избежать повреждения, является основной целью науки о сорняках, как для создания обходных путей борьбы с резистентностью к гербицидам, так и для получения понимания эволюции растений. Исследование механизмов резистентности к гербицидам за последние несколько десятилетий в основном были сосредоточены на мутациях, происходящих в генах, которые кодируют мишеневые ферменты, непосредственно ингибируемые гербицидами (резистентность на основе сайта-мишени). Лишь недавно был достигнут значительный прогресс в изучении механизмов резистентности не на основе сайта-мишени (NTSR), в основном благодаря возросшей доступности высокопроизводительных анализов всего генома/транскриптома. В этой работе в основном указывалось на усиленный метаболизм гербицида как основной путь NTSR, однако сообщалось также о механизмах резистентности, включающих пониженную транслокацию и вакуолярную секвестрацию. Широкое использование гербицидов для борьбы с сорняками обеспечивает отличную платформу для изучения быстрой адаптации растений к сильному отбору и для решения эволюционных вопросов, которые становятся все более разрешимыми благодаря достижениям геномики.

*Amaranthus tuberculatus* (щирица бугорчатая) является весьма проблематичным видом сорняка для сельхозпроизводителей на среднем западе США из-за ее высокой плодовитости и способности легко вырабатывать резистентность к гербицидам. С тех пор, как в 1993 г. появились сообщения о резистентности *A. tuberculatus* к ингибитору ацетолактасинтазы (ALS), этот вид приобрел резистентность к гербицидам, охватывающую шесть дополнительных мест приложения действия. В 2016 г. в Иллинойсе была обнаружена популяция, обладающая резистентностью к пяти механизмам действия, включая резистентность к ингибиторам фотосистемы II, ингибиторам протопорфириногенаоксидазы (PPO), ингибиторам 4-гидроксибензилпирувата (HPPD) и синтетическим ауксином. Было обнаружено, что два из типов резистентности (ALS и PPO) могут быть отнесены к мутациями сайта-мишени, но механизмы резистентности как к ингибитору HPPD, так и к синтетическому ауксину были неизвестны. В 2012 г. из Небраски сообщили о популяции, которая обладала высокой резистентностью к 2,4-Д, и впоследствии было определено, что она резистентна также к ингибирующим HPPD гербицидам.

Толерантные к гербицидам растения полезны в системах, в которых высаживают множество таких растений, которые могут давать урожай, а до посадки или после посадки применяют гербицид, который в противном случае уничтожил или повредил бы эти растения, не будь они толерантны к гербициду. Нежелательные растения уничтожаются или повреждаются, а толерантные растения выживают. Существует потребность в получении таких растений.

## **РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Предложены композиции и способы придания гербицидной толерантности растениям, частям растений и растительным клеткам. Предложены модифицированные растения, обладающие толерантностью к гербицидам, модифицированные растения, обладающие повышенной экспрессией полинуклеотида, кодирующего полипептид цитохрома P450 81E (CYP81E), по сравнению с немодифицированным растением. В некоторых вариантах осуществления модифицированные растения содержат гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид CYP81E. Также предложены приплод, части растений и растительные клетки модифицированных растений.

Предложены молекулы нуклеиновой кислоты, способные придавать толерантность к гербицидам, содержащие нуклеотидную последовательность, выбранную из: (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CYP81E, причем нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1; или (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид CYP81E, причем полипептид CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен последовательности с SEQ ID NO: 2.

Также предложены экспрессионные кассеты, векторы, биологические образцы, растения, части растений и растительные клетки, содержащие вышеупомянутые молекулы нуклеиновой кислоты.

Предложены полипептиды CYP81E, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по

меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

Предложены способы получения растения с толерантностью к гербициду, включающие повышение экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е в растении, причем гербицидная толерантность растения повышена по сравнению с растением, у которого отсутствует повышенная экспрессия. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение в растительную клетку полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е, причем этот полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке; и регенерирование растения из растительной клетки.

Предложены способы борьбы с нежелательной растительностью на участке для выращивания растений, включающий обеспечение на участке растения, которое содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е, причем экспрессия этого полинуклеотида придает растению толерантность к гербициду; и нанесение на участок эффективного количества гербицида.

Предложены способы борьбы с ростом резистентного к гербициду сорняка на участке для выращивания растений, включающие приведение сорняка в контакт с композицией, содержащей полинуклеотид, который уменьшает экспрессию или активность полипептида СУР81Е; и нанесение на участок эффективного количества гербицида.

Предложены продукты, полученные из вышеупомянутых растений, частей растений и растительных клеток, причем продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е. Предложены способы получения растительного продукта, включающие переработку вышеупомянутых растений или частей растений для получения растительного продукта, причем растительный продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е.

Предложены способы выявления резистентного к гербициду растения, включающие обеспечение биологического образца из растения, потенциально являющегося резистентным к гербициду; количественное определение экспрессии гена СУР81Е в биологическом образце, причем ген СУР81Е дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с

чувствительным к гербициду растением того же вида; и определение того, что растение резистентно к гербицидам, на основе количественного определения.

Также предложены наборы для выявления резистентного к гербициду растения, содержащие по меньшей мере два праймера, причем эти по меньшей мере  
5 два праймера распознают ген CYP81E, который дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с чувствительным к гербициду растением того же вида.

Хотя раскрыты несколько вариантов осуществления, другие варианты осуществления станут очевидны специалистам в данной области из последующего  
10 подробного описания, в котором показаны и описаны иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Соответственно, фигуры и подробное описание должны рассматриваться как иллюстративные по своей природе, а не ограничительные.

## 15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Следующие чертежи образуют часть описания изобретения и включены для дополнительной демонстрации некоторых вариантов осуществления или различных аспектов изобретения. В некоторых случаях варианты осуществления изобретения можно лучше всего понять, обратившись к прилагаемым фигурам в сочетании с  
20 подробным описанием, представленным в настоящем документе. Описание и прилагаемые фигуры могут подчеркнуть определенный конкретный пример или определенный аспект изобретения. Однако специалисту в данной области понятно, что части примера или аспект могут быть использованы в сочетании с другими примерами или аспектами изобретения.

На **ФИГ. 1** схематически показан план исследования. В каждой популяции F<sub>2</sub> растения клонировали и опрыскивали высокой и низкой дозой темботриона или 2,4-Д. На основании их реакции каждое растение относили к одной из четырех категорий: RR — резистентные к 2,4-Д и темботриону; RS — резистентные к 2,4-Д и чувствительные к темботриону; SR — чувствительные к 2,4-Д и резистентные к  
30 темботриону; и SS — чувствительные к 2,4-Д и темботриону. Четыре наиболее резистентных/чувствительных растения из каждой категории выбирали для анализа методом РНК-сек. Это позволило провести N = 8 сравнений между устойчивыми и

чувствительными растениями для каждого гербицида, используя только 16 растений для каждой популяции.

На **ФИГ. 2А–В** показаны графики метода скользящего окна значимо дифференциально экспрессируемых генов и значимых одиночных нуклеотидных полиморфизмов (ОНП). На **ФИГ. 2А** показаны значимо дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) между резистентными и чувствительными к 2,4-Д растениями в популяциях CHR и NEB, картированных на геном *A. hypochondriacus*. Значимыми считались только гены с долей ложноположительных результатов (FDR) 0,05 или меньше. На **ФИГ. 2В** показаны ОНП, которые статистически отличались между резистентными и чувствительными к 2,4-Д растениями в популяциях CHR и NEB, картированных на геном *A. hypochondriacus*. ОНП определялись как статически значимые, если анализ с помощью PLINK давал скорректированное р-значение 0,05 или меньше.

На **ФИГ. 3А–В** показана аллель-специфичная экспрессия всех ОНП в гипервариабельной области каркаса 4 для популяции NEB (**ФИГ. 3А**) и популяции CHR (**ФИГ. 3В**). Местоположение каждого ОНП дано на оси x, а результаты t-критерия для дифференциальной экспрессии между аллелями R и S (р-значение с поправкой Беньямини и Хохберга) дано над столбиками для каждого локуса.

На **ФИГ. 4** показано филогенетическое дерево цитохрома P450 81E8 в произвольном подмножестве популяций *A. tuberculatus* из Иллинойса, Небраски, Миссури и Канады. Образцы из этого исследования указаны названиями их популяций («CHR» или «NEB»), а также их фенотипическим откликом на 2,4-Д. Образцы, начинающиеся с числа или «N3», поступили из Онтарио, а образцы, начинающиеся с «В», «F», «J» или «K», поступили из Иллинойса и Миссури.

25

## **ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Во многих штатах среднего запада США у *Amaranthus tuberculatus* выработалась резистентность к 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоте (2,4-Д) и ингибиторам 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназы (HPPD). Две популяции, резистентные к обоим механизмам действия, одна из Небраски (NEB) и одна из Иллинойса (CHR), исследовали с использованием подхода РНК-сек на картирующих популяциях F<sub>2</sub> для выявления генов, ответственных за резистентность.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было легче понять, сначала определены некоторые термины. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относятся варианты осуществления изобретения. В практической реализации вариантов осуществления настоящего изобретения могут быть без лишнего экспериментирования использованы многие способы и материалы, аналогичные, модифицированные или эквивалентные описанным в настоящем изобретении, при этом в настоящем документе описаны предпочтительные материалы и способы. При описании и формулировании вариантов осуществления настоящего изобретения будет использоваться следующая терминология в соответствии с определениями, изложенными ниже.

Необходимо понимать, что вся терминология, используемая в настоящем документе, предназначено только в целях описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема каким-либо образом. Например, используемые в этом описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа могут включать в себя определяемые объекты во множественном числе, если контекст явно не указывает иное. Аналогичным образом подразумевается, что слово «или» включает «и», если контекст явно не указывает иное. Слово «или» означает любого одного члена конкретного списка, а также включает любую комбинацию членов этого списка. Кроме того, все единицы измерения, префиксы и символы могут быть обозначены в форме, принятой в международной системе единиц СИ.

Числовые диапазоны, указанные в описании изобретения, включают числа, определяющие диапазон, и включают каждое целое число в пределах определенного диапазона. Везде в этом описании различные аспекты настоящего изобретения представлены в формате диапазона. Следует понимать, что описание в формате диапазона приведено просто для удобства и краткости и не должно толковаться как жесткое ограничение объема изобретения. Соответственно, описание диапазона следует рассматривать как конкретно описывающее все возможные поддиапазоны, дроби и отдельные числовые значения в этом диапазоне. Например, описание диапазона, такое как от 1 до 6, следует рассматривать как конкретно описывающее поддиапазоны, такие как от 1 до 3, от 1 до 4, от 1 до 5, от 2 до 4, от 2 до 6, от 3 до 6 и

т. д., а также отдельные числа в этом диапазоне, например, 1, 2, 3, 4, 5 и 6, и десятичные и обыкновенные дроби, например, 1,2, 3,8, 1½ и 4¾. Это касается всех диапазонов независимо от их ширины.

5 Термин «около», используемый в настоящем документе, относится к вариации численной величины, которая может иметь место, например, в результате использования типичных методов и оборудования для измерения любой переменной, которая может быть определена количественно, в том числе, без ограничения, массы, объема, времени и температуры. Кроме того, учитывая процедуры обращения с твердыми и жидкими веществами, используемые в реальном мире, существуют  
10 определенные непреднамеренные ошибки и вариации, которые вероятны из-за различий в изготовлении, источнике или чистоте ингредиентов, используемых для приготовления композиций или осуществления способов и т. п. Термин «около» также охватывает эти вариации. Независимо от того, видоизменены ли пункты формулы изобретения с помощью термина «около» или нет, они включают в себя  
15 эквиваленты количеств.

Используемый в настоящем документе термин «придавать» относится к обеспечению растения характеристикой или признаком, таким как толерантность или резистентность к гербицидам и/или другие желательные признаки.

Термин «борьба с нежелательной растительностью или сорняками» следует  
20 понимать как уничтожение сорняков и/или замедление или подавление нормального роста сорняков иным образом. Под сорняками в самом широком смысле понимаются все те растения, которые растут в местах, где они нежелательны. В число сорняков в настоящем изобретении, включаются, например, двудольные и однодольные сорняки. Двудольные сорняки включают, без ограничения, сорняки родов: *Sinapis*, *Lepidium*,  
25 *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* и *Taraxacum*. Однодольные сорняки включают, без ограничения, сорняки  
30 родов: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*,

*Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* и *Apera*. Кроме того, сорняки согласно настоящему изобретению могут включать, например, культурные растения, которые растут в нежелательном месте. Например, самосеянное растение кукурузы, находящееся на поле, которое преимущественно содержит растения сои, может  
5 считаться сорняком, если растение кукурузы является нежелательным на поле с растениями сои.

Используемый в настоящем документе термин «ДНК» или «молекула ДНК» относится к молекуле двухцепочечной ДНК геномного или синтетического происхождения, т. е. полимеру дезоксирибонуклеотидных оснований или  
10 полинуклеотидной молекуле, считываемой с конца 5' (против хода транскрипции) к концу 3' (по ходу транскрипции). Используемый в настоящем документе термин «последовательность ДНК» относится к нуклеотидной последовательности молекулы ДНК. Номенклатура, используемая в настоящем документе, соответствует номенклатуре, определенной в разделе 37 Кодекса федеральных нормативных актов  
15 Соединенных Штатов, § 1.822, и изложена в таблицах стандарта ВОИС ST.25 (1998), приложение 2, таблицы 1 и 3.

Используемый в настоящем документе термин «эндогенный ген» или «нативная копия» гена относится к гену, который происходит из данного организма, клетки, ткани, генома или хромосомы. «Эндогенный ген» или «нативная копия» гена  
20 представляет собой ген, который ранее не был изменен в результате действий человека. Аналогичным образом «эндогенный белок» относится к белку, кодированному эндогенным геном.

Как правило, термин «гербицид» используется в настоящем документе в значении активного ингредиента, который уничтожает растения, борется с ними или  
25 иным образом неблагоприятно изменяет их рост. Предпочтительным количеством или концентрацией гербицида является «эффективное количество» или «эффективная концентрация». Под «эффективным количеством» и «эффективной концентрацией» подразумеваются количество и концентрация, соответственно, которых достаточно для уничтожения или ингибирования роста аналогичного растения, растительной  
30 ткани, растительной клетки или клетки-хозяина дикого типа, но при этом указанное количество не убивает или не ингибирует столь же сильно рост резистентных к гербициду растений, тканей растений, растительных клеток и клеток-хозяев,

соответствующих настоящему изобретению. Как правило, эффективное количество гербицида представляет собой количество, которое повседневно используют в системах сельскохозяйственного производства для уничтожения целевых сорняков. Такое количество известно специалистам в данной области. Гербицидное действие 5 проявляется гербицидами, полезными для настоящего изобретения, при нанесении их непосредственно на растение или на локус растения на любом этапе роста либо перед посадкой или появлением всходов. Наблюдаемый эффект зависит от вида растения, с которым нужно бороться, стадии роста растения, параметров нанесения — разбавления и размера капель при распылении, размера частиц твердых компонентов, 10 условий окружающей среды во время применения, конкретного используемого соединения, конкретных используемых адъювантов и носителей, типа почвы и т. д., а также количества наносимого химического вещества. Эти и другие факторы могут быть скорректированы, как известно в данной области, для стимулирования неселективного или селективного гербицидного действия. Как правило, гербицидные 15 обработки могут проводиться до внесения в почву, на поверхности почвы после посадки растений, до или после появления всходов. Обработку после появления всходов проводят на относительно незрелой нежелательной растительности для достижения максимального уничтожения сорняков.

Под «толерантным к гербицидам» или «резистентным к гербицидам» 20 растением подразумевается растение, которое толерантно или резистентно по меньшей мере к одному гербициду при уровне, который обычно уничтожил бы или подавил рост обычного растения или растения дикого типа. Уровни гербицида, которые обычно подавляют рост нетолерантного растения, известны и легко определяются специалистами в данной области. В число примеров входят количества, 25 рекомендуемые изготовителями для применения. Максимальная норма является примером количества гербицида, которое обычно подавляет рост нетолерантного растения. В настоящем изобретении термины «толерантный к гербицидам» и «резистентный к гербицидам» используются взаимозаменяемо и считаются имеющими эквивалентное значение и эквивалентную область применения. 30 Аналогичным образом термины «толерантность к гербицидам» и «резистентность к гербицидам» используются взаимозаменяемо и считаются имеющими эквивалентное значение и эквивалентную область применения. Аналогичным образом термины

«толерантный» и «резистентный» используются взаимозаменяемо и считаются имеющими эквивалентное значение и эквивалентную область применения. Используемые в настоящем документе применительно к гербицидной композиции, полезной в различных вариантах осуществления, раскрытых здесь, термины, такие

5 гербициды и т. п., относятся к тем агрономически приемлемым гербицидным активным ингредиентам, которые признаны в данной области. Используемый в настоящем документе термин «признак толерантности к гербицидам» является трансгенным признаком, придающим растению улучшенную толерантность к гербицидам по сравнению с растением дикого типа.

10 Термин «введенный» в контексте встраивания нуклеиновой кислоты в клетку означает «трансфекцию», или «трансформацию», или «трансдукцию» и в том числе относится к включению нуклеиновой кислоты в эукариотическую или прокариотическую клетку, причем нуклеиновая кислота может быть включена в геном клетки (например, хромосому, плазмиду, пластиду или митохондриальную

15 ДНК), преобразована в автономный репликон или временно экспрессируема (например, трансфицированная мРНК).

Используемый в настоящем документе термин «изолированная молекула ДНК» относится к молекуле ДНК, по меньшей мере частично отделенной от других молекул, обычно связанных с ней в ее нативном или естественном состоянии. В одном

20 варианте осуществления термин «изолированная» относится к молекуле ДНК, которая по меньшей мере частично отделена от некоторых нуклеиновых кислот, которые обычно фланкируют молекулу ДНК в ее нативном или естественном состоянии. Таким образом, молекулы ДНК, слитые с регуляторными или кодирующими последовательностями, с которыми они обычно не ассоциированы,

25 например, в результате методов рекомбинации, в настоящем документе считаются изолированными. Такие молекулы считаются изолированными, когда они интегрированы в хромосому клетки-хозяина или присутствуют в растворе нуклеиновой кислоты с другими молекулами ДНК, в том смысле, что они не находятся в своем нативном состоянии.

30 Используемый в настоящем документе термин «модифицированный» в контексте растений, семян, компонентов растений, клеток растений и геномов растений, относится к состоянию, включающему изменения или вариации по

сравнению с их естественным или нативным состоянием. Например, «нативный транскрипт» гена относится к РНК-транскрипту, который сформирован из немодифицированного гена. Как правило, нативный транскрипт является смысловым транскриптом. Модифицированные растения или семена содержат молекулярные изменения в своих генетических материалах, в том числе либо генетические, либо эпигенетические изменения. Как правило, модифицированные растения или семена или их родительская или прародительская линия были подвергнуты мутагенезу, редактированию генома (например, без ограничения, с помощью методов, использующих сайт-специфичные нуклеазы), генетической трансформации (например, без ограничения, с помощью методов трансформации *Agrobacterium* или бомбардировки микрочастицами) или их комбинации. В соответствии с одним аспектом модифицированное растение, предложенное в настоящем документе, не содержит нерастительного генетического материала или последовательностей. В соответствии еще с одним аспектом модифицированное растение, предложенное в настоящем документе, не содержит межвидового генетического материала или последовательностей.

Используемый в настоящем документе термин «растение» относится к целому растению, любой его части, или культуре клеток или ткани, полученной из растения, включая любое из: целых растений, компонентов или органов растений (например, листьев, стеблей, корней и т. д.), тканей растений, семян, растительных клеток и/или их потомства. Потомственное растение может быть из любого дочернего поколения, например, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7 и т. д. Растительная клетка представляет собой биологическую клетку растения, взятую из растения или полученную посредством культивирования из клетки, взятой из растения.

Термин «полинуклеотид», используемый в настоящем документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую множество полимеризованных нуклеотидов, например, по меньшей мере около пяти последовательных полимеризованных нуклеотидов. Полинуклеотид может быть нуклеиновой кислотой, олигонуклеотидом, нуклеотидом или любым их фрагментом. Во многих случаях полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полинуклеотид (или белок) или его домен или фрагмент. Кроме того, полинуклеотид может содержать промотор, интрон, энхансерную область, сайт

полиаденилирования, сайт инициации трансляции, нетранслируемые области 5' или 3', репортерный ген, селективируемый маркер и т. п. Полинуклеотид может быть одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК. Полинуклеотид необязательно содержит модифицированные основания или модифицированный остов.

5 Полинуклеотид может быть, например, геномной ДНК или РНК, транскриптом (например, мРНК), кДНК, продуктом ПЦР, клонированной ДНК, синтетической ДНК или РНК или т. п. Полинуклеотид может быть объединен с углеводом, липидами, белком или другими материалами для выполнения определенного действия, такого как трансформация, или для формирования полезной композиции, такой как

10 пептидная нуклеиновая кислота (ПНК). Полинуклеотид может содержать последовательность либо в смысловой, либо в антисмысловой ориентации. «Олигонуклеотид» по существу эквивалентен терминам амплимер, ампликон, праймер, олигомер, элемент, мишень и зонд и в некоторых вариантах осуществления является одноцепочечным.

15 Используемый в настоящем документе термин «праймер» охватывает любую нуклеиновую кислоту, которая способна инициировать синтез зарождающейся нуклеиновой кислоты в процессе, зависящем от матрицы, таком как ПЦР. Обычно праймеры представляют собой олигонуклеотиды длиной от 10 до 30 нуклеотидов, но могут быть использованы более длинные последовательности. Праймеры могут быть

20 получены в одно- или двухцепочечной форме. Зонды могут быть использованы в качестве праймеров, но предназначены для связывания с мишеневой ДНК или РНК и необязательно должны использоваться в процессе амплификации.

Используемый в настоящем документе термин «промотор» относится к области ДНК, расположенной выше по ходу трансляции от начала транскрипции и

25 участвующей в распознавании и связывании РНК-полимеразы и других белков для инициации транскрипции. «Растительный промотор» представляет собой промотор, способный инициировать транскрипцию в растительных клетках независимо от того, происходит ли он из растительной клетки. В число примеров растительных промоторов входят, без ограничения, промоторы, которые получены из растений,

30 растительных вирусов и бактерий, которые содержат гены, экспрессируемые в растительных клетках, таких как *Agrobacterium* или *Rhizobium*. Примеры промоторов под контролем развития включают промоторы, которые предпочтительно

инициируют транскрипцию в определенных тканях, таких как листья, корни или семена. Такие промоторы называются «тканепредпочтительными». Промоторы, которые инициируют транскрипцию только в определенной ткани, называются «тканеспецифичными». Специфичный для «типа клеток» промотор в первую очередь стимулирует экспрессию в определенных типах клеток одного или нескольких органов, например, в сосудистых клетках корней или листьев. «Индуцируемый» или «репрессируемый» промотор представляет собой промотор, который находится под контролем окружающей среды. Примеры условий окружающей среды, которые могут влиять на транскрипцию посредством индуцируемых промоторов, включают анаэробные условия или присутствие света. Тканеспецифичные, тканепредпочтительные, специфичные для типа клеток и индуцируемые промоторы составляют класс «неконститутивных» промоторов. «Конститутивный» промотор — это промотор, который активен в большинстве условий окружающей среды.

Используемый в настоящем документе термин «рекомбинантная(-ый)», когда он относится к нуклеиновой кислоте или полипептиду, указывает, что такой материал был изменен в результате применения человеком рекомбинантного метода, например, путем рестрикции и лигирования полинуклеотида, удлинения полинуклеотида с перекрывающимися праймерами или геномной вставки или трансформации. Открытая рамка считывания последовательности гена рекомбинантная, если это нуклеотидная последовательность была извлечена из ее естественного контекста и клонирована в вектор искусственной нуклеиновой кислоты любого типа. Термин «рекомбинантный» также может относиться к организму, имеющему рекомбинантный материал, например, растение, которое содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, может рассматриваться как рекомбинантное растение.

«Регуляторные элементы» относятся к нуклеотидным последовательностям, расположенными до (некодирующие последовательности на 5'-конце), внутри или после (некодирующие последовательности на 3'-конце) кодирующей последовательности по ходу трансляции, и которые влияют на процессинг или стабильность РНК или трансляцию ассоциированной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны и последовательности распознавания полиаденилирования. Регуляторные элементы, присутствующие на

конструкции рекомбинантной ДНК, которую вводят в клетку, могут быть эндогенными для клетки или гетерологичными по отношению к клетке. В настоящем документе термины «регуляторный элемент» и «регуляторная последовательность» используются взаимозаменяемо.

5 «Последовательность» означает последовательное расположение нуклеотидов или аминокислот. Границы последовательности, кодирующей белок, могут быть определены иницирующим трансляцию кодоном на 5'-конце и терминирующим трансляцию кодоном на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления кодирующая белок молекула может содержать ДНК-последовательность, кодирующую  
10 последовательность белка. В некоторых вариантах осуществления кодирующая белок молекула может содержать РНК-последовательность, кодирующую последовательность белка. Используемые в настоящем документе термины «экспрессия трансгена», «экспрессирование трансгена», «экспрессия белка» и «экспрессирование белка» означают получение белка посредством процесса  
15 транскрибирования молекулы ДНК в матричную РНК (мРНК) и трансляции мРНК в полипептидные цепи, которые в конечном итоге сворачиваются в белки.

Используемые в настоящем документе термины «процентная идентичность последовательности» или «% идентичности последовательности» относятся к проценту идентичных нуклеотидов или аминокислот в линейном полинуклеотиде или  
20 полипептидной последовательности референсной («запрашиваемой») последовательности по сравнению с тестовой («предметной») последовательностью (или ее комплементарной цепью), когда эти две последовательности оптимально выровнены (с соответствующими вставками нуклеотидов или аминокислот, делециями или пробелами, составляющими в общей сложности менее 20 процентов  
25 от референсной последовательности в окне сравнения). Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения хорошо известно специалистам в данной области и может выполняться с помощью таких инструментов, как алгоритм поиска локальной гомологии Смита-Уотермана, алгоритм выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша, метод поиска  
30 сходства по Пирсону-Липману и компьютеризированных реализаций этих алгоритмов, таких как GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA, доступных в составе программного пакета анализа последовательностей GCG® Wisconsin Package®

(Accelrys Inc., Сан-Диего, Калифорния), MEGAlign (DNASar Inc., Мэдисон, Висконсин) и MUSCLE (версия 3.6) (Edgar, «MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput» *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-7 (2004)), например, с параметрами по умолчанию. «Доля идентичности» для выровненных сегментов тестовой последовательности и референсной последовательности представляет собой количество идентичных компонентов, которые являются общими для двух выровненных последовательностей, деленное на общее количество компонентов в выравниваемой части сегмента референсной последовательности, т. е. всей референсной последовательности или меньшей определенной части референсной последовательности. Процентная идентичность последовательности представляется как доля идентичности, умноженная на 100. Сравнение одной или более последовательностей может быть с полноразмерной последовательностью или ее частью, или с более длинной последовательностью.

Используемые в настоящем документе термины «синтетический ауксиновый гербицид» или «ауксиновый гербицид» означают любой гербицид, который оказывает гербицидное действие посредством имитирования эндогенного растительного ауксина или ингибирования перемещения ауксиновых соединений из клеток. В число примеров синтетических ауксиновых гербицидов входят бензойные кислоты, пиридинкарбоновые кислоты, хинолинкарбоновые кислоты, семикарбазоны, дифлуфензопир, 2,4-Д, 2,4-ДМ, МЦПА, МЦПБ, мекопроп, дикамба, клопиралид, флуроксипир, пиклорам, триклопир, аминоклопиралид, аминоклопиралор или хинкларак.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к нуклеиновой кислоте, которую используют при трансфекции клетки-хозяина, и в которую может быть вставлен полинуклеотид. Векторы часто являются репликонами. Векторы экспрессии позволяют транскрибировать вставленную в них нуклеиновую кислоту.

### **Полинуклеотиды СУР81Е**

Растительный гормон ауксин служит центральным регулятором генов, участвующих в многочисленных путях роста, развития и ответа растений. Активным ауксином, встречающимся в природе, является индол-3-уксусная кислота (IAA), но

было обнаружено, что многие другие соединения имитируют функцию IAA при нанесении на растения. Это привело к выявлению и организации серийного производства ряда соединений, которые действуют как эффективные гербициды. В то время как кукуруза и другие однодольные культуры от природы толерантны к низким

5 уровням синтетических ауксиновых гербицидов, двудольные культуры, такие как соя и хлопок, очень чувствительны. Усилия по выведению сортов, толерантных к ауксиновым гербицидам, были сосредоточены на гетерологичной экспрессии ферментов, которые инактивируют ауксиновый гербицид, тем самым делая в

10 Предложены последовательности цитохрома P450 81E (CPY81E), которые придают толерантность к гербицидам. Такие последовательности содержат аминокислотную последовательность, указанную в последовательности SEQ ID NO: 2, и ее варианты. Также предложены полинуклеотидные последовательности, кодирующие такие аминокислотные последовательности, в том числе SEQ ID NO: 1.

15 В соответствии с несколькими вариантами осуществления культурные растения трансформируют геном, кодирующим полипептид CPY81E, способный инактивировать определенные ауксиновые гербициды и также, необязательно, гербициды других типов.

С использованием способов, хорошо известных в данной области, могут быть

20 выявлены дополнительные полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид CPY81E, на основе их способности придавать толерантность к интересующему гербициду. Например, потенциально пригодные гены CPY81E трансформируют в подходящие штаммы дрожжей и экспрессируют в них и проводят отбор на основе их способности окислять испытываемые гербициды *in vitro* (ср.

25 Siminszky et al. (1999) *PNAS* (USA) 96:1750-1755). В число подходящих штаммов дрожжей входят, например, WAT11 или WAT21, которые также содержат компетентную растительную цитохром P-450 редуктазу. После индукции в течение подходящего периода (например, в зависимости от индуцируемого промотора, используемого в векторе трансформации, с галактозой) клетки выращивают,

30 собирают, расщепляют, получают фракцию микросом обычными средствами и анализируют с помощью NADPH на способность окислять гербицид, меченный по

углероду радиоактивным изотопом  $^{14}\text{C}$ . Необязательно, анализы проводят с использованием целых клеток в культуре.

В качестве альтернативы потенциально пригодные гены CPY81E экспрессируют в табаке, *Arabidopsis* или другом легко трансформируемом растении, чувствительном к гербицидам, и полученные в результате трансформированные растения оценивают на их толерантность к ауксиновым гербицидам или другим гербицидам, представляющим интерес. Необязательно, растения или образцы ткани, взятые из растений, обрабатывают гербицидом и анализируют, чтобы оценить скорость биотрансформации родительского гербицида в окисленные продукты метаболического распада.

Специалисты в данной области могут также найти дополнительные потенциально пригодные гены CPY81E на основе геномной синтении и сходства последовательностей. В одном варианте осуществления дополнительные потенциально пригодные гены могут быть получены путем гибридизации или ПЦР с использованием последовательностей, основанных на нуклеотидных последовательностях CPY81E, о которых говорилось выше.

В подходе с ПЦР могут быть сконструированы олигонуклеотидные праймеры для использования в ПЦР для амплификации соответствующих последовательностей ДНК из кДНК или геномной ДНК, выделенной из любого растения, представляющего интерес. Способы конструирования праймеров для ПЦР и клонирования ПЦР-продуктов общеизвестны в данной области. См., например, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.). См. также Innis et al., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); и Innis and Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York).

В методах гибридизации весь или часть известного полинуклеотида используют в качестве зонда, который селективно гибридизируют с другими соответствующими полинуклеотидами, присутствующими в популяции клонированных фрагментов геномной ДНК или фрагментах кДНК (т. е. геномных библиотек или библиотек кДНК) из выбранного организма. Гибридизационные зонды могут быть фрагментами геномной ДНК, фрагментами кДНК, фрагментами РНК или

другими олигонуклеотидами, и могут быть мечены детектируемой группой, такой как  $^{32}\text{P}$ , или любым другим детектируемым маркером. Способы получения зондов для гибридизации и для конструкции библиотек кДНК и геномных библиотек общеизвестны в данной области и раскрыты в книге Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.).

Под «гибридизацией с» или «специфичной гибридизацией с» понимают связывание, образование дуплекса или гибридизацию молекулы только с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях, когда эта последовательность присутствует в сложной смеси (например, суммарной клеточной) ДНК или РНК. «Связывают(-ет) по существу» относится к комплементарной гибридизации между зондирующей нуклеиновой кислотой и мишенивой нуклеиновой кислотой и охватывает незначительные несовпадения, которые могут быть устранены путем снижения жесткости среды гибридизации для достижения желаемого обнаружения последовательности мишенивой нуклеиновой кислоты.

«Жесткие условия гибридизации» и «жесткие условия промывки гибридизации» в контексте экспериментов по гибридизации нуклеиновой кислоты, таких как гибридизация с использованием нозерн-блоттинга и гибридизация с использованием саузерн-блоттинга, зависят от последовательности и отличаются при различных параметрах окружающей среды. Более длинные последовательности специфично гибридизируются при более высоких температурах. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в книге Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2 «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays»*, Elsevier, New York. Обычно очень жесткие условия гибридизации и промывки выбирают так, чтобы температура была примерно на  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  ниже температуры плавления ( $T_m$ ) для конкретной последовательности при определенных ионной силе и pH. Как правило, в «жестких условиях» зонд будет гибридизоваться со своей мишенивой последовательностью, но не с другими последовательностями.

$T_m$  — это температура (при определенных ионной силе и pH), при которой 50% мишенивой последовательности гибридизируются с идеально подобранным зондом.

Очень жесткие условия выбирают так, чтобы они были эквивалентны  $T_m$  для конкретного зонда. Примером жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые имеют более 100 комплементарных остатков на фильтре при саузерн-блоттинге или нозерн-блоттинге, является 50% формамид с 1 мг гепарина при 42 °С, причем гибридизацию проводят в течение всей 5 ночи. Примером очень жестких условий промывки является 0,1 5М NaCl при температуре 72 °С в течение около 15 минут. Примером жестких условий промывки является промывка  $0,2 \times SSC$  при температуре 65 °С в течение 15 минут (описание буфера SSC см. в книге Sambrook, указанной ниже). Часто промывке в условиях 10 высокой жесткости предшествует промывка в условиях низкой жесткости для удаления фонового сигнала зонда. Примером промывки в условиях средней жесткости для дуплекса, например, из более 100 нуклеотидов, является  $1 \times SSC$  при 45 °С в течение 15 минут. Примером промывки в условиях низкой жесткости для дуплекса, например, из более 100 нуклеотидов, является  $4-6 \times SSC$  при 40 °С в 15 течение 15 минут. В случае коротких зондов (например, примерно от 10 до 50 нуклеотидов) жесткие условия обычно включают концентрации соли менее около 1,0 М ионов Na, обычно концентрацию от 0,01 до 1,0 М ионов Na (или других солей) при pH от 7,0 до 8,3 и обычно при температуре 30 °С. Жесткие условия могут быть также достигнуты добавлением дестабилизирующих агентов, таких как формамид. 20 Обычно отношение сигнал-шум, которое в 2 раза (или более) выше наблюдаемого для несвязанного зонда в конкретном анализе гибридизации, указывает на обнаружение специфичной гибридизации. Нуклеиновые кислоты, которые не гибридизируются друг с другом в жестких условиях, все равно по существу идентичны, если белки, которые они кодируют, по существу идентичны. Это происходит, например, когда 25 копию нуклеиновой кислоты создают с использованием максимального вырождения кодона, разрешенного генетическим кодом.

Ниже приведены примеры наборов условий гибридизации/промывки, которые могут быть использованы для клонирования нуклеотидных последовательностей, которые являются гомологами референсных нуклеотидных последовательностей: 30 референсная нуклеотидная последовательность предпочтительно гибридизируется с референсной последовательностью в 7% додецилсульфата натрия (ДСН), 0,5 М  $NaPO_4$ , 1 мМ ЭДТА при 50 °С с промывкой в  $2 \times SSC$ , 0,1% ДСН при 50 °С, еще более

желательно в 7% додецилсульфата натрия (ДСН), 0,5 М NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА при 50 °С с промывкой в 1 × SSC, 0,1% ДСН при 50 °С, еще более желательно в 7% додецилсульфата натрия (ДСН), 0,5 М NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА при 50 °С с промывкой в 0,5 × SSC, 0,1% ДСН при 50 °С, предпочтительно в 7% додецилсульфата натрия (ДСН), 0,5 М NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА при 50 °С с промывкой в 0,1 × SSC, 0,1% ДСН при 50 °С, более предпочтительно в 7% додецилсульфата натрия (ДСН), 0,5 М NaPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА при 50 °С с промывкой в 0,1 × SSC, 0,1% ДСН при 65 °С.

Несколько вариантов реализации также относятся к использованию СУР81Е или его вариантов, которые придают толерантность к гербицидам, включая ауксиновые гербициды. Термин «варианты» предназначен для обозначения по существу сходных последовательностей. В случае полинуклеотидов вариант содержит делецию и/или добавление одного или более нуклеотидов на одном или более внутренних сайтов в нативном нуклеотиде и/или замену одного или более нуклеотидов на одном или более сайтах в нативном нуклеотиде. Используемый в настоящем документе термин «нативный» полинуклеотид или полипептид относится к полинуклеотиду или полипептиду, содержащему встречающуюся в природе нуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность, соответственно. Для полинуклеотидов консервативные варианты включают те последовательности, которые из-за вырожденности генетического кода кодируют полипептиды СУР81Е, описанные выше. Встречающиеся в природе аллельные варианты могут быть выявлены с помощью хорошо известных методов молекулярной биологии, таких как, например, методы полимеразной цепной реакция (ПЦР) и гибридизации, как указано выше. Вариантные полинуклеотиды также включают синтетически полученные полинуклеотиды, такие как сформированные, например, путем использования сайт-направленного мутагенеза, но которые по-прежнему кодируют полипептид СУР81Е, придавая толерантность к гербицидам. Как правило, последовательности вариантов конкретного полинуклеотида будут по меньшей мере на около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичны последовательности этого конкретного полинуклеотида.

Варианты конкретного полинуклеотида, кодирующего СУР81Е, которые придают толерантность к гербицидам, охватываются и могут быть оценены путем

сравнения процентной идентичности последовательности между полипептидом, кодируемым вариантным полинуклеотидом, и полипептидом, кодируемым референсным полинуклеотидом. Процентная идентичность последовательности между двумя полипептидами может быть вычислена с использованием программ и алгоритмов выравнивания последовательностей, описанных ниже. При оценке любой 5 данной пары полинуклеотидов путем сравнения процентной идентичности последовательности, общей для двух полипептидов, которые они кодируют, процентная идентичность последовательности между двумя кодируемыми полипептидами составляет по меньшей мере около 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 10 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или процентов идентичности последовательности.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области и могут быть осуществлены с использованием математических алгоритмов, таких как алгоритм Майерса и Миллера (Myers and Miller 15 (1988) *CABIOS* 4:11-17); алгоритм локального выравнивания (Smith et al. (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482); алгоритм глобального выравнивания Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453); алгоритм Карлина и Альтшуля (Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264), модифицированный в статье Карлина и Альтшуля (Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20 90:5873-5877). Компьютерные реализации этих алгоритмов могут быть использованы при сравнении последовательностей для определения идентичности последовательностей. Такие реализации включают, без ограничения: CLUSTAL в программе PC/Gene (от компании Intelligenetics, Маунтин-Вью, Калифорния); программу ALIGN (версия 2.0) и GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA и TFASTA в пакете 25 программного обеспечения GCG Wisconsin Genetics, версия 10 (от компании Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, Сан-Диего, Калифорния, США).

Несколько вариантов осуществления относятся к увеличению экспрессии гена CYP81E в растении. Используемый в настоящем документе термин «повышенная экспрессия» или «сверхэкспрессия» означает любую форму экспрессии, которая 30 является дополнительной к первоначальному уровню экспрессии дикого типа. Первоначальный уровень экспрессии дикого типа может быть также нулевым (отсутствие экспрессии). Способы увеличения экспрессии генов или генных

продуктов хорошо задокументированы в данной области и включают, например, сверхэкспрессию под действием надлежащих промоторов, использование транскрипционных или трансляционных энхансеров. Изолированные нуклеиновые кислоты, которые служат в качестве промоторных или энхансерных элементов, могут  
5 быть введены в надлежащую позицию (обычно выше по ходу трансляции) негетерологичной формы полинуклеотида, чтобы повышающе регулировать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, представляющий интерес. Например, эндогенные промоторы могут быть изменены *in vivo* мутацией, делецией и/или заменой (см, Kmiec, патент США № 5,565,350; Zarling et al., WO9322443), или в  
10 клетку растения могут быть введены изолированные промоторы в правильной ориентации и на правильном расстоянии от гена CYP81E, чтобы управлять экспрессией гена.

Для увеличения экспрессии гена CYP81E посредством модификации геномной ДНК растения может быть использована направленная модификация геномов  
15 растения с использованием методов редактирования генома. Методы редактирования генома могут позволить целенаправленно вставить одну или более представляющих интерес нуклеиновых кислот в геном растения. В число примеров способов введения донорных полинуклеотидов в геном растения или модификации геномной ДНК растения входят использование специфичных к последовательности нуклеаз, таких  
20 как цинк-пальцевые нуклеазы, сконструированные или нативные мегануклеазы, TALE-эндонуклеазы или РНК-направляемые эндонуклеазы (например, система короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (CRISPR)/Cas9, система CRISPR/Cpf1, система CRISPR/CasX, система CRISPR/CasY, система CRISPR/каскад). Способы редактирования генома для модификации,  
25 удаления или вставки последовательностей нуклеиновых кислот в геномную ДНК известны в данной области.

### **Экспрессирующие конструкции**

Полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть  
30 представлены в экспрессирующей конструкции. Экспрессирующие конструкции обычно включают в себя регуляторные элементы, которые функциональны в предназначенной клетке-хозяине, в которой эта экспрессирующая конструкция

должна экспрессироваться. Таким образом, специалист в данной области может выбрать регуляторные элементы для использования в бактериальных клетках-хозяевах, дрожжевых клетках-хозяевах, растительных клетках-хозяевах, клетках-хозяевах насекомых, клетках-хозяевах млекопитающих и клетках-хозяевах человека.

5 В число регуляторных элементов входят промоторы, последовательности терминации транскрипции, последовательности терминации трансляции, энхансеры и элементы полиаденилирования. Используемый в настоящем документе термин «экспрессирующая конструкция» относится к комбинации последовательностей нуклеиновых кислот, которые предоставляют для транскрипции функционально  
10 связанной последовательности нуклеиновой кислоты. Используемый в настоящем документе термин «функционально связанные» означает две молекулы ДНК, связанные таким образом, что одна может влиять на функцию другой. Функционально связанные молекулы ДНК могут быть частью непрерывной молекулы и могут быть или не быть смежными. Например, промотор функционально связан с кодирующей  
15 полипептид молекулой ДНК в ДНК-конструкции, причем эти две молекулы ДНК расположены таким образом, что промотор может влиять на экспрессию молекулы ДНК.

Используемый в настоящем документе термин «гетерологичный» относится к взаимосвязи между двумя или более объектами, полученными из различных  
20 источников и поэтому обычно не связанными в природе. Например, кодирующая белок рекомбинантная молекула ДНК гетерологична по отношению к функционально связанному промотору, если такая комбинация обычно не встречается в природе. Кроме того, конкретная рекомбинантная молекула ДНК может быть гетерологичной по отношению к клетке, семени или организму, в который она вставлена, когда в  
25 природе она не встречается в этой конкретной клетке, семени или организме.

Экспрессирующая конструкция может содержать промоторную последовательность, функционально связанную с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид СУР81Е, как описано в настоящем документе. Промоторы могут быть включены в полинуклеотид с использованием  
30 стандартных методов, известных в данной области. В экспрессирующей конструкции могут быть использованы множество копий промоторов или множество промоторов, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления промотор

может быть помещен примерно на том же расстоянии от сайта инициации транскрипции в экспрессирующей конструкции, что и расстояние от сайта инициации транскрипции в его естественной генетической среде. Допускается некоторая вариация этого расстояния без существенного снижения активности промотора. В экспрессирующую конструкцию обычно включают сайт инициации транскрипции.

Варианты осуществления относятся к рекомбинантной молекуле ДНК, кодирующей полипептид СУР81Е, причем рекомбинантная молекула ДНК дополнительно определена как функционально связанная с гетерологичным регуляторным элементом. В конкретных вариантах осуществления гетерологичный регуляторный элемент представляет собой промотор, функциональный в растительной клетке. В других вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор.

Если экспрессирующая конструкция должна быть обеспечена в растительной клетке или введена в нее, то могут быть использованы промоторы вирусов растений, такие как, например, промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (CaMV) (включая усовершенствованный промотор CaMV 35S (см., например, патент США № 5,106,739)), или промотор CaMV 19S или прожилковой мозаики маниока. В число других промоторов, которые могут быть использованы для экспрессирующих конструкций в растениях, входят, например, промоторы зеина, включая промоторы зеина кукурузы, промотор гена PROLIFERA, промотор гена *Ar3*, промоторы генов теплового шока, T-DNA 1'- или 2'-промотор *A. tumefaciens*, промотор полигалактуроназы, промотор халконсинтазы A (CHS-A) из *petunia*, промотор PR-1a табака, промотор убихитина, промотор актина, промотор гена *alcA*, промотор *pin2* (Xu et al., 1993), промотор *Wip1* кукурузы, промотор гена *trpA* кукурузы (патент США № 5,625,136), промотор гена CDPK кукурузы, и промотор RUBISCO SSU (патент США № 5,034,322). Для использования с полинуклеотидными экспрессирующими конструкциями, описанными в настоящем документе, также предполагаются конститутивные промоторы (такие как промотор CaMV, убихитина, актина или NOS), регулируемые развитием промоторы и индуцируемые промоторы (например, промоторы, которые могут быть индуцированы теплом, светом, гормонами или химическими веществами).

Экспрессирующие конструкции могут необязательно содержать последовательность терминации транскрипции, последовательность терминации трансляции, последовательность, кодирующую сигнальный пептид и/или энхансерные элементы. Области терминации транскрипции обычно могут быть  
5 получены из 3'-нетранслируемой области эукариотической или вирусной геновой последовательности. Последовательности терминации транскрипции могут быть расположены ниже по ходу кодирующей последовательности для обеспечения эффективной терминации. Последовательность сигнального пептида представляет собой короткую аминокислотную поверхность, обычно присутствующую на  
10 аминоконце белка, которая отвечает за перемещение функционально связанного зрелого полипептида в широкий диапазон посттрансляционных клеточных мест назначения, начиная специфическими клеточными отсеками и заканчивая сайтами действия белка и внеклеточной средой. Применительно к полипептидам, описанным в настоящем документе, предполагается нацеливание генных продуктов на  
15 предназначенное клеточное и/или внеклеточное место назначения с использованием функционально связанной последовательности сигнального пептида. Классические энхансеры представляют собой цис-действующие элементы, которые усиливают транскрипцию генов и также могут быть включены в экспрессирующую конструкцию. Классические энхансерные элементы известны в данной области и  
20 включают, без ограничения, энхансерный элемент CaMV 35S, энхансерный элемент раннего промотора цитомегаловируса (CMV) и энхансерный элемент SV40. Также в данной области известны интрон-опосредованные энхансерные элементы, которые повышают генную экспрессию. Эти элементы должны присутствовать в транскрибируемой области и зависят от ориентации. В число примеров входит  
25 энхансерный элемент гена *shrunkен-1* кукурузы (Clancy и Hannah, 2002).

Необязательно, ген, кодирующий полипептид CPY81E, является кодон-оптимизированным для удаления признаков, неблагоприятных для экспрессии (см., например, патент США № 6,051,760; EP 0359472; EP 80385962; EP 0431829; и Perlak et al. (1991) *PNAS USA* 88:3324-3328; все они включены в настоящий документ путем  
30 ссылки).

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты содержат по меньшей мере одну замену, инсерцию или делецию нуклеотида, так что

они не повторяют встречающуюся в природе последовательность нуклеиновой кислоты.

### **Полипептиды СУР81Е**

5            Термины «полипептид» и «белок» обычно используются взаимозаменяемо и относятся к одной полипептидной цепи, которая может или не может быть модифицирована путем добавления неаминокислотных групп. Понятно, что такие полипептидные цепи могут ассоциироваться с другими полипептидами или белками или другими молекулами, такими как кофакторы. Используемые в настоящем  
10 документе термины «белки» и «полипептиды» также включают варианты, мутанты, модификации, аналоги и/или производные полипептидов согласно изобретению, как описано в настоящем документе.

          Что касается определенного полипептида, понятно, что показатели % идентичности, превышающие вышеуказанные, будут включать в себя  
15 предпочтительные варианты осуществления. Таким образом, где уместно, в свете показателей минимального % идентичности предпочтительно, чтобы полипептид СРУ81Е содержал аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 45%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 55%, более  
20 предпочтительно по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 65%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 91%, более предпочтительно по  
25 меньшей мере на 92%, более предпочтительно по меньшей мере на 93%, более предпочтительно по меньшей мере на 94%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, более предпочтительно по меньшей мере на 96%, более предпочтительно по меньшей мере на 97%, более предпочтительно по меньшей мере на 98%, более предпочтительно по меньшей мере на 99%, более предпочтительно по меньшей мере  
30 на 99,1%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,2%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,3%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,4%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,5%, более предпочтительно по меньшей мере

на 99,6%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,7%, более предпочтительно по меньшей мере на 99,8% и еще более предпочтительно по меньшей мере на 99,9% идентична SEQ ID NO: 2.

5 Под «вариантом» полипептида понимается полипептид, полученный из белка последовательности SEQ ID NO: 2 путем делеции (так называемого усечения) или добавления одной или более аминокислот к N-концу и/или C-концу нативного белка; делеции или добавления одной или более аминокислот на одном или более сайтах в нативном белке; или замены одной или более аминокислот на одном или более сайтах в нативном белке. Такие варианты могут быть результатом, например, генетического  
10 полиморфизма или манипуляций человека. Способы таких манипуляций общеизвестны в данной области.

«Производные» белка включают в себя пептиды, олигопептиды, полипептиды, белки и ферменты, имеющие замены, делеции и/или инсерции аминокислоты по сравнению с рассматриваемым немодифицированным белком и обладающие сходной  
15 биологической и функциональной активностью с немодифицированным белком, из которого они получены. Таким образом, функциональные варианты и фрагменты полипептидов СУР81Е и кодирующие их молекулы нуклеиновой кислоты также входят в объем настоящего изобретения, и если специально не описано иное, независимо от происхождения указанного полипептида и независимо от того,  
20 встречается ли он в природе.

Кроме того, специалисту в данной области также понятно, что изменения могут быть внесены посредством мутации в нуклеотидные последовательности, что приводит к изменениям в аминокислотной последовательности кодируемых белков без изменения биологической активности белков. Таким образом, например, путем  
25 введения одной или нескольких замен, добавлений или делеций нуклеотида в соответствующую нуклеотидную последовательность, так что в кодируемый белок вводятся одна или несколько замен, добавлений или делеций аминокислот, может быть создана изолированная полинуклеотидная молекула, кодирующая полипептид СУР81Е, имеющий аминокислотную последовательность, которая отличается от  
30 последовательности SEQ ID NO: 2. Мутации могут быть введены стандартными методами, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Такие вариантные нуклеотидные последовательности также охватываются

настоящим изобретением. Например, предпочтительно, консервативные аминокислотные замены могут быть сделаны в одном или более предсказанных остатках предпочтительно заменимых аминокислот. Остаток «заменяемой» аминокислоты представляет собой остаток, который может быть изменен в последовательности белка дикого типа без изменения биологической активности, тогда как остаток «незаменяемой» аминокислоты обязателен для биологической активности.

Под делецией понимается удаление одной или более аминокислот из белка. Под инсерцией понимается введение одного или более аминокислотных остатков в заданный сайт в белке. Инсерции могут содержать N-концевые и/или C-концевые слияния, а также внутренние инсерции одной или множестве аминокислот. Как правило, инсерции в аминокислотной последовательности будут меньше N- или C-концевых слияний примерно на 1–10 остатков. В число примеров N- или C-концевых белков или пептидов входят связывающий домен или активационный домен транскрипционного активатора, который используется в дрожжевой двухгибридной системе, белки оболочки фага, гексагистиридиновая метка, глутатион-S-трансферазная метка, белок А, мальтозосвязывающий белок, дигидрофолатредуктаза, эпитоп Tag-100, эпитоп с-мус, эпитоп FLAG<sup>®</sup>, lacZ, СМР (кальмодулин-связывающий пептид), эпитоп НА, эпитоп белка С и эпитоп VSV.

Под заменой понимается замена аминокислот белка другими аминокислотами, имеющими сходные свойства (например, сходную гидрофобность, гидрофильность, антигенность, склонность к образованию или разрушению  $\alpha$ -спиральных структур или  $\beta$ -листовых структур). Аминокислотные замены обычно состоят из отдельных остатков, но могут быть сгруппированы в зависимости от функциональных ограничений, налагаемых на полипептид, и могут меняться в диапазоне от 1 до 10 аминокислот; инсерции обычно будут порядка примерно от 1 до 10 аминокислотных остатков. Консервативные аминокислотные замены — это замены, в которых аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота,

глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Такие замены не будут производиться для консервативных аминокислотных остатков или аминокислотных остатков, находящихся в консервативном мотиве. Таблицы консервативных замен хорошо известны в данной области (см., например, Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company (Eds).

Аминокислотные замены, делеции и/или инсерции могут быть легко произведены с использованием методов синтеза пептидов, хорошо известных в данной области, таких как твердофазный синтез пептидов и т. п., или посредством манипуляции с рекомбинантной ДНК. Способы манипулирования последовательностями ДНК для получения вариантов белка с заменой, инсерцией или делецией хорошо известны в данной области. Например, методы создания мутаций путем замены на заданных сайтах в ДНК хорошо известны специалистам в данной области и включают мутагенез M13, мутагенез гена T7 *in vitro* (USB, Кливленд, Огайо), сайт-направленный мутагенез QuickChange (Stratagene, Сан-Диего, Калифорния), ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез или другие протоколы сайт-направленного мутагенеза.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену, инсерцию или делецию, так что они не повторяют встречающуюся в природе аминокислотную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления полипептид CYP81E содержит по меньшей мере одно из: остатка аланина в позиции, соответствующей позиции 9 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка серина в позиции, соответствующей позиции 12 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка гистидина в позиции, соответствующей позиции 22 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка валина в позиции, соответствующей позиции 103 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка глицина в позиции, соответствующей позиции 157 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка серина в позиции, соответствующей позиции 258 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка треонина в позиции, соответствующей позиции 276

последовательности SEQ ID NO: 2; остатка метионина в позиции, соответствующей позиции 379 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка аланина в позиции, соответствующей позиции 449 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка серина в позиции, соответствующей позиции 450 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка аланина в позиции, соответствующей позиции 463 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка валина в позиции, соответствующей позиции 489 последовательности SEQ ID NO: 2; остатка лейцина в позиции, соответствующей позиции 491 последовательности SEQ ID NO: 2. В настоящем документе позиция аминокислотного остатка в данной аминокислотной последовательности обычно нумеруется с использованием нумерации позиции соответствующего аминокислотного остатка аминокислотной последовательности CYP81E *Amaranthus tuberculatus*, показанной в SEQ ID NO:2.

«Ортологи» и «паралоги» включаются в себя эволюционные понятия, используемые для описания предковых отношений генов. Паралоги — это гены в пределах одного и того же вида, которые возникли за счет дубликации предкового гена; ортологи — это гены из различных организмов, которые возникли за счет видообразования, а также получены из общего предкового гена.

Ортологи и паралоги последовательности SEQ ID NO: 2, охваченные настоящим изобретением, включают, без ограничения, полипептиды, содержащие последовательности SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44.

## ТАБЛИЦА 1

Белок	Вид	Аминокислотная последовательность
Spov3_chr3.03506	<i>Spinacia oleracea</i>	SEQ ID NO: 33
EL10Ac3g07035.1	<i>Beta vulgaris</i>	SEQ ID NO: 34
AUR62024416-RA	<i>Chenopodium quinoa</i>	SEQ ID NO: 35
Ciclev10025420m.g	<i>Citrus clementina</i>	SEQ ID NO: 36
Glyma.16G149300	<i>Glycine max</i>	SEQ ID NO: 37
Solyc04g078360.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	SEQ ID NO: 38
HanXRQChr02g0040021	<i>Helianthus annuus</i>	SEQ ID NO: 39
Soltu.DM.04G033120	<i>Solanum tuberosum</i>	SEQ ID NO: 40
Prupe.6G227100	<i>Prunus persica</i>	SEQ ID NO: 41
Gohir.D12G056000	<i>Gossypium hirsutum</i>	SEQ ID NO: 42
Manes.13G116700	<i>Manihot esculenta</i>	SEQ ID NO: 43
Sialb.0008s1384	<i>Sinapis alba</i>	SEQ ID NO: 44

## Способы трансформации

Несколько вариантов осуществления относятся к растительным клеткам, растительным тканям, растениям и семенам, которые содержат рекомбинантную ДНК, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетки, ткани, растения и семена, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК, проявляют толерантность к ауксиновым гербицидам.

Подходящие способы трансформации растительных клеток-хозяев включают практически любой способ, посредством которого ДНК или РНК может быть введена в клетку (например, когда конструкция рекомбинантной ДНК стабильно интегрируется в хромосому растения, или когда конструкция рекомбинантной ДНК или РНК временно вводится в клетку растения), и хорошо известны в данной области. Двумя эффективными способами трансформации клеток являются трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, и трансформация, опосредованная бомбардировкой микрочастицами. Способы бомбардировки микрочастицами проиллюстрированы, например, в патентах США №№ 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208 и 6,399,861. Способы трансформации, опосредованные *Agrobacterium*, описаны, например, в патенте США № 5,591,616, который полностью включен в настоящий документ путем ссылки. Трансформацию растительного материала на практике осуществляют в культуре тканей на питательных средах, например, смеси питательных веществ, которые позволяют клеткам расти *in vitro*. В число реципиентных клеток-мишеней входят, без исключения, меристемные клетки, верхушки побегов, гипокотили, каллусы, незрелые или зрелые зародыши и гаметные клетки, такие как микроспоры и пыльца. Каллусы могут быть иницированы из тканевых источников, включая, без ограничения, незрелые и зрелые зародыши, гипокотили, апикальные меристемы сеянцев, микроспоры и т. п. Клетки, содержащие трансгенное ядро, вырастают в трансгенные растения.

При трансформации в любом одном эксперименте по трансформации ДНК обычно вводят только в небольшой процент растительных клеток-мишеней. Маркерные гены используют для обеспечения эффективной системы идентификации тех клеток, которые стабильно трансформируются за счет приема и интеграции рекомбинантной молекулы ДНК в свои геномы. Предпочтительные маркерные гены обеспечивают селективные маркеры, которые придают резистентность к селективному агенту, такому как антибиотик или гербицид. Любой из гербицидов,

резистентными к которым могут быть растения согласно настоящему изобретению, является агентом для селективных маркеров. Потенциально трансформируемые клетки подвергают воздействию селективного агента. В популяции выживших клеток находятся те клетки, в которых, как правило, придающий резистентность ген интегрирован и экспрессируется на достаточном уровне, позволяющем клеткам выживать. Клетки могут быть протестированы дополнительно для подтверждения стабильной интеграции экзогенной ДНК. Обычно используемые селективные маркерные гены включают гены, придающие резистентность к антибиотикам, таким как канамицин и паромомицин (*nptII*), гигромицин В (*aph IV*), спектиномицин (*aadA*) и гентамицин (*aac3* и *aacC4*), или резистентность к гербицидам, таким как глюфосинат (*bar* или *pat*), дикамба (DMO) и глифосат (*aroA* или EPSPS). Примеры таких селективных маркеров проиллюстрированы в патентах США №№ 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 и 6,118,047. Также могут быть использованы маркеры, обеспечивающие возможность визуального скрининга трансформантов, например, ген, экспрессирующий цветной или флуоресцентный белок, такой как люцифераза или зеленый флуоресцентный белок (GFP), или ген, экспрессирующий бета-глюкуронидазу или ген *uidA* (GUS), для которых известны различные хромогенные субстраты.

## 20 **Растения с толерантностью к гербицидам**

Несколько вариантов осуществления относятся к растительным клеткам, растениям и семенам, которые содержат полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е, причем экспрессия полинуклеотида придает толерантность к гербицидам. Растения могут быть однодольными или двудольными и могут включать, например, растения риса, пшеницы, ячменя, овса, ржи, сорго, кукурузы, винограда, помидора, картофеля, латука, брокколи, огурца, арахиса, дыни, перца, моркови, тыквы, лука, сои, люцерны, подсолнечника, хлопка, рапса и сахарной свеклы.

Растения, которые особенно полезны в способах настоящего описания, включают все растения, которые принадлежат к надсемейству «зеленые растения» (Viridiplantae), в частности однодольные и двудольные растения, включая кормовые или фуражно-бобовые культуры, декоративные растения, пищевые культуры, деревья или кустарники, выбранные из списка, включающего: *Acer* spp., *Actinidia* spp.,

*Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp.,  
*Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*,  
*Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (например, *Avena sativa*,  
*Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa*  
5 *carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica*  
spp. (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [рапс, масличный рапс, репа  
рапсовая]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum*  
spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*,  
*Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*,  
10 *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp.,  
*Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp.,  
*Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*,  
*Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*,  
*Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*,  
15 *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus*  
*carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (например, *Glycine*  
*max*, *Soja hispida* или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (например,  
*Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (например, *Hordeum*  
*vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*,  
20 *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula*  
*sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (e.g. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*,  
*Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea*  
*americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus*  
spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana*  
25 spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (например, *Oryza sativa*, *Oryza*  
*latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*,  
*Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp.,  
*Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia*  
*vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., *Prosopis* spp., *Prunus* spp., *Psidium* spp., *Punica*  
30 *granatum*, *Pyrus communis*, *Quercus* spp., *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, *Ribes*  
spp., *Ricinus communis*, *Rubus* spp., *Saccharum* spp., *Salix* sp., *Sambucus* spp., *Secale*  
*cereale*, *Sesamum* spp., *Sinapis* sp., *Solanum* spp. (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum*

*integrifolium* или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, *Spinacia* spp., *Syzygium* spp., *Tagetes* spp., *Tamarindus indica*, *Theobroma cacao*, *Trifolium* spp., *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale rimpaui*, *Triticum* spp. (например, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum vulgare*), *Tropaeolum minus*,  
5 *Tropaeolum majus*, *Vaccinium* spp., *Vicia* spp., *Vigna* spp., *Viola odorata*, *Vitis* spp., *Zea mays*, *Zizania palustris*, *Ziziphus* spp., амарант, артишок, спаржа, брокколи, брюссельская капуста, белокочанная капуста, рапс, морковь, цветная капуста, сельдерей, листовая капуста, лен, кале, чечевица, рапс масличный, бамия, лук, картофель, рис, соя, клубника, сахарная свекла, сахарный тростник, подсолнечник,  
10 помидоры, тыква, чай и водоросли, среди прочих. В некоторых вариантах осуществления растение представляет собой культурное растение. Примеры культурных растений включают, среди прочего, сою, подсолнечник, канолу, люцерну, рапс, хлопок, помидоры, картофель или табак.

Некоторые варианты осуществления включают в себя потомство или потомок  
15 растения, толерантного к гербицидам, а также семена, полученные из растений, толерантных к гербицидам, и клетки, полученные из растений, толерантных к гербицидам, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает потомство или растение-потомок, происходящее из растения, содержащего по  
20 меньшей мере в некоторых из своих клеток полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функциональным в растительной клетке, причем промотор способен экспрессировать полипептид СРУ81Е, кодируемый полинуклеотидом, при этом потомство или растение-потомок содержит по меньшей мере в некоторых своих клетках рекомбинантный полинуклеотид, функционально связанный с промотором,  
25 экспрессирующим полипептид СРУ81Е, придающей потомству или растению-потомку толерантность к гербициду.

В одном варианте осуществления семена согласно настоящему изобретению предпочтительно обладают характеристиками толерантности к гербицидам растения,  
30 толерантного к гербицидам. В других вариантах осуществления семя способно прорасти в растение, содержащее, по меньшей мере, в некоторых из своих клеток полинуклеотид, функционально связанный с промотором, функциональным в растительной клетке, причем промотор способен экспрессировать полипептид

СУР81Е, кодируемый полинуклеотидом, при этом экспрессия полипептида СРУ81Е придает потомству или растению-потомку толерантность к гербицидам.

В некоторых вариантах осуществления растительные клетки согласно настоящему изобретению способны регенерировать растение или часть растения. В  
5 других вариантах осуществления растительные клетки не способны регенерировать растение или часть растения. Примеры клеток, не способных регенерировать растение, включают, без ограничения, эндосперм, семенную оболочку (тесту и перикарпий) и корневой чехлик.

Еще в одном варианте осуществления изобретение относится к растительной  
10 клетке, трансформированной нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид СРУ81Е, как раскрыто в настоящем документе, причем экспрессия нуклеиновой кислоты в растительной клетке приводит к повышенной резистентности или толерантности к гербицидам по сравнению с разновидностью растительной клетки дикого типа.

В нескольких вариантах осуществления предлагается растительный продукт, полученный из толерантных к гербицидам растений. В некоторых вариантах осуществления примеры растительных продуктов включают, без ограничения, зерно, масло и муку. В одном варианте осуществления растительный продукт представляет собой растительное зерно (например, зерно, пригодное для использования в качестве  
20 корма или для переработки), растительное масло (например, масло, пригодное для использования в качестве пищи или биодизельного топлива) или растительную муку (например, муку, пригодную для использования в качестве корма). Предпочтительный растительный продукт представляет собой корм для скота, семенную муку, масло или семена, покрытые оболочкой для обработки семян.  
25 Предпочтительно мука и/или масло содержат нуклеиновую кислоту СУР81Е или белок СУР81Е.

В некоторых вариантах осуществления предложен растительный продукт, полученный из растения или части растения, причем растение или часть растения содержит по меньшей мере в некоторых из своих клеток полинуклеотид,  
30 функционально связанный с промотором, функциональным в растительных клетках, при этом промотор способен экспрессировать полипептид СУР81Е, кодируемый

полинуклеотидом, а экспрессия полипептида СУР81Е придает растению или части растения толерантность к гербицидам.

5       Продукт может быть получен в месте, где растение было выращено, растения и/или их части могут быть удалены из места, где растения были выращены, для получения продукта. Обычно выращивают растение, удаляют с растения желаемые части, пригодные для сбора, по возможности в повторяющихся циклах, и изготавливают продукт из частей растения, пригодных для сбора. Этап выращивания растения может быть выполнен только один раз при каждом осуществлении способа, при этом допускается многократное повторение этапов получения продукта, 10       например, путем повторного удаления пригодных для сбора частей растений согласно изобретению и, при необходимости, дальнейшей переработки этих частей для получения продукта. Также возможно повторение этапа выращивания растений и сохранения пригодных для сбора растений до тех пор, пока накопленные растения или части растения не будут переработаны все сразу для получения продукта. Кроме того, 15       этапы выращивания растений и получения продукта могут быть выполнены с перекрытием по времени, причем даже в значительной степени одновременно, или последовательно. Обычно растения выращивают в течение некоторого времени, прежде чем получать продукт.

## 20    **Ауксиновые гербициды**

      Синтетические ауксиновые гербициды, также называемые ауксиноподобными, гербицидами регулятора роста или гербицидами группы 0 или группы 4, исходя из их механизма действия. Механизм действия синтетических ауксиновых гербицидов 25       заключается в том, что они, по-видимому, влияют на пластичность клеточных стенок и метаболизм нуклеиновых кислот, что может привести к неконтролируемому делению и росту клеток. В группу синтетических ауксиновых гербицидов входят четыре химических семейства: фенокси, карбоновая кислота (или пиридин), бензойная кислота, и новейшее семейство хиолинкарбоновых кислот.

      Фенонксигербициды наиболее распространены и используются в качестве 30       гербицидов с 1940-х годов, когда открыли (2,4-дихлорфенокси)уксусную кислоту (2,4-Д). В число других примеров входят 4-(2,4-дихлорфенокси)масляная кислота (2,4-ДМ), 2-(2,4-дихлорфенокси)пропановая кислота (2, 4-ДП), (2,4,5-

трихлорфенокси)уксусная кислота (2,4,5-Д), 2-(2,4,5-трихлорфенокси)пропионовая кислота (2,4,5-ТП), 2-(2,4-дихлор-3-метилфенокси)-N-фенилпропанамид (кломепроп), (4-хлор-2-метилфенокси)уксусная кислота (МЦПА), 4-(4-хлор-о-толилоки)масляная кислота (МХФК) and 2-(4-хлор-2-метилфенокси)пропановая кислота (МЦПП).

Следующим наиболее крупным химическим семейством являются гербициды на основе карбоновой кислоты. В число примеров входят 3,6-дихлор-2-пиридинкарбоновая кислота (клопиралид), 4-амино-3,5,6-трихлор-2-пиридинкарбоновая кислота (пиклорам), (2,4,5-трихлорфенокси)уксусная кислота (триклопир) и 4-амино-3,5-дихлор-6-фтор-2-пиридилоксиуксусная кислота (флуроксипир). Третье химическое семейство — это бензойные кислоты, в число примеров которых входят 3,6-дихлор-о-анисовая кислота (дикамба) и 3-амино-2,5-дихлорбензойная кислота (хлорамбен). Четвертым и самым новым химическим семейством ауксиновых гербицидов является семейство хинолинкарбоновой кислоты, в которое входят 7-хлор-3-метил-8-хинолинкарбоновая кислота (хинмерак) и 3,7-дихлор-8-хинолинкарбоновая кислота (хинклорак). Последнее семейство уникально тем, что оно также борется с некоторыми злаковыми сорняками в отличие от других ауксиноподобных гербицидов, которые в основном борются только с широколиственными или двудольными растениями.

Синтетические ауксиновые гербициды могут быть применены для борьбы с сорняками на участке для выращивания растений, содержащем растения и семена, полученные с помощью композиций и способов, описанных в настоящем документе. Растения и семена, полученные с помощью композиций и способов, описанных в настоящем изобретении, обладают признаком толерантности к ауксиновым гербицидам и как таковые толерантны к применению одного или более ауксиновых гербицидов. Гербициды могут применяться с рекомендуемой изготовителями нормой расхода (1×) или любой ее долей или кратно ей, например с удвоенной нормой расхода, рекомендуемой изготовителями (2×). Нормы расхода ауксиновых гербицидов могут быть выражены в фунтах кислотного эквивалента на акр (фунт кэ/акр), или в граммах кислотного эквивалента на гектар (г кэ/га), или в фунтах активного ингредиента на акр (фунт аи/акр), или в граммах активного ингредиента на гектар (г аи/га) в зависимости от гербицида и препаративной формы. Во время

применения гербицида участок для выращивания растений может содержать или не содержать сорные растения.

Гербицид может применяться последовательно или в виде баковой смеси одного, двух или комбинации из нескольких ауксиновых гербицидов или любого другого совместимого гербицида. Для борьбы с широким спектром двудольных сорняков, однодольных сорняков или и тех, и других на участках, содержащих растения, экспрессирующие белок СУР81Е, как описано в настоящем документе можно использовать многократное применение одного гербицида или двух или более гербицидов, в комбинации или по отдельности, например, в два приема (такие, как предпосевная обработка и послевсходовая обработка или предпосевная обработка и послевсходовая обработка) или в три приема (такие, как предпосевная обработка, довсходовая обработка и послевсходовая обработка или довсходовая обработка и две послевсходовые обработки).

#### 15 **Борьба с сорняками, резистентными к гербицидам**

В нескольких вариантах осуществления предложены композиции и способы борьбы с ростом резистентных к гербицидам сорняков на участке для культивирования растений путем приведения сорняков в контакт с композицией, содержащей полинуклеотид, который уменьшает экспрессию или активность полипептида СУР81Е.

Системная регуляция (например, системное подавление или прекращение экспрессии) мишеневого гена СУР81Е в растении может осуществляться путем местного нанесения на растение молекулы полинуклеотида с сегментом в нуклеотидной последовательности, по существу идентичным или по существу комплементарным последовательности из 18 или более смежных нуклеотидов либо в гене-мишени СУР81Е, либо в РНК, транскрибированной из гена-мишени СУР81Е, посредством чего композиция проникает внутрь растения и индуцирует системную регуляцию гена-мишени СУР81 за счет активации одноцепочечной РНК, которая гибридизируется к транскрибированной РНК, например матричной РНК.

Полинуклеотиды сконструированы для индуцирования системной регуляции или подавления эндогенного гена в растении и сконструированы так, чтобы они имели последовательность, по существу идентичную или по существу комплементарную

последовательности (которая может быть кодирующей последовательностью или некодирующей последовательностью) эндогенного гена СУР81Е резистентного растения или последовательности РНК, транскрибированной из эндогенного гена СУР81Е резистентного растения. «По существу идентичный» или «по существу комплементарный» означает, что полинуклеотиды (или по меньшей мере одна цепь двухцепочечного полинуклеотида) сконструированы для гибридизации в физиологических условиях в клетках растения с эндогенным геном или РНК, транскрибированной из эндогенного гена, для осуществления регуляции или подавления эндогенного гена.

10 В некоторых вариантах осуществления композиции и способы могут включать усиливающие проницаемость агенты и обработки для приведения поверхности растительной ткани, например, листьев, стеблей, корней, цветков или фруктов, в состояние для проникновения полинуклеотидов в растительные клетки. Переносу полинуклеотидов в растительные клетки может способствовать предварительное или  
15 одновременное нанесение полинуклеотида на растительную ткань. В некоторых вариантах осуществления усиливающий проницаемость агент наносят после нанесения полинуклеотидной композиции. Усиливающий проницаемость агент обеспечивает путь для полинуклеотидов через восковые барьеры кутикулы, устьице и/или клеточную стенку или мембранные барьеры в растительные клетки.  
20 Подходящие агенты, способствующие переносу композиции в растительную клетку, включают агенты, которые увеличивают проницаемость внешней части растения или которые увеличивают проницаемость растительных клеток для олигонуклеотидов или полинуклеотидов. Такие агенты, способствующие переносу композиции в растительные клетки, включают химический агент или физический агент или их комбинации.  
25

Химические агенты для приведения в нужное состояние включают: (a) поверхностно-активные вещества, (b) органический растворитель, или водный растворитель, или водные смеси органических растворителей, (c) окислительные агенты, (e) кислоты, (f) основания, (g) масла, (h) ферменты или их комбинации.

30 Варианты осуществления способа могут необязательно включать этап инкубации, этап нейтрализации (например, для нейтрализации кислоты, основания или окисляющего агента или для инактивации фермента). Такие агенты для приведения

растения в нужное состояние для проникновения полинуклеотидов наносят на растение любым удобным способом, например, распылением или покрытием порошком, эмульсией, суспензией или раствором; аналогичным образом молекулы полинуклеотида наносят на растение любым удобным способом, например, распылением или протиранием раствором, эмульсией или суспензией.

### **Средства обнаружения**

В нескольких вариантах осуществления предложен способ идентификации резистентного к гербицидам растения или его клеток или тканей. В некоторых вариантах осуществления способ включает использование праймеров или зондов, которые специфично распознают часть последовательности гена. В одном варианте осуществления способ основан на определении уровня экспрессии гена CYP81E в растении. В некоторых вариантах осуществления для количественного определения экспрессии гена CYP81E, который дифференциально экспрессируется в резистентных растениях по сравнению с чувствительными растениями до обработки, используют метод, основанный на ПЦР. Другими словами, базальные уровни экспрессии повышены у резистентных растений по сравнению с чувствительными растениями до обработки гербицидами.

В некоторых вариантах осуществления идентификацию выполняют с использованием полимеразной цепной реакции. Способ может также включать обеспечение обнаруживаемого маркера, специфичного для гена CYP81E. В вариантах осуществления обнаружение выполняют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) в режиме реального времени или метода РНК-гибридизации.

В одном варианте осуществления способ основан на присутствии ОНП между растениями S и R. Это может быть основано на флуоресцентном обнаружении ОНП-специфичных зондов гибридизации на продуктах ПЦР, таких как зонды TaqMan или молекулярные маяки. Другие стратегии, такие как системы генотипирования homogeneous Mass Extend (hME) от компании Sequenom и iPLEX, включают времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) ОНП-специфичных продуктов удлинения праймера при ПЦР.

Другие способы включают использование технологии KASP™, т. е., конкурентной аллель-специфичной ПЦР. Она основана на конкурентной аллель-специфичной ПЦР и позволяет выявлять однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), а также делеции и инсерции в конкретных локусах. Используют два аллель-специфичных прямых праймера, имеющих мишенную ОНП на 3'-конце, и для обоих используют общий обратный праймер. Праймеры имеют уникальную «хвостовую» последовательность (репортерную нуклеотидную последовательность), совместимую с различными флуоресцентными репортерами (репортерной молекулой). Праймеры контактируют с образцом наряду со смесью, которая включает в себя универсальную кассету резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) и полимеразу Taq. Во время циклического повторения раундов ПЦР хвостовые последовательности позволяют кассете FRET привязываться к ДНК и излучать флуоресценцию. См. Yan et al. «Introduction of high throughput and cost effective SNP genotyping platforms in soybean» *Plant Genetics, Genomic and Biotechnology* 2(1): 90 – 94 (2014); Semagn et al. «Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement» *Molecular Breeding* 33(1): 1 – 14 (2013). В настоящем процессе излучение одного флуоресцентного сигнала (репортерной молекулы) или другого указывает на принадлежность растения к одному из двух видов, тогда как присутствие обоих сигналов указывает на гибрид. Приведенные в настоящем документе примеры демонстрируют использование флуорофоров 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) и 6-карбоксихлоро-2',4',4'',5'',7'',7'''-гексахлорофлуоресцеин, однако могут быть использованы любые подходящие средства получения измеримого сигнала. Примеры, без ограничения, включают тетрахлорофлуоресцеин (TET); голубой флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, люциферазу, SyBR Green I; ViC; CAL Fluor Gold 540, ROX Texas Red; CAL Fluor Red 610; CY5; Quasar 670; Quasar 705 и Fret.

Таким образом, получают первый праймер, распознающий первую целевую нуклеотидную последовательность в геноме первого вида, получают второй праймер, распознающий вторую целевую нуклеотидную последовательность второго вида, а третий общий обратный праймер, универсальный для всех генотипов, делает возможной амплификацию. «Хвостовая» репортерная последовательность снабжена праймером. Экспрессионная кассета содержит последовательности,

комплементарные репортерной последовательности. По мере выполнения раундов ПЦР кассета больше на гаснет, и получается сигнал, который можно измерить.

Два набора праймеров KASP, рассчитанных на местоположение CYP81E, представлены в SEQ ID NO: 27–29 и 30–31. Праймеры для аллелей R метили флуорофором HEX, а аллели S метили FAM.

**ТАБЛИЦА 2**

1 Прямой_HEX (R)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCAATCTCTAGCC CAACGTTACGGT (SEQ ID NO: 27)
1 Forward_FAM (S)	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAATCTCTAGCC CAACGTTACGGC (SEQ ID NO: 28)
1 Обратный (5'-3')	CAACGGGCCTTGGTAGTTTC (SEQ ID NO: 29)
2 Прямой_HEX (R)	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTGGCAAACAGAC CAAAATTCATAGTAGGC (SEQ ID NO: 30)
2 Прямой_FAM (S)	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTGGCAAACAGAC CAAAATTCATAATAGGA (SEQ ID NO: 31)
2 Обратный (5'-3')	CTTATGGGGACTACTGGCGG (SEQ ID NO: 32)

В нескольких вариантах осуществления предложены наборы для идентификации резистентных к гербицидам растений, причем наборы содержат по меньшей мере два праймера или зонда, которые специфично распознают ген CYP81E. Например, праймеры были разработаны для амплификации и/или количественного определения гена CYP81E, связанного с последовательностью SEQ ID NO: 1. Путем оценки уровня экспрессии гена специалист в данной области может определить, взят ли образец растения из резистентного к гербицидам растения. В некоторых вариантах осуществления праймеры включают в себя последовательности SEQ ID NO: 5 и 6. Также предложены наборы для обнаружения присутствия ОНП между S и R. В некоторых вариантах осуществления праймеры содержат последовательности EQ ID NO: 27–29 или 30–32. В одном варианте осуществления набор включает в себя более одной пары праймеров. Набор может также включать в себя один или более положительных или отрицательных контролей.

В некоторых вариантах осуществления наборы включают в себя специфический зонд, имеющий последовательность, соответствующую или комплементарную последовательности, идентичность которой с конкретной

областью гена CYP81E составляет от 80% до 100%. В некоторых вариантах осуществления набор включает в себя специфический зонд, соответствующий или комплементарный последовательности, идентичность которой с конкретной областью гена CYP81E составляет от 90% до 100%.

5 Эти способы, наборы и праймеры могут быть использованы для различных целей, в том числе, без исключения, для следующих: выявления наличия или отсутствия резистентности к гербицидам в растениях, растительном материале, таком как семена или черенки; определения наличия резистентных к гербицидам сорняков на полях под культурой; и приспособления механизма гербицида для эффективной и  
10 экономичной борьбы с сорняками, влияющими на сельскохозяйственные культуры.

### **Использование в способах селекции**

Растения согласно настоящему изобретению, могут быть использованы в программе селекции растений. Целью селекции растений является объединение в  
15 одном сорте или гибриде различных желательных признаков. В случае полевых культур эти признаки могут включать, например, устойчивость к болезням и насекомым, устойчивость к жаре и засухе, устойчивость к похолоданию или заморозкам, сокращение времени созревания урожая, повышенную урожайность и лучшее агрономическое качество. При механической уборке многих культур  
20 желательно единообразие характеристик растений, таких как всхожесть и укоренение, скорость роста, зрелость, а также высота растений и колосьев. Традиционная селекция растений является важным средством в разработке новых и улучшенных товарных культур. Настоящее изобретение включает в себя способы получения растения путем скрещивания первого родительского растения со вторым родительским растением,  
25 причем одно или оба родительских растения являются растением, проявляющим фенотип, как описано в настоящем документе.

Методы селекции растений, известные в настоящей области и используемые в программе селекции растений, включают, без ограничения, рекуррентную селекцию, отбор в смеси, массовый отбор, обратное скрещивание, племенной отбор, селекция со  
30 свободным опылением, усовершенствованный отбор по полиморфизму длин фрагментов рестрикции, усовершенствованный отбор по генетическим маркерам, удвоенные гаплоиды и трансформация. Часто используют комбинации этих методов.

Выведение гибридов в программе селекции растений требует, как правило, выведения гомозиготных инбредных линий, скрещивания этих линий и оценки результатов скрещивания. Существует множество аналитических способов, доступных для оценки результата скрещивания. Самым старым и традиционным 5 способом анализа является наблюдение за фенотипическими признаками. В качестве альтернативы можно исследовать генотип растения.

Генетический признак, который был встроен в конкретное растение с использованием методов трансформации, может быть перенесен в другую линию с использованием традиционных методов селекции, которые хорошо известны в 10 области селекции растений. Например, для переноса трансгена из трансформированного растения в элитную инбредную линию обычно используют подход на основе обратного скрещивания, и полученное в результате потомство затем будет содержать трансген(-ы). Кроме того, если для трансформации использовалась инбредная линия, то трансгенные растения могли быть скрещены с другой инбредной 15 линией, чтобы получить трансгенное гибридное растение. Используемый в настоящем документе термин «скрещивание» может относиться к простому скрещиванию X и Y или процессу обратного скрещивания, в зависимости от контекста.

Выведение гибрида в рамках программы селекции растений включает три этапа: (1) отбор растений из различных пулов зародышевой плазмы для 20 первоначальных селекционных скрещиваний; (2) самоопыление отобранных растений от селекционного скрещивания в течение нескольких поколений для получения ряда инбредных линий, которые, хотя и отличаются друг от друга, передают признаки потомству и являются высокогомозиготными, и (3) скрещивание отобранных инбредных линий с различными инбредными линиями для получения гибридов. В 25 процессе инбридинга сила линий снижается. Сила восстанавливается при скрещивании двух различных инбредных линий для получения гибрида. Важным последствием гомозиготности и гомогенности инбредных линий является то, что гибрид, созданный скрещиванием определенной пары инбредных линий, всегда будет одним и тем же. После того, как выявлены инбредные линии, дающие отличный 30 гибрид, гибридное семя может воспроизводиться бесконечно долго до тех пор, пока сохраняется гомогенность инбредных родителей.

Растения согласно настоящему изобретению могут быть использованы для получения, например, простого гибрида, трехлинейного гибрида или двойного гибрида. Простой гибрид получается при скрещивании двух инбредных линии для получения потомства F1. Двойной гибрид получается из четырех инбредных линий, скрещенных попарно (A × B и C × D) с последующим повторным скрещивание двух гибридов F1 (A × B) × (C × D). Трехлинейный гибрид получают из трех инбредных линий, причем две скрещивают две инбредные линии (A × B), а затем полученный гибрид F1 скрещивают с третьей инбредной линией (A × B) × C. Большая часть гибридной силы и однородности, проявляемых гибридами F1, теряется в следующем поколении (F2). Поэтому семена, полученных из гибридов, потребляют, а не высаживают.

### **Варианты осуществления**

Следующие пронумерованные варианты реализации также образуют часть настоящего изобретения:

1. Модифицированное растение или его потомство, часть растения или растительная клетка, обладающие толерантностью к гербициду, причем модифицированное растение обладает повышенной экспрессией полинуклеотида, кодирующего полипептид цитохрома P450 81E (CYP81E), по сравнению с немодифицированным растением.

2. Модифицированное растение согласно варианту осуществления 1, которое содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид CYP81E.

3. Модифицированное растение согласно варианту осуществления 1 или 2, в котором последовательность полипептида CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

4. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–3, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид CYP81E, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

5. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–4, в котором последовательность полипептида СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 33–44.
- 5 6. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–5, в котором полинуклеотид функционально связан с промотором, функциональным в растительной клетке.
7. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–6, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.
- 10 8. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–7, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.
9. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–8, которое представляет собой двудольное растение.
- 15 10. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–9, которое представляет собой культурное растение.
11. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–10, которое представляет собой сою, хлопок, канолу, табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.
- 20 12. Модифицированное растение согласно любому из вариантов осуществления 1–11, которое дополнительно обладает вторым признаком толерантности к гербицидам.
- 25 13. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из: (а) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид СУР81Е, причем нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1; или (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид СУР81Е, причем полипептид СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%
- 30 идентичен последовательности SEQ ID NO: 2.

14. Молекула нуклеиновой кислоты согласно варианту реализации 13, которая представляет собой изолированную, синтетическую или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты.

5 15. Экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14, функционально связанную с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.

16. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14 или кассету экспрессии согласно варианту осуществления 15.

10 17. Полипептид СУР81Е, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

15 18. Растение, часть растения или растительная клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14; экспрессионную кассету согласно варианта 15; вектор согласно варианту осуществления 16; или полипептид согласно варианту осуществления 17.

20 19. Биологический образец, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14; экспрессионную кассету согласно варианта 15; вектор согласно варианту осуществления 16; или полипептид согласно варианту осуществления 17.

25 20. Способ получения растения с толерантностью к гербициду, включающий: повышение экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е в растении, причем гербицидная толерантность растения повышена по сравнению с растением, у которого отсутствует повышенная экспрессия.

30 21. Способ согласно варианту осуществления 20, включающий введение в растительную клетку полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е, причем этот полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке; и регенерирование растения из растительной клетки.

22. Способ согласно варианту осуществления 20 или варианту осуществления 21, в котором последовательность полипептида СУР81Е по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

23. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–22, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид CYP81E, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

24. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–23, в котором последовательность полипептида CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична любой из последовательностей SEQ ID NO: 33–44.

25. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–24, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

26. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–25, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.

27. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–26, в котором растение представляет собой двудольное растение.

28. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–27, в котором растение представляет собой культурное растение.

29. Способ согласно любому из вариантов осуществления 20–28, в котором растение представляет собой сою, хлопок, канолу, табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.

30. Способы борьб с нежелательной растительностью на участке для выращивания растений, включающий обеспечение на участке растения, которое содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид CYP81E, причем экспрессия этого полинуклеотида придает растению толерантность к гербициду; и нанесение на участок эффективного количества гербицида.

31. Способ согласно варианту осуществления 30, в котором последовательность полипептида CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

32. Способ согласно варианту осуществления 30 или варианту осуществления 31, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид

СУР81Е, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

33. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30–32, в котором  
5 полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.

34. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30–33, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

35. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30–34, в котором  
10 ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.

36. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30–35, в котором растение представляет собой двудольное растение.

37. Способ согласно любому из вариантов осуществления 30–36, в котором  
15 растение представляет собой сою, хлопок, канолу, табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.

38. Способ борьбы с ростом резистентного к гербициду сорняка на участке для выращивания растений, включающий: приведение сорняка в контакт с композицией, содержащей полинуклеотид, который уменьшает экспрессию или активность полипептида СУР81Е; и нанесение на участок эффективного количества гербицида.

39. Способ согласно варианту осуществления 38, в котором полинуклеотид  
20 представляет собой двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК или двухцепочечный гибридный полинуклеотид ДНК/РНК.

40. Способ согласно варианту осуществления 38 или варианту осуществления 39, в котором полинуклеотид содержит последовательность, по существу идентичную  
25 или по существу комплементарную по меньшей мере 18 или более смежным нуклеотидам последовательности SEQ ID NO: 1.

41. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–40, в котором полинуклеотид имеет длину 26–60 нуклеотидов.

42. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–41, в котором  
30 последовательность полипептида СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

43. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–42, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

44. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–43, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.

5 45. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–44, в котором сорняк представляет собой *Amaranthus tuberculatus*.

46. Способ согласно любому из вариантов осуществления 38–45, в котором композиция содержит агент, выполненный с возможностью обеспечения проникновения полинуклеотида с поверхности сорняка в клетки сорняка.

10 47. Продукт, полученный из растения, части растения или клетки растения согласно любому из вариантов осуществления 1–12, причем продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е.

48. Продукт согласно варианту осуществления 47, который представляет собой корм для скота, семенную муку, масло или семя, покрытое оболочкой для обработки  
15 семян.

49. Способ получения растительного продукта, включающий переработку растения или части растения согласно любому из вариантов осуществления 1–12 для получения растительного продукта, причем растительный продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е.

20 50. Способ согласно варианту осуществления 49, в котором растительный продукт представляет собой корм для скота, семенную муку, масло или семена, покрытые оболочкой для обработки семян.

51. Способ выявления резистентного к гербицидам растения, включающий обеспечение биологического образца из растения, потенциально являющегося  
25 резистентным к гербициду; количественное определение экспрессии гена СУР81Е в биологическом образце, причем ген СУР81Е дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с чувствительным к гербициду растением того же вида; и определение того, что растение резистентно к гербицидам, на основе количественного определения.

30 52. Способ согласно варианту осуществления 51, в котором биологический образец взят из *Amaranthus tuberculatus*.

53. Способ согласно варианту осуществления 51 или варианту осуществления 52, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

54. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51–53, в котором количественное определение экспрессии гена CYP81E включает количественное определение мРНК CYP81EA.

55. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51–54, в котором количественное определение экспрессии гена CYP81E включает количественное определение полипептида CYP81EA.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 51–55, в котором ген CYP81E имеет по меньшей мере четырехкратную дифференциальную экспрессию в резистентном к гербицидам растении по сравнению с чувствительным к гербицидам растением до применения гербицида.

57. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51–56, в котором последовательность гена CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

58. Способ согласно любому из вариантов осуществления 51–57, в котором количественное определение экспрессии включает амплификацию нуклеиновой кислоты с использованием по меньшей мере двух праймеров.

59. Способ по любому из вариантов осуществления 51–58, в котором по меньшей мере два праймера содержат последовательность SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.

60. Набор для выявления резистентного к гербициду растения, содержащий по меньшей мере два праймера, причем эти по меньшей мере два праймера распознают ген CYP81E, который дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с чувствительным к гербициду растением того же вида.

61. Набор согласно варианту осуществления 60, в котором последовательность гена CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

62. Набор согласно варианту осуществления 60 или варианту осуществления 61, дополнительно содержащий по меньшей мере один положительный контроль и один отрицательный контроль.

63. Набор согласно любому из вариантов осуществления 60–62, дополнительно содержащий компоненты раствора для количественной ПЦР в реальном времени.

64. Набор согласно любому из вариантов осуществления 60–63, в котором растение представляет собой *Amaranthus tuberculatus*, а гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в описании изобретения, указывают уровень специалиста в данной области, к которой относится это изобретение. Все публикации и патентные заявки в настоящем документе включены путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные путем ссылки.

Хотя вышеуказанное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примеров в целях ясности понимания, очевидно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

Следующие примеры приведены в качестве иллюстрации, но не для ограничения.

20

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1: Ответ резистентности**

Две популяции *A. tuberculatus*, демонстрирующие резистентность к ингибиторам HPPD и 2,4-Д, были выявлены как в Иллинойсе (обозначены как «CHR»)(Evans et al. 2019), так и в Небраске (обозначены как «NEB»)(Bernards et al. 2012). Резистентные к гербицидам растения из каждой популяции скрещивали с чувствительной к гербицидам популяцией *A. tuberculatus* (WUS; первоначально собранной в округе Браун, Огайо), и проводили скрининг семян F<sub>1</sub> для подтверждения резистентности как к ингибиторам HPPD, так и к 2,4-Д. Для скрининга этих популяций F<sub>1</sub> растения выращивали в ранее описанных тепличных условиях (Lillie et al., 2020) и опрыскивали начальной дискриминирующей дозой мезотриона (220 г аи·га<sup>-1</sup>; Callisto) плюс 1% об/об концентрата растительного масла с последующей

поздней последующей обработкой 2,4-Д (560 г кэ·га<sup>-1</sup>; 2,4-Д-амин) плюс 0,25% об/об неионного поверхностно-активного вещества. Все внесения гербицидов производили с использованием распылительной камеры с подвижным соплом, как описано ранее (Lillie et al., 2020). В каждой полученной из NEB и CHR линиях F<sub>1</sub> пары выживших растений F<sub>1</sub>, являющихся полными сибсами, скрещивали с образованием нескольких сегрегирующих псевдо-F<sub>2</sub> популяций. Поскольку *A. tuberculatus* является двудомным растением, растение F<sub>1</sub> не может самоопыляться с образованием истинной популяции F<sub>2</sub>.

Из NEB и CHR отбирали по одной популяции псевдо-F<sub>2</sub> (далее именуемой F<sub>2</sub>), и несколько сотен семян из каждой популяции F<sub>2</sub> проращивали в течение 48 часов на влажной фильтровальной бумаге в камере для выращивания, установленной на 12-часовой цикл день/ночь (35 °C/15 °C). Проросшие ростки пересаживали в горшки объемом 50 см<sup>3</sup>, заполненные Weed Lite Mix (смесь 3:1:1:1 из LC1 [Sun Gro Horticulture Canada]:почва:торф: крупнозернистый песок), и выращивали в теплице, пока растения не достигали высоты 4–6 см. После этого по сто растений из каждой популяции F<sub>2</sub> пересаживали в 3,8-литровые круглые горшки, наполненные смесью Weed Lite Mix, и оставляли расти до достижения растениями высоты 8–10 см. Затем из самых мелких полностью раскрывшихся листьев брали ткань, сразу же помещали в жидкий азот и хранили при температуре –80 °C до выделения РНК. Все ткани отбирали в течение двухчасового периода между 10 утра и полуднем одного и того же дня. Ткани брали до нанесения гербицида, и обработанные гербицидом ткани не входили в это исследование. Ввиду дифференциального воздействия обработки гербицидами на пути стресса и гибели резистентных и чувствительных растений (Giacomini и др, 2018) выявить потенциальные резистентные гены без использования протяженного (и дорогостоящего) исследования в зависимости от времени методом секвенирования РНК, чрезвычайно трудно.

Все растения F<sub>2</sub> продолжали расти в течение более трех недель до тех пор, пока каждое растение не дало множество боковых побегов, после чего боковые побеги срезали, окунали в стимулятор корнеобразования и пересаживали во вкладыши объемом 400-см<sup>3</sup> в плашках, заполненные влажной почвой. Эти плашки накрывали 15-см прозрачным пластмассовыми куполом (для поддержания высокой влажности) до образования у клонов хорошей корневой системы (~3–4 недели). Из каждого

растения получали четыре клона, и каждый клон обрабатывали либо ингибитором HPPD, либо 2,4-Д высокой или низкой дозой для фенотипирования каждой особи F<sub>2</sub> на множественную резистентность к гербицидам. Низкая и высокая нормы расхода ингибитора HPPD составляли 27 и 270 г темботриона·га<sup>-1</sup> (гербицида Лаудис),  
5 соответственно. Низкая и высокая нормы расхода 2,4-Д составляли 560 и 2240 г кэ·га<sup>-1</sup> (2,4-Д-амин), соответственно. На 14-й и 21-й день после обработки клоны визуальнo оценивали на повреждение гербицидами по шкале 1–10 (оценка 10 указывала на отсутствие повреждения растений).

Процедуру клонирования и опрыскивания повторяли еще на 70 растениях из  
10 каждой популяции для получения достаточных данных для точного критерия Фишера, чтобы оценить, сегрегируются ли два признака резистентности независимо друг от друга. Используя пороговое значение 3 по визуальной шкале оценок для оценки растений как чувствительных или резистентных, данные подсчета для каждой категории вводили в среду статистических вычислений R и анализировали с  
15 использованием `fisher.test (alternative = "two.sided")`.

На основании визуальных оценок клонов по обоим показателям на 21-й день после обработки растения F<sub>2</sub> были ранжированы в порядке от наименее до наиболее резистентных, как к темботриону, так и к 2,4-Д. В пределах каждой популяции F<sub>2</sub> растения группировали в четыре категории: (1) RR — резистентные к 2,4-Д и темботриону; (2) RS — резистентные к 2,4-Д и чувствительные к темботриону; (3)  
20 SR — чувствительные к 2,4-Д и резистентные к темботриону; и (4) SS — чувствительные к 2,4-Д и темботриону. По четыре наиболее резистентных и чувствительных растения в каждой категории (всего по шестнадцать растений из каждой популяции и 32 растения в общем итоге) выбирали для выделения РНК  
25 методом на основе Ttazol (Simms et al. 1993) с обработкой ДНКазой I после экстракции. Образцы проверяли на качество и количество, соответственно, прогоняя их на анализаторе Qubit и на 1%-м агарозном геле перед отправкой в Биотехнологический центр Роя Дж. Карвера при Университете Иллинойса, Урбана-Шампейн, чтобы создать библиотеки для секвенирования на платформе Illumina.

30 Библиотеки для секвенирования РНК получали с использованием набора для подготовки образцов Illumina TruSeq Stranded mRNAseq Sample Prep. Библиотеки количественно оценивали с помощью кПЦР и секвенировали на четырех дорожках в

системе HiSeq 4000 с использованием набора для секвенирования HiSeq 4000 версии 1. С помощью программного обеспечения преобразования bcl2fastq v2.17.1.14 (Illumina) получали и демультиплексировали файлы в формате FASTQ. Адапторы обрезали с 3'-конца прочтений, и любые начальные или концевые основания с оценкой качества ниже 30 обрезали с помощью Trimmomatic-0.33, оставляя только прочтения длиной 30 пар оснований или более (Bolger et al. 2014).

Файлы обрезанных прочтений в каждой подгруппе (RR, RS, SR и SS) конкатенировали и собирали с использованием Trinity v2.1.0 (Grabherr et al. 2011). Все четыре итоговые сборки сравнивали друг с другом и объединяли в группы транскриптов с использованием CD-HIT (Li & Godzik 2006). Самый длинный транскрипт из каждой группы использовали в качестве представителя группы, формируя конечный референсный транскриптом.

Данные по дозозависимому эффекту из прошлой работы показали примерно 15-кратный уровень резистентности к мезотриону и 9-кратную резистентность к 2,4-Д для популяции CHR по сравнению с WUS (Evans et al. 2019). Сообщалось об аналогичном уровне резистентности к 2,4-Д в популяции NEB, что в 10 раз больше резистентности чувствительной к 2,4-Д популяции из Небраски (Bernards et al. 2012), чувствительность которой была восстановлена путем предварительной обработки ингибитором цитохрома P450 малатионом (Figueiredo et al. 2018). Что касается темботриона, мы наблюдали 43-кратную резистентность в популяции CHR и 15-кратную в популяции NEB по сравнению с WUS (Murphy и Tranel, 2019). В обеих популяциях CHR и NEB резистентность к темботриону и 2,4-Д, по-видимому, сегрегировались независимо ( $p$ -значение = 0,2457 и 0,1457, соответственно). Отбирая по четыре растения  $F_2$  с каждым признаком резистентности (RR, RS, SR и SS), мы смогли получить для каждой популяции восемь повторных сравнений по каждому из двух признаков резистентности на всего лишь 16 растениях (ФИГ. 1).

### **Пример 2: Дифференциальный анализ транскриптов и экспрессии гена**

Каждый образец выравнивали с референсной сборкой транскриптома с использованием kallisto (Bray et al. 2016) со следующими параметрами: -b 100 --bias -single --rf-stranded -l 255 -s 40. Эти псевдовыравнивания затем анализировали на предмет дифференциальной экспрессии с использованием Sleuth (Pimentel et al. 2017)

с оценкой чувствительности к гербицидам (R в сравнении с S) в качестве условия. Анализ с использованием Sleuth проводили для всех четырех сравнений: резистентности и чувствительности к темботриону для популяции NEB, резистентности и чувствительности к темботриону для популяции CHR, резистентности и чувствительности к 2,4-Д для популяции NEB и резистентности и чувствительности к 2,4-Д для популяции CHR (n = 8). Далее транскрипты картировали на модели генов из референсной сборки генома *A. hypochondriacus* (Lightfoot et al. 2017; Genbank accession GCA\_000753965.1) для вычисления дифференциальной экспрессии на уровне гена и привязки генов к каркасам, потенциально выявляя любую физическую кластеризацию дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ). Для выравнивания транскриптов на геном с учетом сплайсинга использовали GMAP (Wu & Watanabe 2005) (--cross-species -n 1 --min-trimmed-coverage=0.80 --min-identity=0.80). Затем эту таблицу картирования ген-транскрип ввели в программный пакет Sleuth, который выполнял повторный прогон в режиме гена, чтобы вычислить дифференциальную экспрессию гена между когортами, резистентными и чувствительными к гербицидам. Гены, у которых значение с поправкой Беньямини-Хохберга (Benjamini & Hochberg 1995) меньше или равно 0,1, рассматривали как ДЭГ и использовали для дальнейшего анализа.

Транскриптом собрали из 57 106 транскриптов общей длиной 98 112 700 пар оснований. Все 32 библиотеки (по 16 для каждой популяции) секвенировали до минимум 40 миллионов прочтений на образец (общее количество секвенированных прочтений составляло от 40 800 978 до 54 938 593 пар оснований). Свыше 80% считываний выравнивали на транскриптом для каждого образца со средним выравниванием 81,3% по всем библиотекам, что дало приблизительно 40-кратное покрытие всего транскриптома.

Для популяции CHR F<sub>2</sub> было 39 дифференциально экспрессируемых транскриптов (ДЭТ) между резистентными к 2,4-Д и чувствительными к 2,4-Д растениями и 121 ДЭТ между резистентными и чувствительными к темботриону растениями. В популяции NEB F<sub>2</sub> было обнаружено, что 1445 транскриптов являются дифференциально экспрессируемыми между резистентными и чувствительными к 2,4-Д растениями и 115 между резистентными и чувствительными к темботриону растениями.

Из дифференциально экспрессируемых генов, выявленных из данных для всех четырех сравнений, были определены наиболее вероятные кандидаты на резистентность к гербицидам на основе их относительного ранга, кратного изменения экспрессии и аннотации гена как возможного гена метаболической резистентности, что подтверждается предыдущими публикациями, предполагающими механизм резистентности на основе метаболизма гербицида для этих популяций (Figueiredo et al., 2018; Evans et al., 2019).

Для каждого потенциально пригодного гена были разработаны праймеры для количественной ПЦР (ТАБЛИЦА 3). Праймеры также создавали для шести генов «домашнего хозяйства», и для всех наборов праймеров вычисляли эффективности ПЦР с использованием 5-этапного последовательного разведения кДНК по логарифмической шкале. Только наборы праймеров с эффективностью ПЦР близкой к 100% (+/-5%) оставляли и использовали для дальнейшего анализа.

15

**ТАБЛИЦА 3**

Наименование	Последовательность
CYP81E8_qF	GТАСТТТGATTGAACAGTTGCTGGATTTC (SEQ ID NO: 5)
CYP81E8_qR	AGGTTTCGTGCTGTGGTTTCTGATC (SEQ ID NO: 6)
ABCC10_qF	TGTGGAGAAGTAGGCTCTGGAAAATCA (SEQ ID NO: 7)
ABCC10_qR	TCCGACCATAAACTTCAACAGTGCCT (SEQ ID NO: 8)
CYP71A1_qF	GGTGTTACAATGGATCATATTGGTGTCAAAGC (SEQ ID NO: 9)
CYP71A1_qR	GATGCCTTAATAGTTCTGCCATTGTCCATTC (SEQ ID NO: 10)
CYP72A219_qF	TCAAACCCACTCATAAAGAAGGTCGCAC (SEQ ID NO: 11)
CYP72A219_qR	TCATCTCATTAGAACTTTCCCACATTGCTG (SEQ ID NO: 12)
BTBTOZ_qF	GATCCATATCAATTCAAGGTGTCCCACATG (SEQ ID NO: 13)
BTBTOZ_qR	GGAACAACATACACATGCGACAATACCAG (SEQ ID NO: 14)
CYP97B2_qF	ACCGAAAGCATTGTGTCGTTGTCTCG (SEQ ID NO: 15)
CYP97B2_qR	TGGGTTGGAGGATTTCAAGCAAGAACT (SEQ ID NO: 16)
ABC111_qF	TGGACGAAGTGGCAGTGGAAAGA (SEQ ID NO: 17)
ABC111_qR	ACGCCCATCCTCTCCATATCCTTGT (SEQ ID NO: 18)
UDPflav_qF	ACCATCATCGTCGGTTGTGTTTCTCT (SEQ ID NO: 19)
UDPflav_qR	TCCTCCAACCCTTTCGCAATCTCTT (SEQ ID NO: 20)
GAPDH_qF	GTGGTGCCAAGAAGGTTGTCATTT (SEQ ID NO: 21)
GAPDH_qR	AGGGAGCAAGGCAGTTGGTG (SEQ ID NO: 22)
EF1alpha_qF	CGTGTGATTGAAAGATTTGAGAAGGAAGC (SEQ ID NO: 23)
EF1alpha_qR	ATACCACGCTCACGCTCTGCT (SEQ ID NO: 24)
60S-RBP_qF	CTTGTGAGAAGAAGTGGTAGCAAA (SEQ ID NO: 25)
60S-RBP_qR	GТАСТТААТCAGCCTAGACAAAGAAAGG (SEQ ID NO: 26)

Для подтверждения правильности результатов дифференциального анализа отбирали подмножество растений F<sub>2</sub>, полученных как из популяции CHR, так и из популяции NEB (n = 14), включая особи, которые использовались и не использовались в РНК-сек. Из всех образцов выделяли РНК с использованием метода

Trizol (описанного ранее), и РНК преобразовывали в кДНК с использованием набора для синтеза ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB). На каждом образце для каждого набора праймеров по три раза выполняли количественную ПЦР путем объединения 5 мкл iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,5 мкл прямого праймера (10 мкМ), 0,5 мкл обратного праймера (10 мкМ), 3 мкл безнуклеазной вода и 1 мкл кДНК. Три гена «домашнего хозяйства» прогоняли на каждой планшете для каждого образца для использования их в качестве эндогенных контролей, и анализы проводили по 2–3 раза, чтобы обеспечить согласованные результаты. Вычисляли относительную экспрессию с использованием метода  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001) с чувствительными родителями (WUS) в качестве контрольного образца. Затем к этим значениям экспрессии применяли регрессию по отношению к значениям фенотипического рейтинга в R (статистика v3.6.1), чтобы проверить наличие значимой линейной зависимости для каждой популяции.

Один из наиболее значимо дифференциально экспрессируемых транскриптов в популяции CHR для толерантности к 2,4-Д представлял собой цитохром P450 (CYP81E8), также идентифицированный как изофлавоон-2'-гидроксилаза. Было также обнаружено, что этот же цитохром P450 значимо сверхэкспрессируется в толерантных к 2,4-Д растениях популяции NEB, что указывает на возможный общий механизм толерантности между этими двумя популяциями, несмотря на их разное географическое происхождение. Анализ с использованием количественной ПЦР подтвердил сверхэкспрессию CYP81E8, выявив сильные корреляции между его экспрессией и фенотипическим откликом на 2,4-Д для обеих популяций (ТАБЛИЦА 4). Другие предполагаемые гены устойчивости подвергались тому же процессу проверки правильности с помощью кПЦР, подтверждая более высокую экспрессию глюкозилтрансферазы (UDP-глюкоза флавоноид 3-О-глюкозилтрансфераза) в растениях NEB, толерантных к ингибитору HPPD. Было также подтверждено, что ABC-транспортер, который выявился в качестве ДЭТ в популяции CHR для темботриона, коррелировал не только с резистентностью к ингибитору HPPD, но и с резистентностью к 2,4-Д в обеих популяциях. Все гены также исследовали на увеличение числа геномных копий с помощью анализа на основе кПЦР, и никаких доказательств дупликации генов ни для одного из этих ДЭТ обнаружено не было.

**ТАБЛИЦА 4.** Линейная регрессия данных экспрессии кПЦР-РВ для каждого гена в зависимости от фенотипических оценок повреждения для каждой популяции (CHR и NEB) и каждого химиката (HPPD и 2,4-Д). Значимые р-значения указаны; НЗ — незначимые.

Ген	HPPD		2,4-Д	
	CHR	NEB	CHR	NEB
ABC11	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
CYP81E8	НЗ	НЗ	0,021	0,008
ABCC10	НЗ	0,036	0,034	0,018
UDPflav	НЗ	0,047	НЗ	НЗ
CYP97B2	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
CYP71A1	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
CYP72A219	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ
VTBTOZ	НЗ	НЗ	НЗ	НЗ

Дифференциальную экспрессию также измеряли на уровне генов, чтобы (1) увеличить мощность и удалить любую сбивающую с толку информацию из-за второстепенных изоформ транскрипта и (2) иметь впоследствии возможность картирования генов на геном для пространственного профилирования экспрессии генов. В случае популяции CHR были получены 90 и 31 дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) для сравнения 2,4-Д и сравнения темботриона, соответственно. Опять же, популяция NEB дала более высокие числа, — 676 ДЭГ, найденные для сравнения 2,4-Д, и 268 ДЭГ, найденные для сравнения темботриона.

15

### Пример 3. Кластерный анализ коэкспрессии

Значимую кластеризацию ДЭГ проверяли с использованием CROC (Pignatelli et al. 2009). CROC ищет кластеры с использованием гипергеометрического критерия, который вычисляет вероятность получения  $k$  ДЭГ (из общего количества  $n$  генов), присутствующих в скользящем окне вдоль каждого каркаса. Использовали окно размером 1 млн. пар оснований и размер сдвига 500 тыс. пар оснований, определяя значимые кластеры только тогда, когда р-значение с поправкой (FDR) было меньше

20

0,05. Подход со скользящим окном использовали для визуализации кластеризации вдоль 16 самых длинных каркасов с использованием R v3.5.1 (R Core Team 2018). С использованием пользовательского R-скрипта и при выборе размера окна 500 тыс. оснований и размере шага 500 тыс. оснований подсчитывали количество ДЭГ в каждом окне и наносили на график.

Кроме того, было проверена избыточная представленность ДЭГ на уровне всей хромосомы путем суммирования количества ДЭГ на каждой хромосоме и сравнения их с ожидаемым количеством ДЭГ на этой хромосоме с использованием точного критерия Фишера в R. Вычисляли p-значения с поправкой (p.adjust, method = 'bonferroni').

Было обнаружено, что дифференциально экспрессируемые гены между резистентными и чувствительными к 2,4-Д биотипами обеих популяций CHR и NEB физически кластеризуются вместе в нескольких хромосомных областях. Анализ CROC обнаружил значимую кластеризацию в области каркаса 4 для обеих популяций и значимую область в каркасе 7 для популяции NEB (ТАБЛИЦА 5; ФИГ. 2А). Между резистентными и чувствительными к HPPD растениями значимой кластеризация ДЭГ в областях не наблюдалось, однако точный критерий Фишера для избыточной представленности ДЭГ по всем каркасам на уровне всей хромосомы показал значительно более высокие количества ДЭГ, чем ожидалось на каркасах 6 и 13 для NEB. Этот анализ избыточной представленности также выявил значимую кластеризацию, ранее найденную для сравнений 2,4-Д на каркасе 4 (для CHR и NEB) и каркасе 7 (для NEB), а также кластеризацию на каркасе 13 для NEB. Возможно, что низкие объемы выборки (n = 8) были недостаточны для адекватного разрешения кластеров коэкспрессии при сравнениях HPPD.

**ТАБЛИЦА 5.** Хромосомное кластерное тестирование (с использованием CROC; Pignatelli et al. 2009) дифференциально экспрессируемых генов в CHR и NEB на резистентность к 2,4-Д.

Каркас	Популяция	Начало	Остановка	P-значение с поправкой
Каркас_4	CHR	3469336	6412488	0,0058
Каркас_4	NEB	3002834	9781978	1,37E-06
Каркас_7	NEB	14666782	16050619	0,0021

#### Пример 4: ОНП, специфичные к условиям

Однонуклеотидные полиморфизмы определяли с использованием наилучших практик, изложенных в GATK v3.7 (Van der Auwera et al. 2013). Очищенные прочтения из каждого образца РНК-сек сначала картировали на геном *A. hypochondriacus* с помощью STAR v2.5.3 (Dobin et al. 2012) со следующими параметрами: --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --quantMode TranscriptomeSAM GeneCounts --sjdbGTFtagExonParentTranscript Parent. Назначали группы прочтений и удаляли дубликаты ПЦР с использованием Picard Tools v1.95 (The Broad Institute 2019) с последующим жестким обрезанием последовательностей, которые распространялись на интронные области, с помощью средства GATK SplitNCigarReads. Для исправления любой систематической ошибки качества каждого выровненного основания, запускали GATK BaseRecalibrator с использованием набора высококачественных ОНП. Поскольку для *A. tuberculatus* не существует высококачественных баз данных ОНП, из данных, сформированных в настоящем документе создавали набор, сначала выполнив первоначальный раунд определения вариантов на неоткалиброванных данных с использованием функций HaplotypeCaller и GenotypeGVCFs из пакета GATK, затем жесткую фильтрацию ОНП с использованием следующих параметров: QD < 2.0; FS > 60.0; MQ < 40.0; MQRankSum < -12.5; ReadPosRankSum < -8.0. После повторной калибровки оснований снова выполняли определение вариантов, на этот раз на откалиброванных данных, используя функции HaplotypeCaller (параметры: -dontUseSoftClippedBases -stand\_call\_conf 20.0 --variant\_index\_type LINEAR --variant\_index\_parameter 128000 -ERC GVCF) и Genotype GVCFs. Из окончательного файла вариантов выделяли ОНП и фильтровали для включения только тех ОНП, которые были двухаллельными, и которые соответствовали следующим параметрам: -window 35 -cluster 3 -filter QD < 2.0 -filter FS > 30.0.

Из этого окончательного набора данных ОНП определяли ОНП, специфичные для условий, с использованием ассоциативного анализа случай/контроль в PLINK v1.9 (Chang et al. 2015; Steiß et al. 2012). Из-за малого объема выборки для каждого сравнения резистентных к гербицидам с чувствительными (n = 8) в рамках этого ассоциативного анализа также применяли адаптивный критерий перестановок методом Монте-Карло с 1000 итерациями. ОНП, которые отличались между

растениями R и S со скорректированным р-значением 0,05 или меньше, определяли как ОНП, специфичные для условий. Что касается ДЭГ, для визуализации этих специфичных для условий ОНП использовали подход со скользящим окном с размером окна 500 тыс. оснований и размером шага 500 тыс. оснований.

5           Для определения наличия каких-либо специфичных к резистентности ОНП в этих популяциях определили ОНП по всем генам, и с помощью точного теста Фишера в PLINK v1.9 выявили специфичные для условий ОНП (те, которые варьировались между резистентными и чувствительными растениями). При использовании скорректированного р-значения отсечения, равного 0,05, обнаружили, что 10 и 192

10 ОНП были связаны с резистентностью в сравнениях резистентных и чувствительных к 2,4-Д растениях для CHR и NEB, соответственно. Было обнаружено, что в обеих популяциях ОНП кластеризовались в тех же областях, в которых была обнаружена кластеризация ДЭГ. В CHR 9 из 10 ОНП были обнаружены в области каркаса 4, которая содержала ген CYP81E8, тогда как остальной ОНП был обнаружен на каркасе

15 6. В пределах кластера каркаса 4 находились значимые ОНП, обнаруженные как в гене CYP81E8, так и в гене-носителе оттока ауксина PIN3 (что интересно, это при том, что 2,4-Д является синтетическим ауксином). Однако резистентность к 2,4-Д не может быть отнесена на счет какого-либо из этих ОНП, поскольку они находятся в неравновесном сцеплении друг с другом, что затрудняет определение

20 местонахождения причинного варианта. В настоящее время проводится тонкое картирование этой области. В NEB 182 ОНП были обнаружены в области каркаса 4, 6 были обнаружен в области каркаса 7, которая также показала кластер ДЭГ при анализе экспрессии, а остальные 4 ОНП были рассеяны по всем каркасам 1, 2 и 16. Графики скользящего окна иллюстрируют кластеризацию этих ОНП и, по сравнению с

25 графиками скользящего окна ДЭГ, демонстрируют совместную встречаемость кластеризации ДЭГ и ОНП (**ФИГ. 2В**). Между резистентными и чувствительными растениями для сравнений HRPD значимых ОНП не обнаружили. Причина отсутствия кластеризации ОНП в сравнениях HRPD может быть обусловлена более сложным характером этого признака резистентности, поскольку было документально

30 подтверждено, что он является многогенным признаком в этих популяциях (Murphy and Tranel, 2019).

### Пример 5: Анализ аллель-специфичной экспрессии

Учитывая совместную встречаемость как дифференциальной генной экспрессии, так и специфичных для условий ОНП в нескольких областях генома, была проверена гипотеза аллель-специфичной экспрессии с использованием данных подсчета прочтений для каждого специфичного для условий ОНП, чтобы выявить все гетерозиготные особи (те, которые показали экспрессию каждого аллеля). Поэтому гомозиготные резистентные и чувствительные растения на каждом сайте ОНП использовали для классификации каждого ОНП как R или S, затем данные подсчета каждого R- или S-ассоциированного ОНП в гетерозиготных особях использовали для проверки значимой разницы в глубине прочтения между ОНП типа R и S с использованием R (rstatix). ОНП и связанные с ними скорректированные p-значения (Беньямини и Хохберг,  $p = 0,1$ ) наносили на график для всей области кластера каркаса 4 с использованием R (ggpubr).

Кластеризация специфичных для условий ОНП с областями дифференциальной генной экспрессии предполагала возникновение аллель-специфичной экспрессии. Аллель-специфичная экспрессия (АСЭ) определяется как форма аллельного дисбаланса, при котором один родительский аллель преимущественно экспрессируется по сравнению с другим аллелем (Knight 2004). Было обнаружено, что в кластере каркаса 4 девять ОНП статистически значимо дифференциально экспрессируются для NEB (ФИГ. 3А). Для всех, кроме одного, аллель R имел значительно более высокую экспрессию, чем аллель S, что, возможно, свидетельствует о некотором цис-действующем факторе, связанном с этой областью, который контролирует экспрессию. Для популяции CHR было четыре ОНП, которые встречались в этой области каркаса 4 в гетерозиготных особях, и три показывали значимо дифференциальную экспрессию между двумя аллелями (ФИГ. 3В), причем и в этом случае аллель R демонстрировал более высокую экспрессию, чем аллель S. АСЭ может также встречаться в других местах этой области, но в данный анализ были включены только те ОНП, которые, как было обнаружено, встречаются в гетерозиготном состоянии у трех или более особей.

30

### Пример 6: Филогенетический анализ цитохрома 81E8

Обе популяции, CHR и NEB, продемонстрировали положительно регулируемый аллель гена CYP81E8 на резистентность к 2,4-Д, что поднимает вопрос о том, развился ли этот предполагаемый резистентный аллель независимо в каждой популяции или нет. С использованием ранее опубликованного (Kreiner et al. 2019) набора данных целой геномной последовательности образцов *A. tuberculatus* из Иллинойса и Канады было построено филогенетическое дерево для исследования эволюционной взаимосвязи CYP81E8 из каждой популяции. Полный геном или полные наборы данных транскриптома выравнивали на кодирующую последовательность (CDS) CYP81E8 с использованием bowtie2 (Langmead & Salzberg 2012) (параметры: --no-unal -t -L 20). Затем отсортированные файлы в формате BAM подавали в тот же конвейер GATK SNP, описанный выше, для формирования файла в формате VCF. Пакет SNPRelate в R преобразовал этот файл VCF в файл GDS, который мог быть затем использован для формирования дендрограммы на основе сходства (snpgdsHCluster; snpgdsCutTree, n.perm = 5000).

Филогенетический анализ гена CYP81E8 выявил эволюционное родство каждого аллеля CYP81E8 из обеих популяций, CHR и NEB, и из других популяций *A. tuberculatus* из Иллинойса, Миссури и Канады. Аллели CYP81E8 из CHR и NEB разделили на три группы, представляющие (1) чувствительный к 2,4-Д аллель из NEB, (2) чувствительный к 2,4-Д аллель из CHR и (3) резистентный к 2,4-Д аллель как в CHR, так и в NEB (ФИГ. 4). Разделение чувствительных аллелей дикого типа из CHR и NEB наряду с тесной кластеризацией связанного с резистентностью к 2,4-Д CYP81E8 из CHR и NEB представляет хорошие доказательства того, что аллель R в обеих популяциях имеет общее эволюционное происхождение.

## Обсуждение примеров 1–6

В этих примерах для 2,4-Д в популяциях CHR и NEB были найдены имеющие наибольшие шансы потенциально пригодные гены для основанной на метаболизме резистентности к гербицидам. Как цитохром P450 (CYP81E8), так и ABC-транспортер (ABCC10) продемонстрировали постоянную сверхэкспрессию в резистентных к 2,4-Д растениях по сравнению с чувствительными к 2,4-Д растениями. Эти результаты подтверждают более раннюю работу, которая показала, что резистентность к 2,4-Д в популяции NEB, по-видимому, была опосредована цитохромом P450, поскольку

ингибитор цитохрома P450 малатион обращал фенотип резистентности (Figueiredo et al., 2018). Предполагаемый аллель резистентности этого гена совместно сегрегирован с дополнительными резистентными растениями из популяций F<sub>2</sub>, и в настоящее время проводится тонкое картирование.

5 Однако наши результаты по резистентности к ингибиторам HPPD были менее очевидны. Было подтверждено, что один потенциально пригодный ген, UDP-глюкоза флавоноид 3-О-глюкозилтрансфераза, сверхэкспрессируется в резистентных к темботриону растениях по сравнению с чувствительными к темботриону растениями. Первичная функциональная аннотация этого гена показывает, что он участвует в  
10 созревании плодов, но дополнительная работа показала, что он, возможно, участвует в метаболизме ксенобиотиков путем гликозилирования экзогенных веществ (Greisser et al., 2008). Отсутствие дополнительных потенциально пригодных генов для резистентности к ингибиторам HPPD может быть связано с его мультигенной природой (Oliveira et al., 2018), что затрудняет выявление локусов резистентности.  
15 Кроме того, наш подход на основе РНК-сек был сосредоточен главным образом на выявлении генов, способствующих резистентности, посредством конститутивной дифференциальной экспрессии, при этом могли быть упущены другие придающие резистентность изменения между растениями. Недавнее исследование РНК-сек, изучающее резистентность к мезотриону у *A. tuberculatus*, включало обработанные  
20 растения и обнаружило некоторые доказательства индуцированной экспрессии цитохрома P450a у резистентных растений по сравнению с чувствительными растениями (Kohlhase et al., 2019). Однако окончательный список дифференциально экспрессируемых транскриптов в этом исследовании содержал ~4800 транскриптов, что затрудняет выявление генов, вызывающих резистентность. В настоящее время  
25 ведется работа с использованием подхода на основе генетического картирования для выявления генов резистентности к ингибиторам HPPD в популяциях NEB и CHR.

В этой работе выявление сетей коэкспрессии не проводилась в широких масштабах из-за того, что растения не обрабатывались гербицидом перед РНК-сек. Без этой общей обработки анализ коэкспрессии вряд ли дал бы что-то значимое,  
30 поскольку он измерял бы случайные различия экспрессии в двух популяциях. Действительно, первые попытки исследовать сети коэкспрессии не дали информативных результатов.

В дополнение к выявлению потенциально пригодных генов резистентности к гербицидам эти данные также дают некоторое понимание регуляции резистентности к гербицидам. Физическая кластеризация ДЭГ, наблюдаемая для устойчивости к 2,4-Д, свидетельствует о коэкспрессии солокализованных генов, явление, которое  
5 наблюдалось у многих других видов, включая дрожжи (Cohen et al. 2000), *Arabidopsis* (Williams & Bowles 2004), *C. elegans* (Chen & Stein 2006) и человека (Trinklein et al. 2004). Хотя некоторые из этих примеров кластеризации коэкспрессии обнаружены между соседними парами генов, также сообщалось о коэкспрессии через более  
10 длинные хромосомные интервалы (Lercher & Hurst 2006; Reimegård et al. 2017). Способность гербицидов изменять геномный ландшафт сорных видов была недавно документально подтверждена у *Ipomoea purpurea*, причем свидетельства селективного выметания обнаруживались в пяти областях генома в популяциях, резистентных к глифосату (Van Etten et al., 2020). Интересно, что в этих областях было очевидно обогащение генами детоксикации гербицидов.

15 Одним из главных следствий этого кластеризации является вероятность наличия общего механизма регуляции генов для этих областей. Регуляция экспрессии генов — это сложный процесс, включающий избирательное взаимодействие факторов транскрипции с энхансерами, открытие и закрытие хроматина для  
20 обеспечения/предотвращения транскрипции, а также взаимодействие между этими двумя процессами (Voss & Hager 2014). Мы исследовали расположенные выше по ходу трансляции области всех ДЭГ и искали избыточную представленность сайтов связывания транскрипционных факторов (TFBS), но не обнаружили никаких доказательств наличия общих энхансерных элементов. Предыдущая работа, в которой  
25 исследовали механизмы регуляции физически кластеризованных коэкспрессируемых генов, показала, что пары коэкспрессируемых генов часто регулируются общими транскрипционными факторами, в то время как на более крупные области общей экспрессии в 10–20 генах влияет изменение структуры хроматина (Batada et al. 2007). Однако до сих пор было изучено лишь несколько примеров, и взаимозависимый  
30 характер регуляторных механизмов затрудняет установление непосредственных причин экспрессии генов. В любом случае, необходимо продолжить работу с этими популяциями, чтобы определить влияние состояния хроматина на паттерны экспрессии генов.

## Формула изобретения

1. Модифицированное растение или его потомство, часть растения или растительная клетка, обладающие толерантностью к гербициду, причем модифицированное растение обладает повышенной экспрессией полинуклеотида, кодирующего полипептид цитохрома P450 81E (CYP81E), по сравнению с немодифицированным растением.  
5
2. Растение по п. 1, которое содержит гетерологичный полинуклеотид, кодирующий полипептид CYP81E.  
10
3. Растение по п. 1, в котором последовательность полипептида CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.
- 15 4. Растение по п. 1, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид CYP81E, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Растение по п. 1, в котором полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.
6. Растение по п. 1, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.
- 25 7. Растение по п. 6, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.
8. Растение по п. 1, которое представляет собой двудольное растение.
9. Растение по п. 1, которое представляет собой культурное растение.
- 30 10. Растение по п. 1, которое представляет собой сою, хлопок, канолу, табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.

11. Растение по п. 1, которое дополнительно обладает вторым признаком толерантности к гербицидам.
- 5 12. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из:
- (a) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид СУР81Е, причем нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99%
- 10 идентична последовательности SEQ ID NO: 1; или
- (b) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид СУР81Е, причем полипептид СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2.
- 15
13. Молекула по п. 12, которая представляет собой изолированную, синтетическую или рекомбинантную молекулу нуклеиновой кислоты.
14. Экспрессионная кассета, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12,
- 20 функционально связанную с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.
15. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12.
- 25 16. Биологический образец, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 12.
17. Растение, часть растения или растительная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 12.
- 30 18. Полипептид СУР81Е, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по

меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

19. Способ получения растения с толерантностью к гербицидам, включающий:

5 повышение экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е в растении, причем гербицидная толерантность растения повышена по сравнению с растением, у которого отсутствует повышенная экспрессия.

10 20. Способ по п. 19, включающий введение в растительную клетку полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е, причем этот полинуклеотид функционально связан с гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке; и регенерирование растения из растительной клетки.

15 21. Способ по п. 19, в котором последовательность полипептида СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.

20 22. Способ по п. 19, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего полипептид СУР81Е, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.

23. Способ по п. 19, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.

25 24. Способ по п. 23, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.

25. Способ по п. 19, в котором растение представляет собой двудольное растение.

26. Способ по п. 19, в котором растение представляет собой культурное растение.

30

27. Способ по п. 19, в котором растение представляет собой сою, хлопок, канолу, табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.

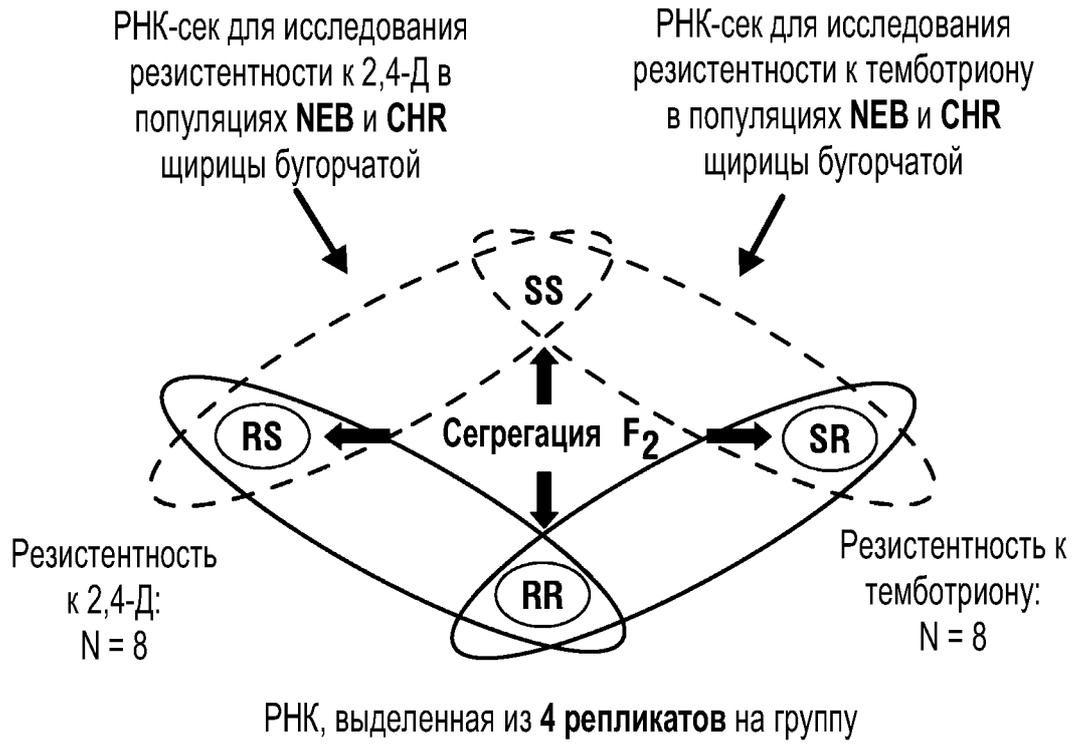
28. Способ борьбы с нежелательной растительностью на участке для выращивания растений, включающий:  
обеспечение на участке растения, которое содержит полинуклеотид, кодирующий  
5 полипептид СУР81Е, причем экспрессия полинуклеотида придает растению  
толерантность к гербициду; и  
нанесение на участок эффективного количества гербицида.
29. Способ по п. 28, в котором последовательность полипептида СУР81Е по меньшей  
10 мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на  
98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.
30. Способ по п. 28, в котором последовательность полинуклеотида, кодирующего  
полипептид СУР81Е, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей  
15 мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична  
последовательности SEQ ID NO: 1.
31. Способ по п. 28, в котором полинуклеотид функционально связан с  
гетерологичным промотором, функциональным в растительной клетке.  
20
32. Способ по п. 28, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.
33. Способ по п. 32, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.
- 25 34. Способ по п. 28, в котором растение представляет собой двудольное растение.
35. Способ по п. 28, в котором растение представляет собой сою, хлопок, канолу,  
табак, томат, картофель, люцерну, сахарную свеклу или подсолнечник.
- 30 36. Способ борьбы с ростом резистентного к гербицидам сорняка на участке для  
выращивания растений, включающий:

приведение сорняка в контакт с композицией, содержащей полинуклеотид, который уменьшает экспрессию или активность полипептида СУР81Е; и нанесение на участок эффективного количества гербицида.

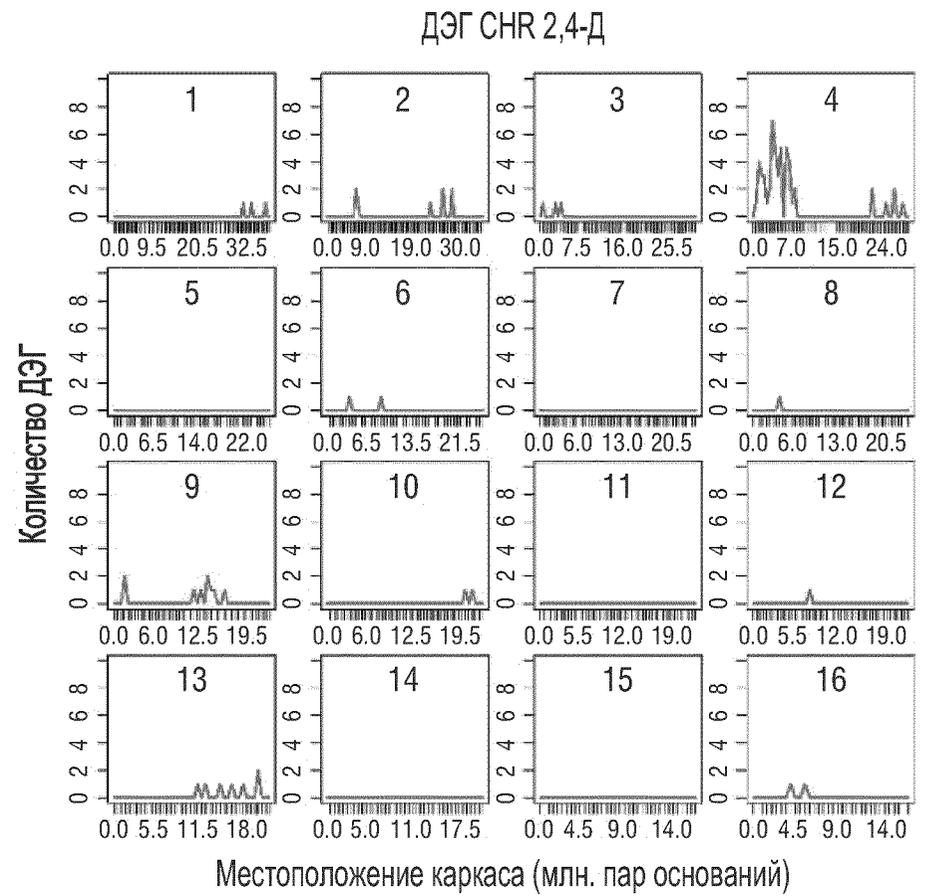
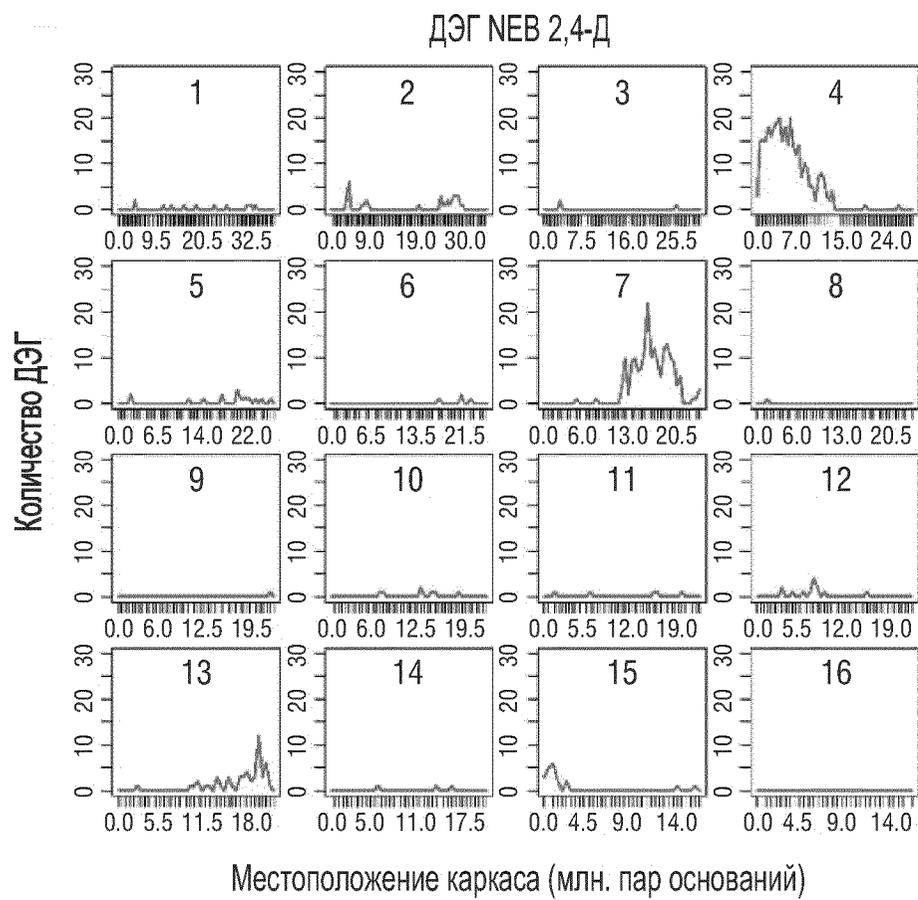
- 5 37. Способ по п. 36, в котором полинуклеотид представляет собой двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК или двухцепочечный гибридный полинуклеотид ДНК/РНК.
38. Способ по п. 36, в котором полинуклеотид содержит последовательность, по  
10 существу идентичную или по существу комплементарную по меньшей мере 18 или более смежным нуклеотидам последовательности SEQ ID NO: 1.
39. Способ по п. 38, в котором полинуклеотид имеет длину 26–60 нуклеотидов.
- 15 40. Способ по п. 36, в котором последовательность полипептида СУР81Е по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 2.
41. Способ по п. 36, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.  
20
42. Способ по п. 41, в котором ауксиновый гербицид представляет собой 2,4-Д.
43. Способ по п. 36, в котором сорняк представляет собой *Amaranthus tuberculatus*.
- 25 44. Способ по п. 36, в котором композиция содержит агент, выполненный с возможностью обеспечения проникновения полинуклеотида с поверхности сорняка в клетки сорняка.
- 30 45. Продукт, полученный из растения, части растения или клетки растения по п. 1, причем продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е.

46. Продукт по п. 45, который представляет собой корм для скота, семенную муку, масло или семя, покрытое оболочкой для обработки семян.
47. Способ получения растительного продукта, включающий переработку растения или части растения по п. 1 для получения растительного продукта, причем растительный продукт содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид СУР81Е.
48. Способ по п. 47, в котором растительный продукт представляет собой корм для скота, семенную муку, масло или семена, покрытые оболочкой для обработки семян.
49. Способ выявления резистентного к гербицидам растения, включающий:  
обеспечение биологического образца из растения, потенциально являющегося резистентным к гербициду;  
количественное определение экспрессии гена СУР81Е в биологическом образце, причем ген СУР81Е дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с чувствительным к гербициду растением того же вида; и  
определение того, что растение резистентно к гербицидам, на основе количественного определения.
50. Способ по п. 49, в котором биологический образец взят из *Amaranthus tuberculatus*.
51. Способ по п. 49, в котором гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.
52. Способ по п. 49, в котором количественное определение экспрессии гена СУР81Е включает количественное определение мРНК СУР81Е.
53. Способ по п. 49, в котором количественное определение экспрессии гена СУР81Е включает количественное определение полипептида СУР81Е.
54. Способ по п. 49, в котором ген СУР81Е имеет по меньшей мере четырехкратную дифференциальную экспрессию в резистентном к гербицидам растении по сравнению с чувствительным к гербицидам растением до применения гербицида.

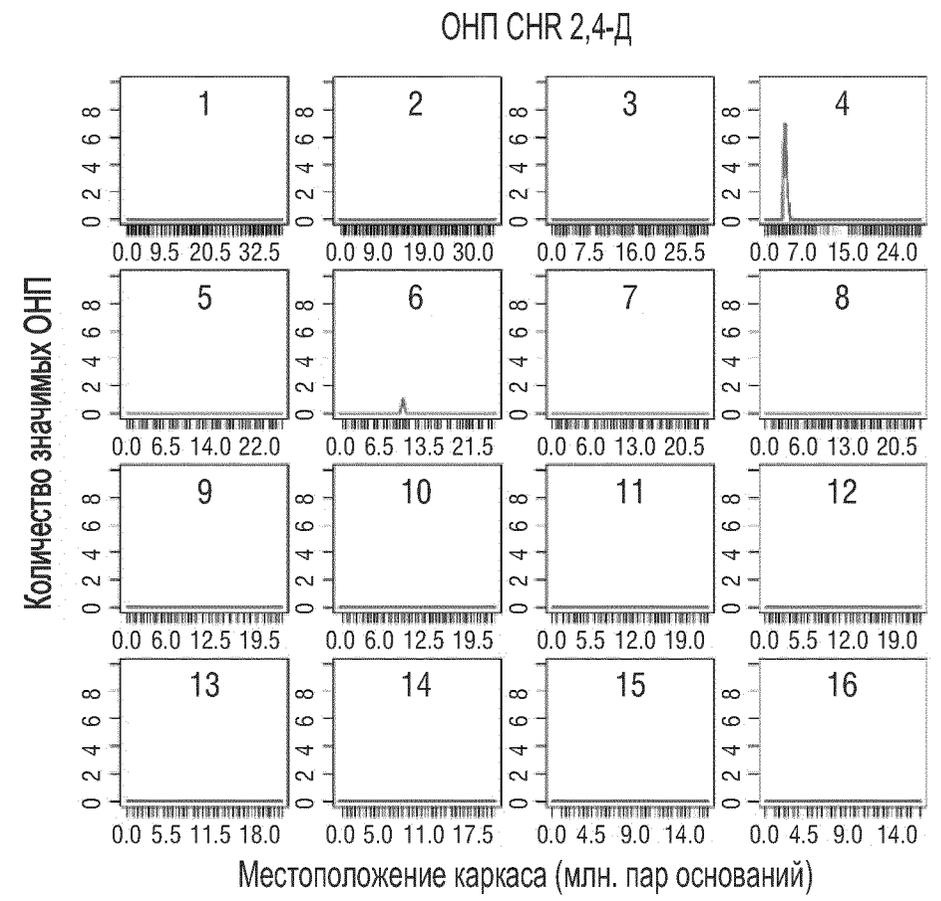
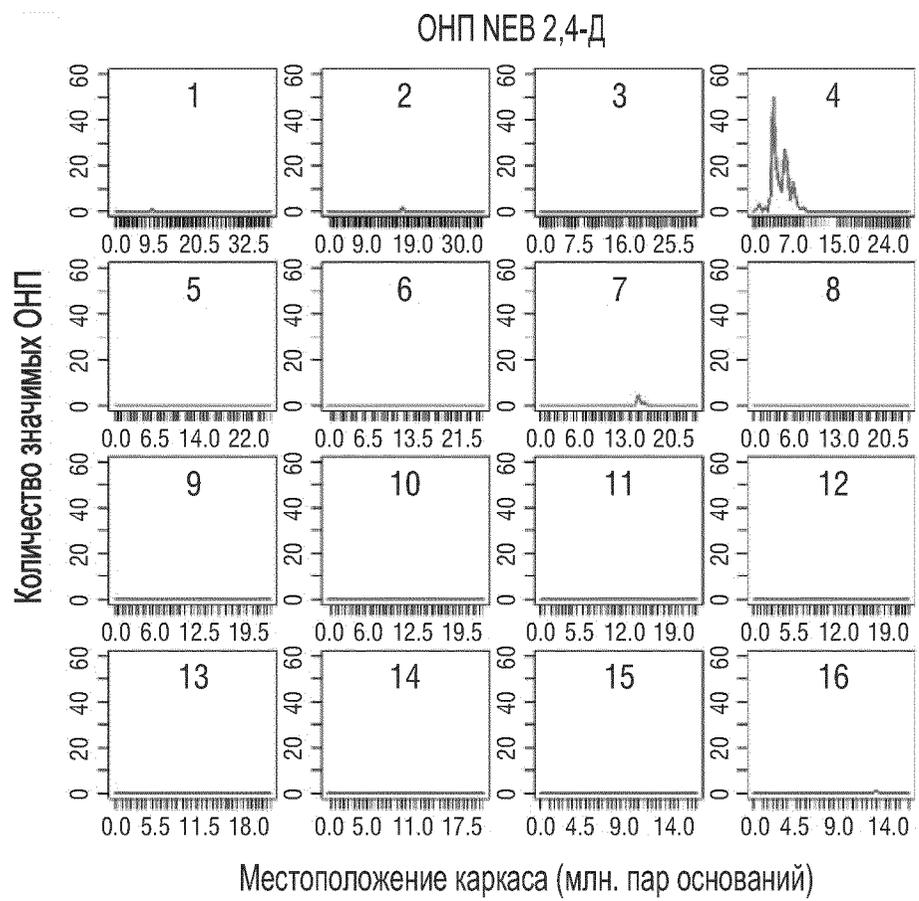
55. Способ по п. 49, в котором последовательность гена CYP81E по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.
- 5
56. Способ по п. 49, в котором в котором количественное определение экспрессии включает амплификацию нуклеиновой кислоты с использованием по меньшей мере двух праймеров.
- 10
57. Способ по п. 56, в котором по меньшей мере два праймера содержат последовательность SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6.
58. Набор для выявления резистентного к гербициду растения, содержащий по меньшей мере два праймера, причем по меньшей мере два праймера выполнены с
- 15
- возможностью распознавания гена CYP81E, который дифференциально экспрессируется в резистентном к гербициду растении по сравнению с чувствительным к гербициду растением того же вида.
59. Набор по п. 58, в котором последовательность гена CYP81E по меньшей мере на
- 20
- 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1.
60. Набор по п. 58, дополнительно содержащий по меньшей мере один положительный контроль и один отрицательный контроль.
- 25
61. Набор по п. 58, дополнительно содержащий компоненты раствора для количественной ПЦР в реальном времени.
62. Набор по п. 58, в котором растение представляет собой *Amaranthus tuberculatus*, и
- 30
- гербицид представляет собой ауксиновый гербицид.



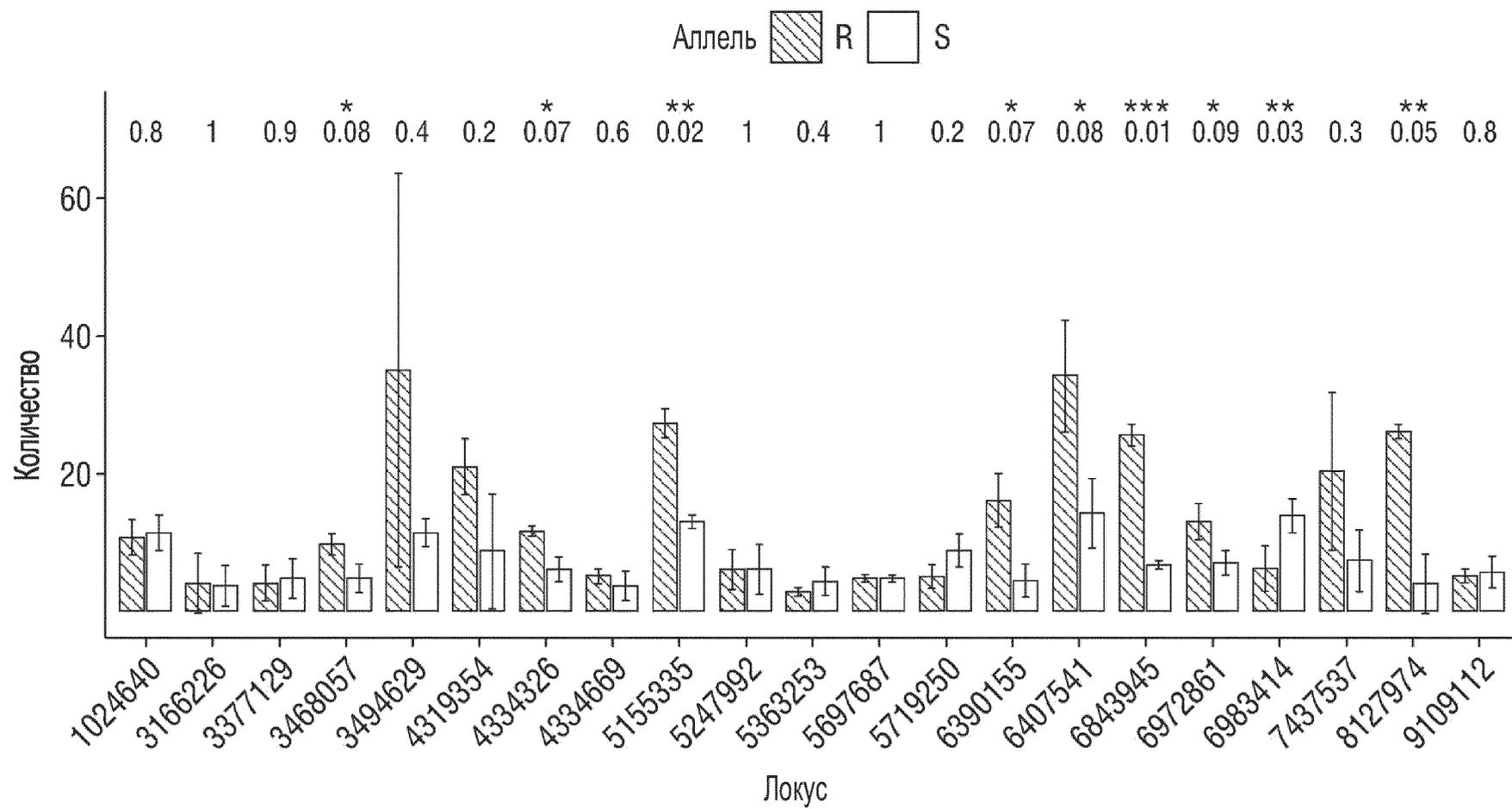
ФИГ. 1



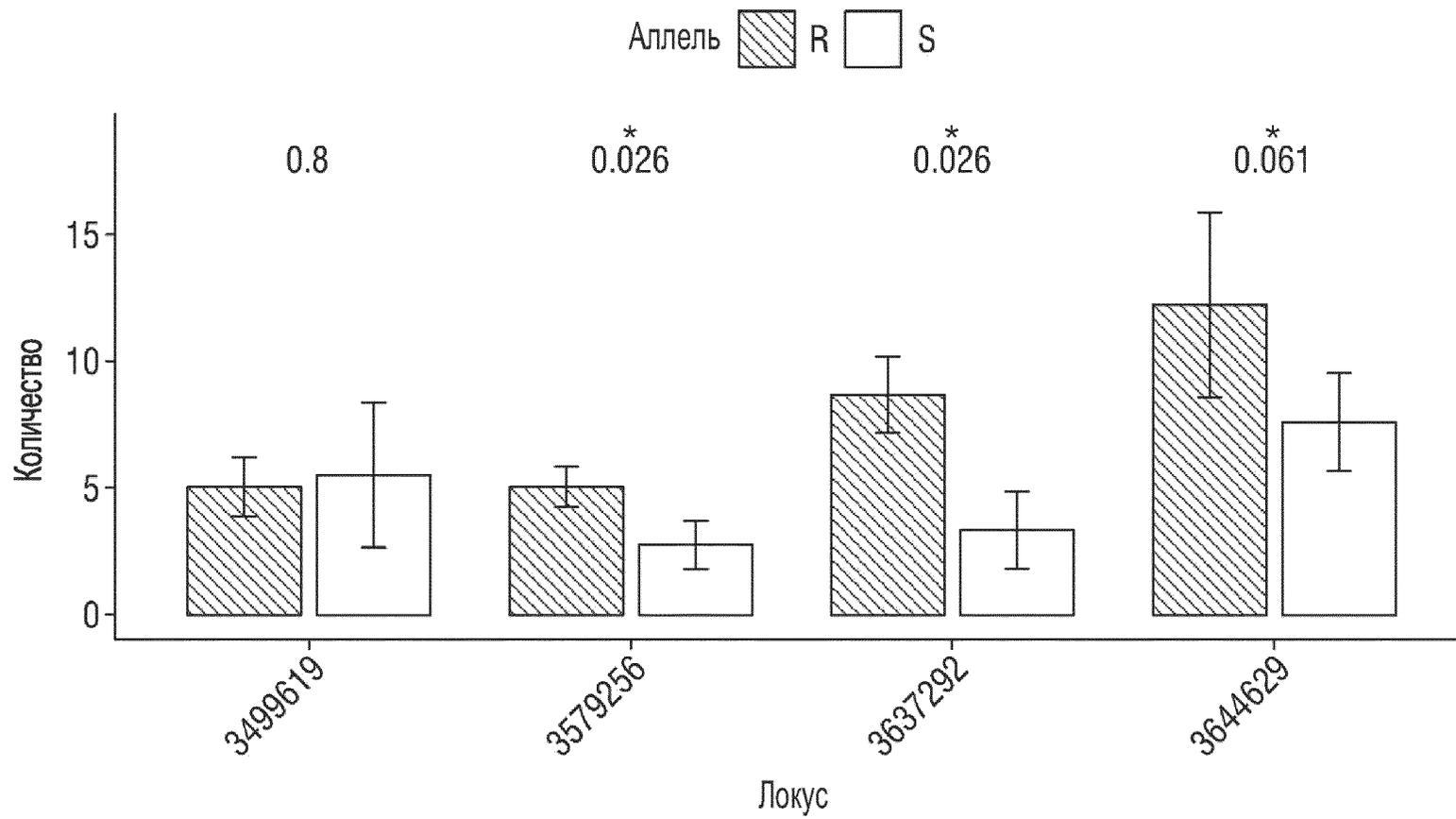
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

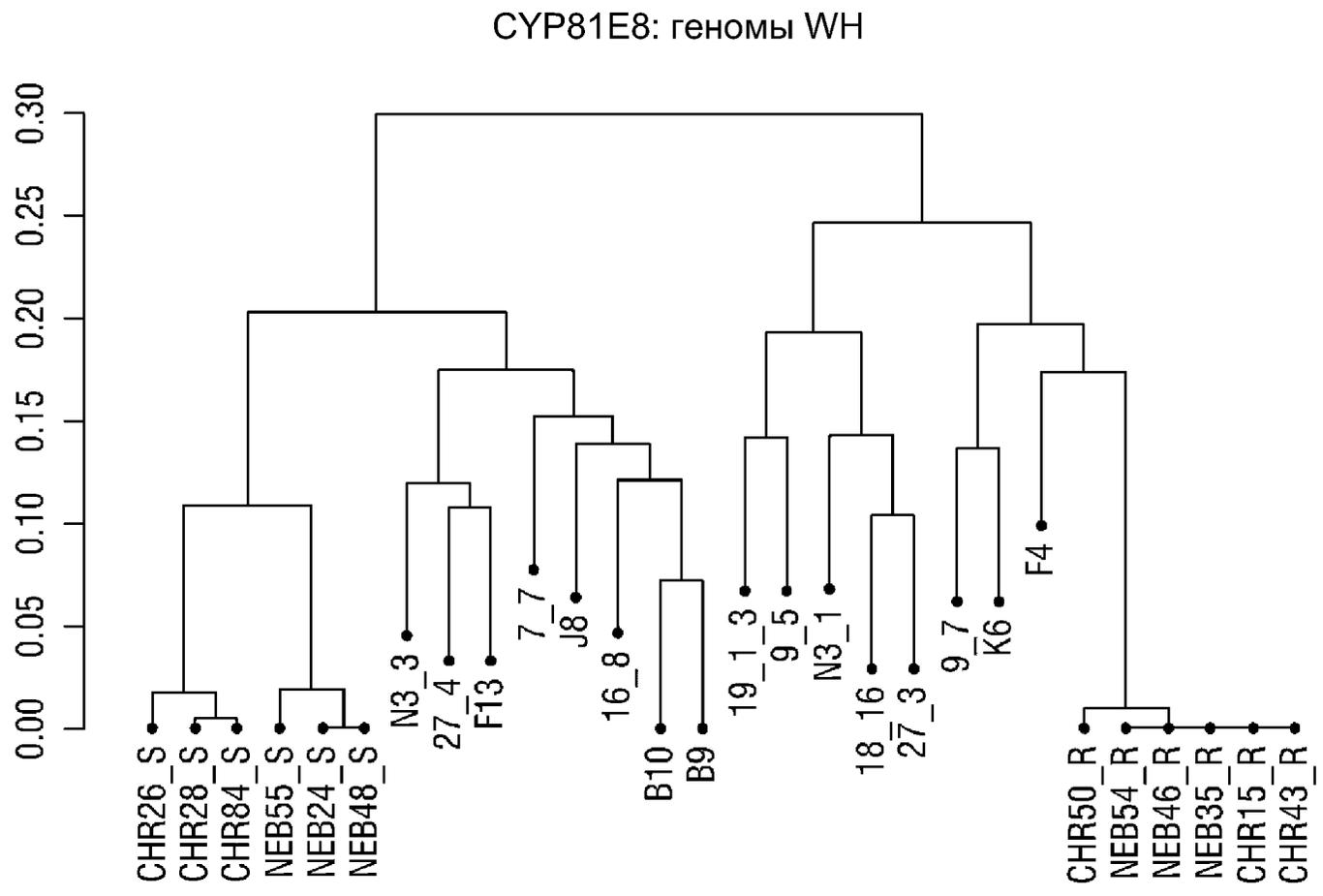


ФИГ. 3А



5/5

ФИГ. 3В



ФИГ. 4