

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992615 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.10

(51) Int. Cl. C12N 15/82 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.07

(54) СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРАНСГЕННЫХ
МАРКЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(31) 62/502,418; 201710778196.0

(32) 2017.05.05; 2017.09.01

(33) US; CN

(86) PCT/CN2018/085829

(87) WO 2018/202199 2018.11.08

(71) Заявитель:
ИНСТИТУТЕ ОФ ГЕНЕТИСС
АНД ДЕВЕЛОПМЕНТАЛ
БИОЛОГЬ, ЧИНЕСЕ АСАДЕМЬ ОФ
ССИЕНСЕС (CN)

(72) Изобретатель:
Гао Саиксиа, Жанг Руи, Лиу
Джинхинг (CN), Хуммел Аарон,
Вагхчхипавала Зарир, Лабс Матиас
(US)

(74) Представитель:
Зуйков С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам целенаправленного редактирования в растении, растительной клетке или материале, которое скомбинировано с параллельным введением фенотипически селективируемого признака. Кроме того, предлагаются способы, не содержащие этап введения трансгенной селективной маркерной последовательности.

201992615 A1

201992615

A1

Способы выделения клеток без использования трансгенных маркерных последовательностей

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам целенаправленного редактирования в растении, растительной клетке или материале, которое скомбинировано с параллельным введением фенотипически селективируемого признака. Кроме того, предлагаются способы, не содержащие этап введения трансгенной селективной маркерной последовательности. Эти способы содержат введение целенаправленной модификации в первый сайт-мишень в геноме для получения селективируемого фенотипа, который не зависит от предложения экзогенной полинуклеотидной матрицы, а также не зависит от введения двухцепочечного разрыва в сайт-мишень. А также, настоящее изобретение относится к комбинации этапов специфичного способа осуществления распараллеливания трансгенной безмаркерной селекции и целенаправленного редактирования в другом сайте-мишени в геноме, что приводит к приданию селективируемого или другого фенотипа, что позволяет выделить растительный материал без селективной маркерной кассеты для обеспечения точного размножения, содержащего значительно меньше усилий, требуемых на осуществление селекции для идентификации интересующего генотипа.

Предпосылки создания изобретения

Точная модификация генетической информации эукариотических клеток имеет высокую ценность для применений в сельском хозяйстве, фармацевтике и медицине, а также она имеет важное значение для фундаментальных исследований. Геномная инженерия или редактирование описывает способность осуществлять эти определяемые генетические изменения в мишенях с высокой точностью. Целенаправленные двухцепочечные разрывы могут, например, быть созданы сайт-специфичными нуклеазами (SSN) или рекомбиназами в эукариотических клетках.

В растениях, точная индукция двухцепочечного разрыва увеличивает частоту событий гомологичной рекомбинации (HR) на 100х-1000х (Пухта и др., Proc. Natl. Acad. Sci. США 93:5055-5060, 1996). Однако последующая идентификация модифицированных клеток и растений представляет собой ограничение стандартному осуществлению редактирования генов как инструмента размножения для улучшения растений.

Уже более ста лет отмечается значительный прогресс повышения урожайности сельскохозяйственных культур, благодаря размножению растений и разработки агротехники, например, агрохимикатов. Однако селекционеры должны постоянно реагировать на многие изменения. Меняются агрономические приемы, что создает потребность в разработке растений с генотипами, несущими специфичные агрономические характеристики. Кроме того, целевая внешняя среда и организмы, живущие в ней, постоянно меняются. Например, грибки и насекомые-вредители постоянно эволюционируют и преодолевают устойчивость интересующего растения. Новые земельные участки регулярно используются для ведения сельского хозяйства, в результате

чего растения подвергаются воздействию измененных условий выращивания. Наконец, меняются потребительские предпочтения и требования. Поэтому перед селекционерами стоит бесконечная задача постоянно разрабатывать новые сорта сельскохозяйственных культур (Коллард и Маккилл, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 12 февраля 2008 г.; 363(1491): 557–572).

Таким образом, для содействия стратегиям размножения, необходимы селективируемые маркерные последовательности или стратегии маркер-вспомогательной селекции (MAS), обладающие диагностическим потенциалом, позволяющим верно определять интересующий генотип. Как было раскрыто в патенте EP 2 342 337 B1, разработка диагностических маркеров следует за процессом, начинающимся с картирования генетического положения гена(ов), лежащего в основе интересующего признака, идентификации фланкирующих маркеров, точного картирования гена(ов) путем идентификации тесно сцепленных маркеров, определения последовательностей маркеров ДНК среди наиболее сцепленных маркеров, определения вариации последовательностей в маркерных локусах между родительскими линиями, используемыми для картирования гена-мишени, разработки простых анализов PCR (полимеразной цепной реакции), тестирования прогностического значения в генетическом фоне (идиоплазме) растительного материала, где будет проводиться тестирование маркера с диагностическими свойствами во время скрининга или размножения. Указанные стратегии по своей сути являются трудоемкими и, следовательно, высокочередными, поскольку интересующий маркер должен присутствовать или быть вставлен в подходящее положение в интересующем геноме.

Технология маркеров ДНК может значительно повысить эффективность размножения растений, обеспечивая осуществление селекции на основе маркеров, легко поддающихся анализу, а не определения фенотипических признаков. Однако разработка таких маркеров с диагностическими свойствами или со свойствами скрининга и эффективность применения этих маркеров зачастую является трудоемким процессом и занимает много времени, как подробно описано выше. В настоящее время способы определения точечных мутаций, например, SNP (однонуклеотидных полиморфизмов), могут идентифицировать только ограниченное количество таких точечных мутаций и определять ограниченный репертуар (Слейд и др., *Nat. Biotech.* 23, 75-81).

Тем не менее, селективируемые маркерные гены играют важную роль в растениях для исследования трансгенных и транспластомных растений или для разработки сортов сельскохозяйственных культур. Селективируемые маркерные гены зачастую используются в комбинации с репортерными генами, при этом, репортерные гены не предлагают клетку с селективным преимуществом, но, при этом, репортерные гены могут быть использованы для мониторинга трансгенных событий или для ручного отделения трансгенного материала от нетрансформированного материала.

Одной из областей, которая быстро развивается, является разработка стратегий для элиминации селективируемых маркерных генов для генерации безмаркерных растений. Рационализация создания безмаркерных растений подробно обсуждалась в нескольких обзорах

(Йодер и Голдсбро, 1994; Оу, 2001; Хэа и Чуа, 2002). Для коммерциализации трансгенных и нетрансгенных растений это упростило бы регуляторный процесс и улучшило бы принятие потребителем удаленных последовательностей генов, которые не служат цели в конечном сорте растений. Элиминация маркерных генов из конечного растения позволила бы использовать экспериментальные маркерные гены, которые не подвергались всесторонней оценке биобезопасности, или которые могут генерировать отрицательные плейотропные эффекты у растений. Кроме того, элиминация полезных маркерных генов до последующего раунда трансформации, позволила бы повторно их использовать для рекуррентной трансформации трансгенных растений.

Таким образом, трансгенные селективные маркерные гены могут повысить эффективность восстановления растений, регенерированных из обработанных клеток, но введение трансгенного секвенирования в геном растения не всегда желательно. Кроме того, проводить элиминацию трансгенных маркерных генов после того, как селекция была достигнута, зачастую бывает очень сложно.

За последние несколько лет точное редактирование генов или геномная инженерия получила развитие как одна из наиболее важных областей генной инженерии, обеспечивающая целенаправленное и сайт-направленное манипулирование интересующим геномом. Непременной предпосылкой для сайт-направленной геномной инженерии являются программируемые нуклеазы, которые могут быть использованы для разрыва интересующей нуклеиновой кислоты в определенном положении для индуцирования либо двухцепочечного разрыва (DSB), либо, по меньшей мере, одного одноцепочечного разрыва. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, указанные нуклеазы могут быть химерными или мутировавшими вариантами, которые уже не содержат функцию нуклеазы, а действуют скорее как распознающие молекулы в комбинации с другим ферментом. Таким образом, эти нуклеазы или их варианты являются ключом к любому подходу к редактированию генов или геномной инженерии. За последние годы было разработано много подходящих нуклеаз, в частности, эндонуклеаз с задаваемой структурой, содержащих мегануклеазы, цинк-пальцевые нуклеазы, нуклеазы TALE, нуклеазы Аргонавты, полученные, например, из *Natronobacterium gregoryi*, и нуклеазы CRISPR, содержащие, например, нуклеазы Cas, Cpf1, CasX или CasY, в качестве части системы Коротких Палиндромных Повторов, Регулярно Расположенных Группами (CRISPR).

CRISPR (Короткие Палиндромные Повторы, Регулярно Расположенные Группами) в своей природной среде первоначально эволюционировали в бактериях, где система CRISPR выполняет роль адаптивной иммунной системы для защиты от вирусной атаки. При воздействии вируса, короткие сегменты вирусной ДНК интегрируют в локус CRISPR. РНК транскрибируется из части локуса CRISPR, который включает вирусную последовательность. Эта РНК, которая содержит последовательность, комплементарную вирусному геному, опосредует нацеливание эффекторного белка CRISPR на последовательность-мишень в вирусном геноме. Эффекторный белок CRISPR расщепляет и тем самым вмешивается в репликацию вирусной мишени. За последние годы,

систему CRISPR также успешно адаптировали к редактированию генов или геномной инженерии и в эукариотических клетках. В настоящее время, значительное внимание в исследованиях уделяется редактированию в животных клетках и применениям в терапевтических целях для людей. Целенаправленная модификация сложных геномов животных, а также растений, по-прежнему представляет собой трудную задачу.

Система CRISPR в своей природной среде описывает молекулярный комплекс, содержащий, по меньшей мере, одну малую и отдельную некодирующую РНК в комбинации с нуклеазой Cas или другой нуклеазой CRISPR, такой как, нуклеаза Cpf1 (Цетше и др., «Cpf1 представляет собой направляемую одноцепочечной РНК эндонуклеазу системы CRISPR-Cas Класса 2», Cell, 163, страницы 1-13, октябрь 2015 г.), который может продуцировать специфичный разрыв двухцепочечной ДНК. В настоящее время, системы CRISPR подразделяются на два класса, содержащие пять типов систем CRISPR, например, систему Типа II, использующую Cas9 в качестве эффектора, и систему Типа V, использующую Cpf1 в качестве эффекторной молекулы (Макарова и др., Nature Reviews Microbiology, 2015). В искусственных системах CRISPR, синтетическая некодирующая РНК и нуклеаза CRISPR, и/или, при необходимости, модифицированная нуклеаза CRISPR, модифицированная для того, чтобы она действовала в качестве никазы или была лишена какой-либо функции нуклеазы, могут использоваться в комбинации с, по меньшей мере, одной синтетической или искусственной направляющей РНК или gРНК, комбинирующей функцию crРНК и/или tracrРНК (см. выше, Макарова и др., 2015). Иммунный ответ, опосредованный системой CRISPR/Cas в природных системах, требует CRISPR-РНК (crРНК), при этом, созревание этой направляющей РНК, которая контролирует специфичную активацию нуклеазы CRISPR, варьируется в значительной степени между различными системами CRISPR, которые были охарактеризованы до этого момента. Во-первых, вторгающаяся ДНК, также известная как спейсер, интегрирована между двумя соседними областями повтора на проксимальном конце локуса CRISPR. Системы CRISPR Типа II кодируют нуклеазу Cas9 в качестве ключевого фермента для этапа интерференции, причем, эти системы содержат как crРНК, так и транскрибирующую РНК (tracrРНК) в качестве направляющего мотива. Они гибридизуются и образуют области двухцепочечной (ds) РНК, которые распознаются РНКазой III и могут быть расщеплены для образования зрелых crРНК. Затем они, в свою очередь, ассоциируются с молекулой Cas для того, чтобы направить нуклеазу точно в область нуклеиновой кислоты-мишени. Рекомбинантные молекулы gРНК могут содержать как вариабельную область распознавания ДНК, так и область взаимодействия Cas, и их можно точно сконструировать, независимо от специфичной нуклеиновой кислоты-мишени и желаемой нуклеазы Cas. В качестве дополнительного механизма безопасности, в области нуклеиновой кислоты-мишени должны присутствовать PAM (мотивы, примыкающие к протоспейсеру); они представляют собой последовательности ДНК, которые следуют непосредственно из ДНК, распознанной комплексом Cas9/РНК. Последовательность PAM для Cas9 из *Streptococcus pyogenes* была описана, как «NGG» или «NAG» (Стандартный нуклеотидный код ИЮПАК) (Джинек и др., «Программируемая

эндонуклеаза направляющей ДНК с двойной РНК в адаптивном бактериальном иммунитете», Science, 2012, 337: 816-821). Последовательность PAM для Cas9 из *Streptococcus aureus* прочитывается как «NNGRRT» или «NNGRR(N)». Известны следующие варианты систем CRISPR/Cas9. Так, Cas9 из *Neisseria meningitidis* расщепляет в последовательности PAM NNNNGATT. Cas9 из *Streptococcus thermophilus* расщепляет в последовательности PAM NNAGAAW. Недавно, был описан еще один мотив PAM NNNNRYAC для системы CRISPR из *Campylobacter* (WO 2016/021973 A1). В отношении нуклеаз Cpf1, было описано, что комплекс Cpf1-crPНК эффективно расщепляет ДНК-мишень с помощью короткоцепочечного Т-богатого PAM, в отличие от обычных G-богатых PAM, распознаваемых системами Cas9 (см. выше, Цетше и др.). Кроме того, используя модифицированные полипептиды CRISPR, можно получить специфичные одноцепочечные разрывы. Комбинированное использование никаз Cas с различными рекомбинантными gPНК также может индуцировать высокоспецифичные двухцепочечные разрывы ДНК посредством двойного никования ДНК. Кроме того, используя две gPНК, можно оптимизировать специфичность связывания ДНК и, таким образом, расщепление ДНК.

В настоящее время, например, такие основанные на Cas9 системы Типа II или их вариант, или любая химерная форма, такая как, эндонуклеаза, были модифицированы для геномной инженерии. Синтетические системы CRISPR, состоящие из двух компонентов, направляющей РНК (gPНК), также называемой одноцепочечной направляющей РНК (sgPНК), и неспецифичной CRISPR-ассоциированной эндонуклеазы, могут быть использованы для генерации нокаутных клеток или животных путем совместной экспрессии gPНК, специфичной для гена, подлежащего нацеливанию, и способной ассоциироваться с эндонуклеазой Cas9. Примечательно, что gPНК представляет собой искусственную молекулу, содержащую один домен, взаимодействующий с Cas или с любым другим эффекторным белком CRISPR, или с его вариантом, или каталитически активным фрагментом, и другой домен, взаимодействующий с интересующей нуклеиновой кислотой-мишенью, и, таким образом, представляющую синтетическое слияние crPНК и tracrPНК («одноцепочечная направляющая РНК» (sgPНК) или просто «gPНК»; см. выше, Джинек и др., 2012). Мишенью в геноме может быть любая последовательность ДНК из, приблизительно, 20 нуклеотидов, при условии, что мишень присутствует непосредственно выше PAM. Последовательность PAM имеет огромное значение для целенаправленного связывания, и точная последовательность зависит от вида Cas9 и, например, прочитывается как 5' NGG 3' или 5' NAG 3' (Стандартный нуклеотидный код ИЮПАК) (см. выше, Джинек и др., 2012) для *Streptococcus pyogenes*, полученного Cas9. Используя модифицированные нуклеазы Cas, целенаправленные одноцепочечные разрывы могут быть введены в интересующую последовательность-мишень. Комбинированное использование такой никазы Cas с различными рекомбинантными gPНК для высоко сайт-специфичных двухцепочечных разрывов ДНК может быть введено с помощью системы двойного никования. Использование, по меньшей мере, одной gPНК может еще больше повысить общую специфичность и уменьшить количество нецеленаправленных действий.

После экспрессии, белок Cas9 и gPHK образуют рибонуклеопротеиновый комплекс посредством взаимодействий между доменом «скаффолд» gPHK и поверхностно-экспонированными положительно заряженными бороздками на Cas9. Важно отметить, что «спейсерная» последовательность gPHK остается свободной для взаимодействия с ДНК-мишенью. Комплекс Cas9-gPHK будет связывать любую геномную последовательность с PAM, но степень, до которой спейсер gPHK соответствует ДНК-мишени, определяет, будет ли отрезан Cas9. Как только комплекс Cas9-gPHK свяжет предполагаемую ДНК-мишень, «порождающая» последовательность на 3'-конце последовательности, нацеленной на gPHK, начинает отжигать ДНК-мишень. Если порождающая последовательность и последовательность ДНК-мишени совпадают, то gPHK будет продолжать отжигать ДНК-мишень в направлении от 3'-конца к 5'-концу (относительно полярности gPHK).

За последнее время, системы CRISPR/Cpf1, сконструированные в дополнение к системам CRISPR/Cas9, становятся все более важными для целенаправленной геномной инженерии (см. выше, Цетше и др., и EP 3 009 511 A2). Система Типа V, вместе с системой Типа II, относится к системам CRISPR Класса 2 (Способы Макаровой и Кунина. Mol. Biol., 2015, 1311:47-753). Эффекторный белок Cpf1 представляет собой большой белок (примерно, 1300 аминокислот), который содержит RuvC-подобный нуклеазный домен, гомологичный соответствующему домену Cas9, а также аналог характерному богатому аргинином кластеру Cas9. Однако Cpf1 не имеет нуклеазного домена HNH, который присутствует во всех белках Cas9, и RuvC-подобный домен является прилегающим в последовательности Cpf1, в отличие от Cas9, где он содержит длинные вставки, включающие домен HNH (Чилински, 2014; Макарова, 2015). Эффекторы Cpf1 обладают определенными отличиями от эффекторов Cas9, а именно: отсутствие обязательных дополнительных *транс*-активирующих crPHK (tracrPHK) для обработки массива CRISPR, эффективное расщепление ДНК-мишени короткоцепочечными T-богатыми PAM (в отличие от Cas9, где за PAM следует G-богатая последовательность) и введение ступенчатых двухцепочечных разрывов ДНК посредством Cpf1. Совсем недавно были идентифицированы дополнительные новые системы CRISPR-Cas на основе CasX и CasY, которые, из-за относительно небольшого размера эффекторного белка, представляют особый интерес для многих подходов к редактированию генов или геномной инженерии (Бурштейн и др., «Новые системы CRISPR-Cas из некультивируемых микробов», Nature, декабрь 2016 г.).

Тем не менее, системы CRISPR *per se* не обладают внутренней способностью создавать точечную мутацию в желаемом положении в интересующем геноме в клетке-мишени.

Инструменты геномной инженерии, такие как, системы CRISPR, вводящие двухцепочечный разрыв (DSB), требуют механизма репарации DSB. Указанные механизмы были разделены на два главных базовых типа: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HR). Механизмы репарации на основе гомологии обычно называются репарацией, направляемой гомологией (HOR).

NHEJ представляет собой ответ доминантного ядра у животных и растений, который не требует гомологичных последовательностей, но он зачастую подвержен ошибкам и, следовательно, потенциально мутагенен (Вайман С., Канаар Р. «Репарация двухцепочечного разрыва ДНК: все хорошо, что хорошо кончается», *Annu. Rev. Genet.*, 2006; 40, 363-83). Репарация по HOR требует гомологии, но те пути HOR, которые используют интактную хромосому для репарации разорванной хромосомы, то есть, для репарации двухцепочечного разрыва и синтез-зависимого отжигания цепи, очень точны. В классическом пути репарации DSB, 3'-концы захватывают интактную гомологичную матрицу, а затем служат в качестве праймера для синтеза репарации ДНК, что в конечном итоге приводит к образованию двойных структур Холлидея (dHJ). Двойные структуры Холлидея представляют собой четырехцепочечные разветвленные структуры, которые образуются, когда элонгация захваченной цепи «захватывает» и синтезирует ДНК со второго конца DSB. Отдельные HJ разрешаются посредством расщепления одним из двух путей. Синтез-зависимое отжигание цепи является консервативным и заканчивается исключительно некроссоверными событиями. Это означает, что все вновь синтезированные последовательности присутствуют в одной и той же молекуле. В отличие от пути репарации NHEJ, после захвата цепи и образования петли D в синтез-зависимом отжигании цепи, вновь синтезированная часть захваченной цепи вытесняется из матрицы и возвращается к обработанному концу незахваченной цепи с другого конца DSB. 3'-конец незахваченной цепи элонгируется и лигируется для заполнения зазора. Существует еще один путь HOR, называемый путем репарации, индуцированной разрывом, который еще не полностью охарактеризован. Основным признаком этого пути является наличие только одного захваченного конца в DSB, который может быть использован для репарации.

Таким образом, введение целенаправленной точечной мутации в геном растения и использование указанной мутации является сложной задачей на сегодняшний день. Кроме того, потенциал геномной инженерии с использованием сайт-специфичных нуклеаз (SSN) по-прежнему сталкивается с проблемой селекции для модификаций, введенных указанными SSN, особенно в том случае, если интересующий геном представляет собой сложный эукариотический геном, такой как, геном растения, и целенаправленная модификация должна быть прослежена по селективным раундам во время размножения.

Несмотря на обилие возможностей геномной инженерии (GE), доступных на сегодняшний день, большинство из указанных подходов GE нацелены на введение интересующей целенаправленной модификации посредством одной SSN, содержащей комплекс. Таким образом, введение такой целенаправленной модификации в идиоплазму растения для последующего размножения растений возможно, однако последующее отслеживание целенаправленной модификации является трудоемким. Если селективный маркер или селективная маркерная кассета используются для содействия селекции и, таким образом, выделения клеток, представляющих потенциальный интерес, то по-прежнему имеется существенное препятствие для удаления такой

маркерной кассеты из генома растения после последовательных раундов скрещивания во время размножения для достижения интересующей комбинации генотип/фенотип.

В то же время существует острая потребность в предложении новых способов, подходящих для размножения растений, при этом, интересующие признаки, например, на основе интересующей модификации, элитном событии или благоприятном свойстве, получаемые от сорта, подлежащего скрещиванию, могут быть определены, созданы или получены скрещиванием во время размножения. Иногда бывает затруднительно или очень трудоемко проводить скрининг распространения и наличия указанных интересующих признаков на разных этапах размножения.

Следовательно, для выделения клеток и растений необходимы более совершенные способы, предпочтительно, способы, которые не требуют геномной интеграции трансгенной маркерной последовательности для последующих раундов селекции. Кроме того, существует большая потребность в селективируемых маркерных последовательностях, которые могут быть созданы сайт-направленным способом с высокой точностью и без введения экзогенных трансгенных последовательностей для цели селекции и в качестве инструментов скрининга. Наконец, существует огромная потребность в определении новых стратегий, содействующих быстрому размножению, для того, чтобы объединить интересующие признаки вместе в идиоплазме во время последовательных раундов скрещивания и селекции во время размножения.

Таким образом, целью, лежащей в основе настоящей заявки, было предложение способов выделения клеток, которые были обработаны и отредактированы реагентами редактирования генов с использованием фенотипически селективируемого признака, скрининг которого можно легко провести. С этой целью проводят целенаправленную модификацию в первом гене для придания селективируемого или другого фенотипа клетке и ее потомству и при этом не вводят трансгенную селективируемую маркерную последовательность. Параллельно осуществляют целенаправленную модификацию во втором интересующем гене, который может или обычно не может придавать фенотип клетке. Клетка и клетки ее потомства или растения могут быть выделены или регенерированы из фона необработанных клеток путем применения селективного агента или другого способа, который использует фенотип, приданный модификацией в первом гене, для идентификации клеток, которые подверглись этой модификации первого гена. Клетки или растения с целенаправленной модификацией во втором интересующем гене, при этом, вторая модификация представляет собой фактическую цель, которая должна быть достигнута, идентифицируют из этой популяции для предложения более быстрой и, следовательно, более экономной селекции без необходимости наличия или введения в интересующий геном трансгенной селективируемой маркерной последовательности.

Краткое изложение сущности изобретения

Вышеуказанные цели идентификации были достигнуты, как подробно описано в настоящем документе, путем определения стратегии на распараллеливание сайт-направленного введения нетрансгенной и фенотипически селективируемой модификации вместе с

целенаправленным введением интересующей второй сайт-направленной модификации. У второй модификации, как правило, не будет возможности для селекции, потому что фенотип, который она придает, не будет экспрессирован или релевантен в процессе генерирования растений. Таким образом, целью, лежащей в основе способов по настоящему изобретению, является использование первой модификации в качестве инструмента для обеспечения возможности селекции. По сравнению с традиционными стратегиями, способы по настоящему изобретению имеют преимущество, заключающееся в том, что они не включают трансгенный маркерный ген. По сравнению со способами, не предусматривающими использование селективируемого фенотипа, селективируемого посредством соответствующего селективного агента, преимущество этих способов заключается в повышении эффективности за счет элиминации всех или большинства необработанных клеток, которые в противном случае составляли бы большинство клеток, продуцирующих растения. Посредством элиминации необработанных клеток, не подвергшихся целенаправленной модификации в первом сайте-мишени в геноме растения, вызывающей экспрессию фенотипически селективируемого признака, количество растений, которые должны быть продуцированы, значительно уменьшается, и количество растений, которые должны быть подвергнуты скринингу на молекулярном уровне для второй модификации, значительно уменьшается. Способы по настоящему изобретению, таким образом, значительно повышают эффективность размножения и позволяют избежать трудоемких этапов.

В частности, вышеуказанные цели были достигнуты путем предложения, в первом аспекте, способа выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции в трансгенную селективируемую маркерную последовательность, способ содержащий: (a) введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация основания вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного сайт-специфического эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну клетку потомства, ткани, органа или соответствующего растения, содержащего, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и

(с) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной клетки потомства, ткани, органа или соответствующего растения путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией основания в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, предложен способ, при этом, этап (b) дополнительно содержит введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, втором сайте-мишени в геноме растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, способ в соответствии с первым аспектом содержит дальнейший этап (d) скрещивания, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала для достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним комплексом редактирования основания, при этом, комплекс редактирования основания опосредует, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию основания этапа (a).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза, содержащая нуклеазу CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные никующие эндонуклеазы, или редактор основания, или любой вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, направляющий, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей (a) Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9, (b) Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1, (c) CasX или (d) CasY, или любой вариант, или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере,

одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в нуклеазу одноцепочечной специфичной ДНК или в ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания, в соответствии с первым аспектом, проводится, по меньшей мере, посредством одного комплекса редактирования основания, содержащего, по меньшей мере, один редактор основания в качестве компонента.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания содержит, по меньшей мере, одну цитидиндезаминазу или ее каталитически активный фрагмент.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания представляет собой преобразование любого нуклеотида С, А, Т или G в любой другой нуклеотид.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его способами, комплекс редактирования основания содержит, по меньшей мере, одно из следующего: компонент APOBEC1, компонент UGI, компонент XTEN или компонент PmCDA1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, и, по меньшей мере, два компонента физически сцеплены.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его способами, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, и, по меньшей мере, два компонента предложены в виде отдельных компонентов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его способами, по меньшей мере, один компонент, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания содержит, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS), в другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид хлоропласта. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид митохондрии.

В соответствии с одним вариантом осуществления способов по настоящему изобретению, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак преимущества роста, и, при

этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста к соединению или триггеру, подлежащему добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербицидам, при этом, устойчивость/толерантность к гербицидам выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат, устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам PPO и устойчивости/толерантности к

синтетическим ауксином, включая дикамбу (2,4-D, например, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, признак устойчивости/толерантности к гербицидам, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придает устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой ALS. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS, ALS или PPO, и, при этом, EPSPS, ALS или PPO содержит, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты, приводящее к, по меньшей мере, одному преобразованию соответствующей аминокислоты, при этом, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты осуществляется, по меньшей мере, одним редактором основания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, его способы содержат введение целенаправленной модификации в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, при этом, первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой ALS, и, при этом, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A122, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или в последовательности, кодирующей P197, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или в последовательности, кодирующей A205, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или в последовательности, кодирующей D376, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или в последовательности, кодирующей R377, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей W574, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего

изобретения, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей S653, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G654, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

В одном варианте осуществления способов по настоящему изобретению, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO, и целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей C215, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A220, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G221, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей N425, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26, или в последовательности, кодирующей Y426, или в последовательности, кодирующей I475, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его способами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS, и целенаправленные модификации происходят в последовательности, кодирующей G101, и в G144, в последовательности, кодирующей G101, и в A192, или в последовательности, кодирующей T102, и в P106, во всех последовательностях, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27.

Другие комбинации или дополнительные модификации целенаправленных модификаций первого сайта-мишени в геноме растения входят в объем настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления способов по настоящему изобретению, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения. По меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак может представлять собой гляцевый фенотип, золотой фенотип, фенотип преимущества роста или фенотип пигментации, или любой другой визуально скринируемый фенотип.

Во втором аспекте, в соответствии с настоящим изобретением, предложен способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей

мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции с трансгенной селективируемой маркерной последовательностью, способ содержащий: (а) введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации делеции кодона в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфического эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация делеции кодона вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфического эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну клетку потомства, ткани, органа или растения потомства, содержащего, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и (с) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной клетки потомства, ткани, органа или растения потомства путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией делеции кодона в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, (d) при необходимости: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала с целью достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

В другом аспекте, в соответствии с настоящим изобретением, предложен способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции с трансгенной селективируемой маркерной последовательностью, способ содержащий: (а) введение, по меньшей

мере, одной первой целенаправленной модификации сдвига рамки или делеции в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфичного эффектора, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация сдвига рамки или делеции вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфичного эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну клетку потомства, ткани, органа или целого растения потомства, содержащего, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и (c) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной клетки потомства, ткани, органа или растения потомства путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией сдвига рамки или делеции в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, (d) при необходимости: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала с целью достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его вышеуказанными аспектами, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, этап (b) дополнительно содержит введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, одном первом и/или втором сайте-мишени в геноме растения.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная

эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные нуклеазы, или любой их вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей (a) Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, StlCas9, (b) Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1, (c) CasX или (d) CasY, или любой вариант, или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, при необходимости, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в нуклеазу одноцепочечной специфичной ДНК или в ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его аспектами, по меньшей мере, сайт-специфичный эффектор или, по меньшей мере, один компонент комплекса, содержащего, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор, содержит, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу, при этом, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы может быть выбран из сигнала ядерной локализации (NLS), транзитного пептида хлоропласта или транзитного пептида митохондрии.

В одном варианте осуществления вышеуказанных аспектов по настоящему изобретению, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак преимущества роста, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста к соединению или триггеру, подлежащему добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.

В другом варианте осуществления вышеуказанных аспектов по настоящему изобретению, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы,

состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

В еще одном варианте осуществления вышеуказанных аспектов по настоящему изобретению, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербицидам, при этом, устойчивость/толерантность к гербицидам выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат, устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам РРО и устойчивости/толерантности к синтетическим ауксинам, включая дикамбу (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота).

В одном варианте осуществления вышеуказанных аспектов по настоящему изобретению, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, признак устойчивости/толерантности к гербицидам, и, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация делеции кодона или сдвига рамки, или делеции в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придает устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой гомолог продукта гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus* для цели селекции.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания, целенаправленная модификация делеции кодона или сдвига рамки, или делеции происходит в положении, сопоставимом с остатком G210 продукта гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus*, в соответствии с SEQ ID NO:28.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения. По меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, может представлять собой гляцевый фенотип, золотой фенотип, фенотип преимущества роста или фенотип пигментации, или любой другой визуально скринируемый фенотип.

[illegible]

Краткое описание чертежей

Фигура 1 (Фигура 1 А-С) иллюстрирует, как способы по настоящему изобретению могут быть осуществлены для выделения интересующих клеток во время селекции, например, для размножения растений и стратегий целенаправленной селекции. **Фигура 1 А** показывает обработку клеток редактором основания (BE) или комплексом BE, и реагентами редактирования, то есть, сайт-специфичным эффектором, содержащим сайт-специфичную нуклеазу (SSN) параллельно в двух разных локализациях в геноме. Стрелки указывают на сайт-мишень, куда редактор основания (комплекс) и сайт-специфичный эффектор будут вводить две целенаправленные сайт-специфичные модификации. **Фигура 1 В** показывает результат предыдущего этапа, проиллюстрированного на **Фигуре 1 А**, то есть, BE (комплекс) вводит модифицированный фенотип в интересующий ген, выделенный белым цветом, в то время как сайт-специфичный эффектор вводит целенаправленное редактирование в ген признака, выделенный черным цветом. Таким образом, две различные модификации в двух различных сайтах-мишенях в геноме обеспечивают выделение растительных клеток или растений из обработанных клеток. Затем растения могут быть подвергнуты скринингу для редактирования в интересующем гене, который обычно отличается от модифицированного фенотипа, используемого для целей скрининга. **Фигура 1 С** затем показывает результат, полученный после сегрегирования растений для достижения желаемого генотипа. Этот интересующий желаемый генотип содержит целенаправленную модификацию (черным цветом), введенную посредством сайт-специфичного эффектора, но больше не содержит модификацию модифицированного фенотипа, причем последняя была введена в целях селекции, однако не в качестве геномного признака, содержащегося в геноме полученной растительной клетки, ткани, органа или целого растения в данном примере.

Фигура 2 иллюстрирует повышенную эффективность скрининга, полученную путем совместного редактирования TaALS сайта S1.

Фигура 3 иллюстрирует генерацию гербицидоустойчивой пшеницы путем редактирования TaALS-P173.

Фигура 4 иллюстрирует генерацию гербицидоустойчивой кукурузы путем редактирования ZmALS-P165.

Фигура 5 иллюстрирует структуру последовательности и гербицидоустойчивые сайты, подлежащие редактированию в кукурузе.

Фигура 6 иллюстрирует эффективное редактирование ZmALS-P197 и ZmALS-G654.

Фигура 7 иллюстрирует эффективность преобразования ZmALS-P197 и ZmALS-G654 в остатки, придающие желаемую устойчивость к гербицидам.

Последовательности:

SEQ ID NO: 1 представляет собой нуклеотидную последовательность кодирующей конструкции APOBEC1 (цитидиндезаминаза крысы) - линкер XTEN (см., например, Шелленбергер и др., «Рекомбинантный полипептид удлиняет *in vivo* период полураспада пептидов

и белков регулируемым образом», Nature Biotechnol. 27, 1186-1190 (2009)) - nCas9(D10A) - UGI (ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы) - NLS, которая не являлась кодон-оптимизированной. Последовательность включает 3' стоп-кодона TAA.

SEQ ID NO: 2 представляет собой нуклеотидную последовательность кодирующей конструкции APOBEC1 - линкер XTEN - nCas9(D10A) - UGI - NLS, которая являлась кодон-оптимизированной для использования в зерновых культурах. Последовательность включает 3' стоп-кодона TAG.

SEQ ID NO: 3 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_ALS1&2_P197S/L/F для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе ALS из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SpCas9 (производного Cas9 из *Streptococcus pyogenes*).

SEQ ID NO: 4 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_ALS1&2_P197S/L/F для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе ALS из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SaKKH-BE3 (мутант SaCas9 с ослабленной специфичностью PAM производного Cas9 из *Staphylococcus aureus* (SaCas9)).

SEQ ID NO: 5 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_ALS1&2_P197S/L/F для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе ALS из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного VQR-BE3 (мутант SaCas9 с другой специфичностью PAM производного Cas9 из *Staphylococcus aureus* (SaCas9)).

SEQ ID NO: 6 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_ALS1&2_S653N для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе ALS из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SpCas9.

SEQ ID NO: 7 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_A220_&_G221 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SpCas9.

SEQ ID NO: 8 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_A220_&_G221 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SaKKH-BE3.

SEQ ID NO: 9 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_A220_&_G221 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа

В73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного VQR-BE3.

SEQ ID NO: 10 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_C215 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа В73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SpCas9.

SEQ ID NO: 11 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_C215 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа В73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SaKKH-BE3.

SEQ ID NO: 12 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_C215 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа В73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного SaKKH-BE3.

SEQ ID NO: 13 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_C215 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа В73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного VQR-BE3.

SEQ ID NO: 14 представляет собой нуклеотидную последовательность кодирующей конструкции APOBEC1 - линкер XTEN - CasX1 - UGI - NLS, которая являлась кодон-оптимизированной. Последовательность включает 3' стоп-кодона TAG.

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность кодирующей конструкции APOBEC1 - линкер XTEN - AsCpf1 (R1226A) (Cpf1 из *Acidaminococcus sp.* с мутацией R1226A) - UGI - NLS, которая являлась кодон-оптимизированной. Последовательность включает 3' стоп-кодона TAG.

SEQ ID NO: 16 представляет собой нуклеотидную последовательность конструкции, кодирующей NLS - dCas9 - NLS - Линкер - PmCDA1 (индуцированная активацией цитидиндезаминаза (AID) в ортологе PmCDA1 из морской миноги, см. Нисида и др. (Science 2016, том 353, выпуск 6305, aaf8729)) - UGI. Последовательность включает 3' стоп-кодона TAG.

SEQ ID NO: 17 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерную ниразу Cas9 n(i)Cas9 (D10A).

SEQ ID NO: 18 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерную CasX.

SEQ ID NO: 19 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерную AsCpf1 (R1226A).

SEQ ID NO: 20 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерный APOBEC1.

SEQ ID NO: 21 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерную UGI.

SEQ ID NO: 22 представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую примерный PmCDA1.

SEQ ID NO: 23 представляет собой примерную протоспейсерную последовательность для Zm_PPO_N425_&Y426 для редактирования основания для стандартного/эталонного генотипа B73. Положение основано на координатах остатка в гомологе PPO из *Arabidopsis*. Последовательность применима для редактора на основе производного VQR-BE3.

SEQ ID NO: 24 представляет собой последовательность BV3L6 Cpf1 (AsCpf1) из *Acidaminococcus* sp, идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: U2UMQ6.1.

SEQ ID NO: 25 представляет собой последовательность ацтолактатсинтазы (ALS) (хлоропласта) из *Arabidopsis thaliana*, GenBank: AAW70386.

SEQ ID NO: 26 представляет собой последовательность протопорфириногенаоксидазы (PPO) из *Arabidopsis thaliana*.

SEQ ID NO: 27 представляет собой последовательность 5-енолпирувилликимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS) из *Arabidopsis thaliana*, зрелого белка после удаления транзитного пептида хлоропласта; учетный номер NCBI AAY25438.

SEQ ID NO: 28 представляет собой последовательность митохондриальной протопорфириногенаоксидазы из *Amaranthus tuberculatus* (PPX2L), см. учетный номер NCBI DQ386114.

Определения:

Следует отметить, что, в контексте настоящего документа, формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки на множественное число, если иное явно не следует из контекста. Например, ссылка на один компонент также подразумевает включение композиции, состоящей из множества компонентов. Ссылки на композицию, содержащую элемент «a», включают и другие элементы, помимо названного. Иными словами, термины «a», «an» и «the» не обозначают ограничение количества, а скорее обозначают наличие, «по меньшей мере, одного» из указанных элементов. Подразумевается, что каждый термин имеет самое широкое значение, как его понимают специалисты в данной области техники, и включает все технические эквиваленты, которые действуют аналогичным образом для достижения аналогичной цели.

Диапазоны в настоящем документе могут быть выражены следующим образом: от «примерно» или «приблизительно», или «по существу» одного конкретного значения и/или до «примерно» или «приблизительно», или «по существу» другого конкретного значения. Когда такой диапазон выражен, другие примерные варианты осуществления настоящего изобретения включают от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Кроме того, термин «примерно» означает – в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения, определенного одним из специалистов обычной квалификации в данной области

техники, который будет частично зависеть от того, как измеряется или определяется значение, то есть, от ограничений системы измерений. Например, «примерно» может означать – в пределах допустимого стандартного отклонения, согласно практике, существующей в данной области техники. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, «примерно» может означать диапазон до $\pm 20\%$, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – до от 5% до $\pm 10\%$, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – до $\pm 5\%$ и в еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – до $\pm 1\%$ от данного значения. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, в частности, в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать – в пределах порядка возрастания, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения – в 2-х кратном размере от значения. В тех случаях, когда конкретные значения описаны в заявке и формуле изобретения, если не указано иное, термин «примерно» является предполагаемым и в данном контексте означает – в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения.

Термин «содержащий» или «содержащий в себе», или «включающий» обозначает, что, по меньшей мере, названное соединение, элемент, частица или этап способа присутствует в композиции или изделии, или способе, но не исключает присутствия других соединений, материалов, частиц, этапов способа, даже если такие другие соединения, материал, частицы, этапы способа имеют ту же функцию, что и названное.

Термин «каталитически активный фрагмент», в контексте настоящего документа, применительно к аминокислотным последовательностям, обозначает сердцевинную последовательность, полученную из данной матричной аминокислотной последовательности, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность, содержащую весь или часть активного сайта матричной последовательности при условии, что полученный каталитически активный фрагмент все еще обладает активностью, характеризующей матричную последовательность, за которую отвечает активный сайт нативного фермента или его варианта. Указанные модификации подходят для генерации менее громоздких аминокислотных последовательностей, все еще обладающих той же активностью, что и матричная последовательность, что делает каталитически активный фрагмент более универсальным или более стабильным инструментом, являющимся стерически менее требовательным.

В контексте настоящего документа, термин «комплементарный» или «комплементарность» описывает взаимоотношения между двумя ДНК, двумя РНК или, если речь идет о гибридных последовательностях по настоящему изобретению, взаимоотношения между областью нуклеиновой кислоты РНК и областью нуклеиновой кислоты ДНК. Определяемые нуклеиновыми основаниями ДНК или РНК две области нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться друг с другом по типу ключ-замок. С этой целью применяются принципы спаривания оснований по Уотсону-Крику на основе аденина и тимина/урацила, а также гуанина и цитозина, соответственно, в качестве комплементарных оснований. Кроме того, термин «комплементарный», в контексте

настоящего документа, также содержит такие понятия, как спаривание оснований не по Уотсону-Крику, например, спаривание оснований, обратное спариванию по Уотсону-Крику, спаривание оснований по Хугстену, спаривание оснований, обратное спариванию по Хугстену и спаривание неоднозначных пар оснований, при условии, что соответствующие пары оснований могут образовывать водородные связи друг с другом, то есть, две разные цепи нуклеиновой кислоты могут гибридизоваться друг с другом на основе указанной комплементарности.

Термин «конструкция», особенно «генетическая конструкция» или «рекомбинантная конструкция», или «экспрессионная конструкция», в контексте настоящего документа, относится к конструкции, содержащей, среди прочего, плазмиды или плазмидные векторы, космиды, искусственные дрожжевые хромосомы или бактериальные искусственные хромосомы (YAC и BAC), фагемиды, векторы на основе бактериальных фагов, кассету экспрессии, выделенные последовательности одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоты, содержащие последовательности ДНК и РНК, или аминокислотные последовательности, вирусные векторы, включая модифицированные вирусы, и их комбинацию или смесь для введения или трансформации, трансфекции, или трансдукции в клетку-мишень или растение, растительную клетку, ткань, орган или материал, в соответствии с настоящим изобретением. Рекомбинантная конструкция по настоящему изобретению может содержать эффекторный домен, либо в форме последовательности нуклеиновой кислоты, либо аминокислотной последовательности, при этом, эффекторный домен представляет собой молекулу, которая может оказывать действие на клетку-мишень и включает трансген, молекулу одноцепочечной или двухцепочечной РНК, включая направляющую РНК, miРНК, одноцепочечную или двухцепочечную tracr/crРНК CRISPR, или siРНК, или аминокислотные последовательности, включая, среди прочего, фермент или его каталитически активный фрагмент, связывающий белок, антитело, фактор транскрипции, нуклеазу, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, сайт-специфичную нуклеазу и тому подобное. Кроме того, рекомбинантная конструкция может содержать регуляторные последовательности и/или последовательности локализации. Рекомбинантная конструкция может быть интегрирована в вектор, включая плазмидный вектор, и/или она может быть представлена изолированно от векторной структуры, например, в виде полипептидной последовательности или в виде не связанной с вектором одноцепочечной или двухцепочечной нуклеиновой кислоты. После ее введения, например, путем трансформации, генетическая конструкция может либо продолжать существовать экстрахромосомно, то есть, не быть интегрированной в геном клетки-мишени, например, в виде двухцепочечной или одноцепочечной ДНК, двухцепочечной или одноцепочечной РНК, либо в виде аминокислотной последовательности. В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, генетическая конструкция или ее части могут быть стабильно интегрированы в геном клетки-мишени, включая ядерный геном или другие генетические элементы клетки-мишени, включая геном пластид, таких как, митохондрии или хлоропласты. Термин «плазмидный вектор»,

используемый в этой связи, относится к генетической конструкции, первоначально полученной из плазмиды.

Термин «конструкция доставки» или «вектор доставки», в контексте настоящего документа, относится к любому биологическому или химическому инструменту, используемому в качестве груза для транспортировки нуклеиновой кислоты, включая гибридную нуклеиновую кислоту, содержащую РНК и ДНК, и/или интересующую аминокислотную последовательность, в клетку-мишень, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в эукариотическую клетку. Термин «конструкция доставки» или «вектор», в контексте настоящего документа, относится к инструменту транспортировки для доставки генетической или рекомбинантной конструкции по настоящему изобретению в клетку-мишень, ткань, орган или организм. Таким образом, вектор может содержать последовательности нуклеиновых кислот, при необходимости, содержащие последовательности, такие как, регуляторные последовательности или последовательности локализации для доставки, либо непосредственно, либо опосредованно, в представляющую интерес клетку-мишень или в структуру-мишень растения в желаемом клеточном компартменте растения. Вектор также может быть использован для введения аминокислотной последовательности или рибонуклео-молекулярного комплекса в клетку-мишень или в структуру-мишень. Как правило, вектор, в контексте настоящего документа, может представлять собой плазмидный вектор. Кроме того, в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения, осуществляется непосредственное введение интересующей конструкции или последовательности, или комплекса. Термин «непосредственное введение» подразумевает, что желаемая клетка-мишень или структура-мишень, содержащая последовательность ДНК-мишени, подлежащая модификации по настоящему изобретению, непосредственно трансформируется или трансдуцируется, или трансфицируется в интересующую специфичную клетку-мишень, где материал, доставленный вектором доставки, будет оказывать свое действие. Термин «опосредованное введение» подразумевает, что введение осуществляется в структуру, например, в клетки листьев или клетки органов, или тканей, которые сами по себе не представляют интересующую фактическую клетку-мишень или структуру-мишень, подлежащую трансформации, но эти структуры служат основой для системного распространения и переноса вектора, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, содержащего генетическую конструкцию по настоящему изобретению в фактическую структуру-мишень, например, в меристематическую клетку или ткань, или ствольную клетку, или ткань. Если термин «вектор» используется в контексте трансфекции аминокислотных последовательностей и/или нуклеиновых последовательностей, включая последовательности гибридных нуклеиновых кислот, в клетку-мишень, то термин «вектор» подразумевает подходящие агенты для пептидной или белковой трансфекции, такие как, например, смеси ионных липидов, проникающие в клетки пептиды (CPP), или бомбардировка частицами. В контексте введения материала нуклеиновой кислоты, термин «вектор» не только подразумевает плазмидные векторы, но также и подходящие материалы-носители, которые могут

служить основой для введения нуклеиновой кислоты и/или доставки аминокислотной последовательности в представляющую интерес клетку-мишень, например, посредством бомбардировки частицами. Указанный материал-носитель содержит, среди прочего, частицы золота или вольфрама. Наконец, термин «вектор» также подразумевает использование вирусных векторов для введения, по меньшей мере, одной генетической конструкции по настоящему изобретению, такой как, например, модифицированные вирусы, например, полученные из следующих штаммов вирусов: аденовирусные или адено-ассоциированные вирусные (AAV) векторы, лентивирусные векторы, вирус простого герпеса (HSV-1), вирус коровьей оспы, вирус Сендай, вирус Синдбис, альфавирусы леса Семлики, вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус полосатости кукурузы (MSV), вирус ложной штриховатости ячменя (BSMV), вирус мозаики костра (BMV, учетные номера: РНК 1: X58456; РНК2: X58457; РНК3: X58458), вирус штриховатости кукурузы (MSpV), вирус кукурузы *rayado fino* (MRFV), вирус желтой карликовости кукурузы (MYDV), вирус карликовой мозаики кукурузы (MDMV), вирусы с положительной цепью РНК семейства *Benyviridae*, например, вирус некротической желтой прожилковатой свеклы (учетные номера: РНК 1: NC_003514; РНК2: NC_003515; РНК3: NC_003516; РНК4: NC_003517) или семейства *Bromoviridae*, например, вирусы рода *вируса мозаики люцерны* (учетные номера: РНК1: NC_001495; РНК2: NC_002024; РНК3: NC_002025) или рода *Bromovirus*, например, BMV (см. выше), или рода *Cuscutavirus*, например, вирус огуречной мозаики (учетные номера: РНК1: NC_002034; РНК2: NC_002035; РНК3: NC_001440) или рода *Oleavirus*, вирусы dsДНК семейства *Caulimoviridae*, в частности, семейства *Badnavirus* или *Caulimovirus*, например, различные вирусы *полосатости банана* (например, учетные номера: NC_007002, NC_015507, NC_006955 или NC_003381) или *вирус мозаики цветной капусты* (учетный номер: NC_001497), или вирусы рода *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus* или *Tungrovirus*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Closteroviridae*, например, рода *Ampelovirus*, *Crinivirus*, например, *вирус инфекционной желтухи латука* (учетные номера: РНК 1: NC_003617; РНК2: NC_003618) или *вирус хлороза томата* (учетные номера: РНК 1: NC_007340; РНК2: NC_007341), *Closterovirus*, например, *вирус желтухи свеклы* (учетный номер: NC_001598), или *Velarivirus*, вирусы с одноцепочечной ДНК (+/-) семейства *Geminiviridae*, например, вирусы семейства *Becurtovirus*, *Begomovirus*, например, *вирус золотисто-желтой мозаики бобов*, *вирус курчавости побегов табака*, *вирус курчавости крапчатых листьев табака*, *вирус хлоротической крапчатости томата*, *вирус карликовости листьев томата*, *вирус золотистой мозаики томата*, *вирус курчавости листьев томата*, *вирус крапчатости томата*, или *вирус желтой пятнистости томата*, или *Geminiviridae* рода *Curtovirus*, например, *вирус курчавости верхушки свеклы*, или *Geminiviridae* рода *Topocuvirus*, *Turncurtvirus* или *Mastrevirus*, например, *вирус полосатости кукурузы* (см. выше), *вирус желтой карликовости табака*, *вирус карликовости пшеницы*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Luteoviridae*, например, рода *Luteovirus*, например, *вирус желтой карликовости ячменя PAV* (учетный номер: NC_004750), или рода *Polerovirus*, например, *вирус скручивания листьев картофеля* (учетный номер:

NC_001747), вирусы с одноцепочечной ДНК семейства *Nanoviridae*, содержащие род *Nanovirus* или *Babuvirus*, вирусы с двухцепочечной РНК семейства *Partiviridae*, содержащие, среди прочего, семейства *Alphapartitivirus*, *Betapartitivirus* или *Deltapartitivirus*, вирионы семейства *Pospiviroidae*, вирусы с положительной цепью РНК семейства *Potyviridae*, например, содержащего род *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, например, вирус мозаики пшеницы (учетный номер: NC_012799) или *Potyviridae* рода *Potyvirus*, например, вирус мозаики свеклы (учетный номер: NC_005304), вирус карликовой мозаики кукурузы (учетный номер: NC_003377), вирус *Y* картофеля (учетный номер: NC_001616), или вирус мозаики мауса (учетный номер: NC_018833), или *Potyviridae* рода *Tritimovirus*, например, вирус полосатой мозаики кострца (учетный номер: NC_003501) или вирус полосатой мозаики пшеницы (учетный номер: NC_001886), вирусы с одноцепочечной РНК семейства *Pseudoviridae*, например, рода *Pseudovirus*, или *Sirevirus*, вирусы с двухцепочечной РНК семейства *Reoviridae*, например, вирус карликовости риса (учетный номер: РНК1: NC_003773; РНК2: NC_003774; РНК3: NC_003772; РНК4: NC_003761; РНК5: NC_003762; РНК6: NC_003763; РНК7: NC_003760; РНК8: NC_003764; РНК9: NC_003765; РНК10: NC_003766; РНК11: NC_003767; РНК12: NC_003768), вирусы с положительной цепью РНК семейства *Tombusviridae*, например, содержащего род *Alphanecrovirus*, *Aureusvirus*, *Betanecrovirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Gallantivirus*, *Macanavirus*, *Machlomovirus*, *Panicovirus*, *Tombusvirus*, *Umbravirus* отряда *Zeavirus*, например, вирус некротический полосатости мауса (учетный номер: NC_007729), или вирусы с положительной цепью РНК семейства *Virgaviridae*, например, вирусы рода *Furovirus*, *Hordeivirus*, например, вирус ложной штриховатости ячменя (учетный номер: РНК1: NC_003469; РНК2: NC_003481; РНК3: NC_003478), или рода *Peculovirus*, *Pomovirus*, *Tobamovirus*, или *Tobravirus*, например, вирус погрелковости табака (учетный номер: РНК1: NC_003805; РНК2: NC_003811), а также вирусы с отрицательной цепью РНК отряда *Mononegavirales*, в частности, семейства *Rhabdoviridae*, например, вирус желтой ложной штриховатости ячменя (учетный номер: KM213865) или вирус некротической желтухи латука (учетный номер/образец: NC_007642/ AJ867584), вирусы с положительной цепью РНК отряда *Picornavirales*, в частности, семейства *Secoviridae*, например, рода *Comovirus*, *Fabavirus*, *Nepovirus*, *Cheravirus*, *Sadwavirus*, *Sequivirus*, *Torradovirus* или *Waikavirus*, вирусы с положительной цепью РНК отряда *Tymovirales*, в частности, семейства *Alphaflexiviridae*, например, вирусы рода *Allexivirus*, *Lolavirus*, *Mandarivirus* или *Potexvirus*, *Tymovirales*, в частности, семейства *Betaflexiviridae*, например, вирусы рода *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Tepovirus*, или *Vitivirus*, вирусы с положительной цепью РНК отряда *Tymovirales*, в частности, семейства *Tymoviridae*, например, вирусы отряда *Maculavirus*, *Marafivirus* или *Tymovirus*, и бактериальные векторы, такие как, например, *Agrobacterium spp.*, такие как, например, *Agrobacterium tumefaciens*. Наконец, термин «вектор» также подразумевает подходящие химические транспортные агенты для введения линейных последовательностей нуклеиновых кислот (одноцепочечных или двухцепочечных) или аминокислотных последовательностей, или их комбинации в клетку-мишень в сочетании с физическим способом

введения, включая полимерные конструкции для доставки или конструкции доставки на основе липидов.

Подходящие конструкции доставки или векторы доставки, таким образом, содержат биологические инструменты для доставки нуклеотидных последовательностей в клетку-мишень, включая вирусные векторы, *Agrobacterium spp.* или конструкции доставки химических веществ, включая наночастицы, например, мезопористые наночастицы диоксида кремния (MSNP), катионные полимеры, включая подходы на основе полимеров PEI (полиэтилениминовых) или таких полимеров, как DEAE-декстран, или нековалентное поверхностное присоединение PEI для генерирования катионных поверхностей, липидных или полимерных пузырьков, или их комбинаций. Липидные или полимерные пузырьки могут быть выбраны, например, из липидов, липосом, систем липидной инкапсуляции, наночастиц, составов малых частиц нуклеиновых кислот и липидов, полимеров и полимерсомов.

В контексте настоящего документа, термин «производное» или «потомок», или «потомство», в контексте прокариотической или эукариотической клетки, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, животной клетки и, в более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, растения или растительной клетки, или растительного материала, в соответствии с настоящим изобретением, относится к потомкам такой клетки или материала, которые являются результатом естественного репродуктивного размножения, включая размножение половым и бесполом путем. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что указанное размножение может привести к введению мутаций в геном организма в результате природных явлений, что приводит к появлению потомка или потомства, которое, в геномическом смысле, отличается от родительского организма или клетки, однако, оно все еще принадлежит к тому же роду/виду и обладает, в основном, теми же характеристиками, что и родительская рекомбинантная клетка-хозяин. Такие производные или потомки, или потомство, возникающие в результате природных явлений во время репродукции или регенерации, таким образом, включены в термин, используемый в настоящем изобретении. Кроме того, термин «производное» может подразумевать, в контексте вещества или молекулы, а не в контексте клетки или организма, непосредственно или опосредованно, посредством модификации, полученное от другого. Это может подразумевать последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из клетки или растительного метаболита, полученного из клетки или материала. Таким образом, эти термины не относятся к какому-либо произвольному производному, потомку или потомству, а скорее к производному, или потомку, или предку, филогенетически ассоциированному, то есть, основанному на родительской клетке или вирусе, или на их молекуле, принимая во внимание тот факт, что эта взаимосвязь между производным, потомком, или потомством, и «родителем» может быть явным образом определена специалистом в данной области техники.

Кроме того, в контексте настоящего документа, термины «полученный», «полученный из» или «производное», в контексте биологической последовательности (нуклеиновой кислоты или

аминокислоты) или молекулы, или комплекса, подразумевают, что соответствующая последовательность основана на стандартной/эталонной последовательности, например, из списка последовательностей или учетного номера базы данных, или соответствующей структуры скаффолда, то есть, происходящей из указанной последовательности, тогда как стандартная/эталонная последовательность может содержать больше последовательностей, например, весь геном или полноразмерную последовательность, кодирующую полипротеины, вируса, тогда как последовательность, «полученная из» нативной последовательности, может содержать только один свой изолированный фрагмент или свой когерентный фрагмент. В этом контексте, можно сказать, что молекула сДНК или РНК «получена из» последовательности ДНК, служащей в качестве молекулярной матрицы. Таким образом, специалист в данной области техники может легко определить последовательность, «полученную из» стандартной/эталонной последовательности, которая, посредством выравнивания последовательности на уровне ДНК или аминокислоты, будет иметь высокую идентичность с соответствующей стандартной/эталонной последовательностью, и которая будет иметь когерентные удлинения ДНК/аминокислот совместно с соответствующей стандартной/эталонной последовательностью (> 75% запрашиваемой идентичности для заданной длины выровненной молекулы при условии, что полученная последовательность является запрошенной, а стандартная/эталонная последовательность представляет собой субъект во время выравнивания последовательности). Таким образом, специалист в данной области техники может клонировать соответствующие последовательности на основе изобретения, предложенного в настоящем документе, посредством полимеразных цепных реакций и тому подобного, в интересующую подходящую векторную систему, или использовать последовательность в качестве векторного скаффолда. Термин «полученный из», таким образом, не представляет произвольную последовательность, но он представляет последовательность, соответствующую стандартной/эталонной последовательности, из которой она получена, в то время как определенные различия, например, определенные мутации, естественным образом возникающие во время репликации рекомбинантной конструкции в клетке-хозяине, не могут быть исключены и, таким образом, включены в термин «полученный из». Кроме того, некоторые удлинения последовательности из родительской последовательности могут быть последовательно соединены в последовательность, полученную из родительской последовательности. Различные удлинения будут иметь высокую или даже 100% гомологию с родительской последовательностью. Специалисту в данной области техники хорошо известен тот факт, что последовательность искусственных молекулярных комплексов по настоящему изобретению, если она предложена или предложена частично в виде последовательности нуклеиновой кислоты, будет затем транскрибирована и, при необходимости, транслирована *in vivo* и, возможно, будет подвергнута дальнейшему расщеплению и/или обработке внутри клетки-хозяина (расщепление сигнальных пептидов, эндогенное биотинилирование и так далее), таким образом, термин «полученный из» указывает на корреляцию с последовательностью, первоначально использованной в соответствии с раскрытием настоящего изобретения.

В контексте настоящего документа, термин «слияние» может относиться к белку и/или нуклеиновой кислоте, содержащей, по меньшей мере, одну нативную последовательность (например, фрагменты молекулы). Слияние может быть на N-терминальном или C-терминальном конце модифицированного белка, или на них обоих, или в пределах молекулы в виде отдельного домена. В отношении молекул нуклеиновых кислот, молекула слияния может быть присоединена на 5'- или 3'-конце, или в любом подходящем положении между ними. Слияние может представлять собой транскрипционное и/или трансляционное слияние. Слияние может содержать, по меньшей мере, одну одинаковую ненативную последовательность. Слияние может содержать, по меньшей мере, одну отличную ненативную последовательность. Слияние может представлять собой химеру. Слияние может содержать аффинную метку нуклеиновой кислоты. Слияние может содержать штрих-код. Слияние может содержать пептидную аффинную метку. Слияние может предложить субклеточную локализацию сайт-специфичного эффектора или редактора основания (например, сигнал ядерной локализации (NLS) для нацеливания на ядро, сигнал митохондриальной локализации для нацеливания на митохондрию, сигнал хлоропластной локализации для нацеливания на хлоропласт, сигнал удержания эндоплазматического ретикулума 15 (ER) и тому подобное). Слияние может предложить ненативную последовательность (например, аффинную метку), которую можно использовать для отслеживания или очистки. Слияние может представлять собой малую молекулу, такую как, биотин или краситель, такой как, красители Alexa Fluor, краситель Цианин-3, краситель Цианин-5. Слияние может предложить повышенную или пониженную стабильность. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, слияние может содержать определяемую метку, включая фрагмент молекулы, который может предложить определяемый сигнал. Подходящие определяемые метки и/или фрагменты молекулы, которые могут предложить определяемый сигнал, могут включать, но этим не ограничиваются, фермент, радиоизотоп, участника специфичной связывающейся пары; флуорофор; флуоресцентный репортер или флуоресцентный белок; квантовую точку; и тому подобное. Слияние может содержать участника пары FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции) или флуорофорную пару/пару донора квантовой точки/акцепторную пару. Слияние может содержать фермент. Подходящие ферменты могут включать, но этим не ограничиваются, пероксидазу хрена, люциферазу, бета-25-галактозидазу и тому подобное. Слияние может содержать флуоресцентный белок. Подходящие флуоресцентные белки могут включать, но этим не ограничиваются, зеленый флуоресцентный белок (GFP) (например, GFP из *Aequoria victoria*, флуоресцентные белки из *Anguilla japonica*, или их мутант, или производное), красный флуоресцентный белок, желтый флуоресцентный белок, желто-зеленый флуоресцентный белок (например, mNeonGreen, полученный из тетрамерного флуоресцентного белка из головохордового *Branchiostoma lanceolatum*), любой из множества флуоресцентных и окрашенных белков. Слияние может содержать наночастицу. Подходящие наночастицы могут включать флуоресцентные или люминесцентные наночастицы, а также магнитные наночастицы или наноалмазы, при необходимости, сцепленные с наночастицей. Любое оптическое или

магнитное свойство, или характеристику наночастицы(наночастиц) можно определить. Слияние может содержать геликазу, нуклеазу (например, FokI), эндонуклеазу, экзонуклеазу (например, 5'-экзонуклеазу и/или 3'-экзонуклеазу), лигазу, никазу, нуклеазу-геликазу (например, Cas3), ДНК-метилтрансферазу (например, Dam), или ДНК-деметилазу, гистонметилтрансферазу, гистондеметилазу, ацетилазу (включая, например, и этим не ограничиваясь, гистонацетилазу), деацетилазу (включая, например, и этим не ограничиваясь, гистондеацетилазу), фосфатазу, киназу, (ко)активатор транскрипции, (ко)фактор транскрипции, субъединицу РНК-полимеразы, репрессор транскрипции, ДНК-связывающий белок, ДНК-структурирующий белок, длинную некодирующую РНК, репарационный белок ДНК (например, белок, участвующий в репарации либо одноцепочечных, и/либо двухцепочечных разрывов, например, белки, участвующие в эксцизионной репарации оснований, эксцизионной репарации нуклеотидов, репарации ошибочно спаренных оснований, NHEJ, HR, микрогомологически опосредованном соединении концов (MMEJ) и/или в другом негомологичном соединении концов (ANHEJ), таком как, например, и этим не ограничиваясь, регуляторы HR и сигналы сборки комплекса HR), маркерный белок, репортерный белок, флуоресцентный белок, лиганд-связывающий белок (например, mCherry или белок, связывающий тяжелые металлы), сигнальный пептид (например, Tat-сигнальная последовательность), нацеливающий белок или пептид, последовательность субклеточной локализации (например, последовательность ядерной локализации, последовательность хлоропластной локализации) и/или эпитоп антитела, или любую их комбинацию.

Термин «генетически модифицированный» или «генетическая манипуляция», или «под воздействием генетических манипуляций» используется в контексте настоящего документа в широком смысле и означает любую модификацию последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, клетки-мишени, ткани, органа или организма, которая осуществляется путем вмешательства человека, либо непосредственно, либо опосредованно, для воздействия на эндогенный генетический материал или транскриптом, или протеом клетки-мишени, ткани, органа или организма для модификации его целенаправленно, в результате чего он отличается от своего состояния, в котором он находился без вмешательства человека. Вмешательство человека может происходить либо *in vitro*, либо *in vivo/in planta*, либо в обоих случаях. Могут быть включены дополнительные модификации, например, по меньшей мере, одна точечная мутация, например, для целенаправленной белковой инженерии или для оптимизации кодонов, делеции(й) и, по меньшей мере, одной вставки или делеции, по меньшей мере, одной молекулы нуклеиновой кислоты или аминокислоты (включая также гомологичную рекомбинацию), модификации последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, или их комбинации. Термины также должны содержать молекулу нуклеиновой кислоты или молекулу аминокислоты, или клетку-хозяина, или организм, включая растение или его растительный материал, который подобен/подобны сопоставимой последовательности, организму или материалу природного происхождения, но которые были сконструированы, по меньшей мере, посредством одного этапа целенаправленной манипуляции.

Таким образом, термин «целенаправленная генетическая манипуляция» или «целенаправленная модификация (основания)», в контексте настоящего документа, представляет собой результат «генетической манипуляции», которая осуществляется целенаправленным образом, то есть, в конкретном положении в клетке-мишени и при специфических подходящих обстоятельствах для достижения желаемого эффекта в, по меньшей мере, одной клетке, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в растительной клетке, подлежащей манипуляции, при этом, данный термин подразумевает, что последовательность, подлежащая нацеливанию, и соответствующая модификация основаны на аспектах предшествующей последовательности, в результате чего полученную модификацию можно планировать заранее, например, на основе имеющейся информации о последовательности сайта-мишени в геноме клетки и/или на основе информации о целевой специфичности (свойства распознавания или связывания нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, комплементарное спаривание оснований и тому подобное) интересующего молекулярного инструмента.

Термин «геном» относится ко всему комплементу генетического материала (гены и некодирующие последовательности), который присутствует в каждой клетке организма, или в вирусе, или в органелле; и/или к полному набору хромосом, унаследованных в виде (гаплоидной) единицы от одного родителя. В контексте настоящего документа, термин «бомбардировка частицами», также называемый «биолистической трансфекцией» или «опосредованным микрочастицами переносом генов», относится к способу физической доставки для переноса покрытой микрочастицы или наночастицы, содержащей интересующую нуклеиновую кислоту или генетическую конструкцию, в клетку-мишень или ткань-мишень. Микрочастица или наночастица функционирует как снаряд, и ею обстреливают интересующую структуру-мишень под высоким давлением с использованием подходящего устройства, зачастую называемого генной пушкой. При трансформации посредством бомбардировки частицами используют микрочастицу металла, покрытую интересующим геном, которой затем расстреливают клетки-мишени с использованием оборудования, известного как «генная пушка» (Сэндфорд и др., 1987) с достаточно высокой скоростью (~1500 км/ч), что позволяет достаточно быстро проникнуть в клеточную стенку ткани-мишени, но не настолько стремительно, чтобы вызвать гибель клетки. Для протопластов, у которых клеточная стенка полностью удалена, условия, естественно, отличаются. Осажденная нуклеиновая кислота или генетическая конструкция на, по меньшей мере, одной микрочастице, высвобождается в клетку после бомбардировки и интегрируются в геном. Ускорение микрочастиц осуществляется посредством высоковольтного электрического разряда или сжатого газа (гелия). Что касается используемых металлических частиц, то обязательно, чтобы они были нетоксичными, нереактивными, и чтобы они имели меньший диаметр, чем клетка-мишень. Чаще всего используются золото или вольфрам. Существует большой объем общедоступной информации от производителей и поставщиков генных пушек и ассоциированной с ними системы, касающейся общих условий их использования.

Термины «редактирование генома» и «геномная инженерия» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к стратегиям и методам целенаправленной, специфичной модификации любой генетической информации или генома живого организма. Как таковые, эти термины содержат редактирование генов, но также и редактирование областей, отличных от областей генома, кодирующих гены. Они также включают редактирование или инженерию ядра (если имеется), а также другую генетическую информацию клетки. Кроме того, термины «редактирование генома» и «геномная инженерия» также содержат эпигенетическое редактирование или инженерию, то есть, целенаправленную модификацию, например, метилирование, модификацию гистонов или некодирующих РНК, возможно, вызывающих наследственные изменения в экспрессии генов.

Термин «идиоплазма», в контексте настоящего документа, используется для описания генетических ресурсов или, точнее, ДНК организма и коллекций этого материала. В технологии размножения термин «идиоплазма» используется для обозначения коллекции генетического материала, из которого может быть создано новое растение или сорт растения.

Термины «направляющая РНК», «gРНК» или «одноцепочечная направляющая РНК», или «sgРНК» используются взаимозаменяемо в настоящем документе, и либо относятся к синтетическому слиянию CRISPR РНК (сгРНК) и транскриптивной сгРНК (trасгРНК), либо этот термин относится к молекуле одноцепочечной РНК, состоящей только из сгРНК и/или trасгРНК, либо этот термин относится к gРНК, отдельно содержащей фрагмент молекулы сгРНК или trасгРНК. Таким образом, фрагменты молекулы trасг и сгРНК не обязательно должны присутствовать на одной ковалентно присоединенной молекуле РНК, но они также могут присутствовать в двух отдельных молекулах РНК, которые могут ассоциироваться, или они могут быть ассоциированы посредством нековалентного или ковалентного взаимодействия для предложения gРНК по настоящему изобретению. Термины «gДНК» или «sgДНК», или «направляющая ДНК» используются в настоящем документе взаимозаменяемо, и оба относятся к молекуле нуклеиновой кислоты, взаимодействующей с нуклеазой Аргонавтом. Как gРНК, так и gДНК, раскрытые в настоящем документе, называются «направляющими нуклеиновыми кислотами» или «гидовыми нуклеиновыми кислотами» вследствие их способности взаимодействовать с сайт-специфичной нуклеазой и содействовать нацеливанию указанной сайт-специфичной нуклеазы на сайт-мишень в геноме.

В контексте настоящего документа, термины «мутация» и «модификация» используются взаимозаменяемо для обозначения делеции, вставки, добавления, замещения, редактирования, разрыва цепи и/или введения аддукта в контексте манипуляции с нуклеиновой кислотой *in vivo* или *in vitro*. Делеция определяется как изменение последовательности нуклеиновой кислоты, в которой отсутствует, по меньшей мере, один нуклеотид. Вставка или добавление представляет собой такое изменение последовательности нуклеиновой кислоты, которое привело к добавлению, по меньшей мере, одного нуклеотида. «Замещение» или редактирование происходит в результате замены, по меньшей мере, одного нуклеотида молекулой, которая отличается от молекулы из

замененного, по меньшей мере, одного нуклеотида. Например, нуклеиновая кислота может быть заменена другой нуклеиновой кислотой, такой как, приведенная в качестве примера при замене тимина цитозином, аденином, гуанином или уридином. Замещения пиримидина на пиримидин (например, нуклеотидные замещения С на Т or Т на С) или пурина на пурин (например, нуклеотидные замещения G на A или A на G) называются транзициями, тогда как замещения пиримидина на пурин или пурина на пиримидин (например, G на T или G на C, или A на T, или A на C) называются трансверсиями. В альтернативной варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеиновая кислота может быть заменена модифицированной нуклеиновой кислотой, такой как, приведенная в качестве примера при замене тимина тимингликолем. Мутации могут привести к ошибочному спариванию оснований. Термин «ошибочное спаривание оснований» относится к нековалентному взаимодействию между двумя нуклеиновыми кислотами, каждая из которых находится на другой нуклеотидной последовательности или молекуле нуклеиновой кислоты, которая не соответствует правилам спаривания оснований. Например, у частично комплементарных последовательностей 5'-AGT-3' и 5'-AAT-3' присутствует ошибочное спаривание оснований G-A (транзигция).

Термины «нуклеотид» и «нуклеиновая кислота», применительно к последовательности или молекуле, используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к одноцепочечной или двухцепочечной ДНК или РНК природного или синтетического происхождения. Таким образом, термин «нуклеотидная последовательность» используется для любой последовательности ДНК или РНК независимо от ее длины, таким образом, этот термин содержит любую нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, один нуклеотид, а также и любой вид более крупного олигонуклеотида или полинуклеотида. Таким образом, термин(ы) относится к последовательностям природных и/или синтетических дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) и/или рибонуклеиновых кислот (РНК), которые, при необходимости, могут содержать аналог синтетической нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, при необходимости, может быть кодон-оптимизированной. Термин «оптимизация кодонов» подразумевает, что использование кодонов ДНК или РНК адаптировано к использованию кодонов представляющей интерес клетки или организма для улучшения скорости транскрипции указанной рекомбинантной нуклеиновой кислоты в представляющей интерес клетке или организме. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что нуклеиновая кислота-мишень может быть модифицирована в одном положении из-за вырождения кодонов, при этом, эта модификация все равно приведет к той же аминокислотной последовательности в этом положении после трансляции, которое достигается оптимизацией кодонов с учетом использования видоспецифичных кодонов клетки-мишени или организма. Последовательности нуклеиновой кислоты по настоящей заявке могут нести оптимизацию специфичных кодонов для следующего неограничивающего списка организмов: *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Secale cereale*, *Saccharum officinarum*, *Zea mays*, *Setaria italic*, *Oryza sativa*, *Oryza minuta*, *Oryza australiensis*, *Oryza a/ta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticale*, *Hordeum*

bulbosum, Brachypodium distachyon, Hordeum marinum, Aegilops tauschii, Ma/us domestica, Beta vulgaris, Helianthus annuus, Daucus glochidiatus, Daucus pusillus, Daucus muricatus, Daucus carota, Eucalyptus grandis, Erythranthe guttata, Genlisea aurea, Nicotiana sylvestris, Nicotiana tabacum, Nicotiana tomentosiformis, Nicotiana benthamiana, Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum, Coffea canephora, Vitis vinifera, Cucumis sativus, Marus notabilis, Arabidopsis thaliana, Arabidopsis lyrata, Arabidopsis arenosa, Crucihimalaya himalaica, Crucihimalaya wallichii, Cardamine flexuosa, Lepidium virginicum, Capsella bursa-pastoris, Olmarabidopsis pumila, Arabis hirsuta, Brassica napus, Brassica oleracea, Brassica rapa, Brassica juncacea, Brassica nigra, Raphanus sativus, Eruca vesicaria sativa, Citrus sinensis, Jatropha curcas, Glycine max, Gossypium ssp., Populus trichocarpa, Mus musculus, Rattus norvegicus или Homo sapiens.

В контексте настоящего документа, термин «нуклеотид», как правило, может относиться к комбинации: основание-сахар-фосфат. Нуклеотид может содержать синтетический нуклеотид. Нуклеотид может содержать аналог синтетического нуклеотида. Нуклеотиды могут представлять собой мономерные звенья последовательности нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК)). Термин «нуклеотид» может включать рибонуклеозидтрифосфаты, аденозинтрифосфат (АТР), уридинтрифосфат (УТР), цитозинтрифосфат (СТР), гуанозинтрифосфат (ГТР) и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, такие как dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP или их производные. Такие производные могут включать и этим не ограничиваются, например, [aS]dATP, 7-деаза-dGTP и 7-деаза-dATP, а также нуклеотидные производные, которые придают устойчивость нуклеазам на молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей их. Термин «нуклеотид», в контексте настоящего документа, может относиться к дидезоксирибонуклеозидтрифосфатам (ddNTP) и их производным. Иллюстративные примеры дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов могут включать, но этим не ограничиваются, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP и ddTTP. Нуклеотид может быть немеченным или меченным с возможностью определения посредством хорошо известных методов. Мечение также может быть выполнено с помощью квантовых точек. Определяемые метки могут включать, например, радиоактивные изотопы, флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки и ферментные метки. Флуоресцентные метки нуклеотидов могут включать, но этим не ограничиваются, флуоресцеин, 5-карбоксифлуоресцеин (FAM), 2'7'-5-диметокси-4'5-дихлоро-6-карбоксифлуоресцеин (JOE), родамин, 6-карбоксиродамин (R6G), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA), 6-карбокси-X-родамин (ROX), 4-(4'-диметиламинофенилазо)бензойная кислота (DABCYL), красители: Cascade Blue, Oregon Green, Texas Red, Цианин и 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфокислота (EDANS).

В контексте настоящего документа, термин «ненативный» или «неприродного происхождения», или «искусственный» может относиться к последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида, или к любой другой биомолекуле, такой как, биотин или флуоресцеин, которая не обнаружена в нативной нуклеиновой кислоте или белке. Термин «ненативный» может

относится к афинным меткам. Термин «ненативный» может относиться к слияниям. Термин «ненативный» может относиться к последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида природного происхождения, которая содержит мутации, вставки и/или делеции. Ненативная последовательность может проявлять и/или кодировать активность (например, ферментную активность, активность метилтрансферазы, активность ацетилтрансферазы, активность киназы, активность убиквитина и так далее), которая также может проявляться посредством последовательности нуклеиновой кислоты и/или полипептида с которой слита ненативная последовательность. Ненативная последовательность нуклеиновой кислоты или полипептида может быть сцеплена с последовательностью нуклеиновой кислоты или полипептида (или их варианта) природного происхождения посредством генной инженерии для генерирования химерной последовательности нуклеиновой кислоты и/или полипептида, кодирующей химерную нуклеиновую кислоту и/или полипептид. Ненативная последовательность может относиться к 3'-гибридизирующейся удлиненной последовательности.

В контексте настоящего документа, термин «фитотоксичный» или «фитотоксичность», в контексте растительных клеток, тканей, органов или растений, относится к цитотоксическому действию или цитотоксичности в целом применительно к растению или любой растительной клетке. Данный термин, таким образом, подразумевает токсическое действие, оказываемое соединением или триггером на растение, ингибирующее, повреждающее или даже убивающее растительную клетку, ткань, орган или целое растение. Такое повреждение может быть вызвано разнообразными соединениями, включая гербициды, пестициды, микропримеси металла, токсические эффекторы, индуцированные патогеном, фитотоксины солености или аллелохимические вещества. Кроме того, данный термин также относится к фитогормонам растений, например, но не этим ограничиваясь, к гормонам для регуляции иммунных ответов растений, таким как, этилен, жасмоновая кислота и салициловая кислота, или к гормонам растений, таким как, ауксины, абсцизовая кислота (ABA), цитокинины, гиббереллины и brassinosteroids, которые регулируют развитие и рост растений.

В контексте настоящего документа, термин «растение» относится ко всему организму растения, органу растения, к дифференцированным и недифференцированным растительным тканям, растительным клеткам, семенам и их производным, и к их потомству. Термин «растительные клетки» включают без ограничения, например, клетки из семян, из зрелых и незрелых зародышей, меристематических тканей, проростков, каллюсных тканей в различных состояниях дифференцировки, листьев, цветов, корней, побегов, гаметофитов, спорофитов, пыльцы и микроспор, протопластов, макроводорослей и микроводорослей. Различные растительные клетки также могут быть гаплоидными, диплоидными или полиплоидными. Термин «орган растения» относится к растительной ткани или группе тканей, которые составляют морфологически и функционально отличную часть растения.

В контексте настоящего документа, термин «растительный материал» относится к любому материалу, который может быть получен из растения на любой стадии развития. Растительный

материал может быть получен из культуры растения или растительной ткани, или из его органа либо *in planta*, либо *in vitro*. Этот термин, таким образом, включает растительные клетки, ткани и органы, а также развитые структуры растения, а также субклеточные компоненты, такие как, нуклеиновые кислоты, полипептиды и все химические вещества растения или метаболиты, которые могут быть выявлены в растительной клетке или компартменте, и/или которые могут быть продуцированы растением, или которые могут быть получены из экстракта любой растительной клетки, ткани или растения на любой стадии развития. Этот термин также содержит производное растительного материала, например, протопласт, полученный из, по меньшей мере, одной растительной клетки, содержащей растительный материал. Таким образом, этот термин также содержит меристематические клетки или меристематическую ткань растения.

Термин «плазида» относится к кольцевому автономно реплицирующемуся экстрахромосомному элементу в виде последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты. В области генной инженерии эти плазмиды обычно подвергают целенаправленным модификациям путем вставления, например, генов, кодирующих устойчивость к антибиотику или гербициду, гена, кодирующего последовательность-мишень нуклеиновой кислоты, последовательность локализации, регуляторную последовательность, меченую последовательность, маркерного гена, включая маркер антибиотика или флуоресцентный маркер, и тому подобное. Структурные компоненты исходной плазмиды, как источника репликации, сохраняются. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения, последовательность локализации может содержать последовательность ядерной локализации, последовательность пластидной локализации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, последовательность митохондриальной локализации или последовательность хлоропластной локализации. Указанные последовательности локализации доступны специалисту в области биотехнологии растений. Разнообразные плазмидные векторы для использования в различных представляющих интерес клетках-мишенях доступны на рынке, и их модификация известна специалисту в соответствующей области техники.

Термин «полимеразная цепная реакция» (PCR) представляет собой метод синтеза специфического сегмента ДНК. PCR содержит серию повторяющихся циклов денатурации, отжигания и удлинения. Как правило, двухцепочечную ДНК денатурируют нагреванием, и два праймера, комплементарные 3'-концевым границам сегмента-мишени, отжигают до ДНК при низкой температуре, а затем удлиняют при промежуточной температуре. Одна последовательность из этих трех последовательных этапов называется «циклом».

Термин «потомство» содержит любое последующее поколение растения, растительной клетки или растительной ткани.

В контексте настоящего документа, термин «регуляторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, которая может направлять транскрипцию и/или трансляцию, и/или модификацию интересующей последовательности нуклеиновой кислоты.

Термины «белок», «аминокислота» или «полипептид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к аминокислотной последовательности, имеющей каталитическую ферментативную функцию или обладающей структурным, или функциональным действием. Термин «аминокислота» или «аминокислотная последовательность», или «молекула аминокислоты» содержит любой природный или химически синтезированный белок, пептид, полипептид и фермент или модифицированный белок, пептид, полипептид и фермент, при этом, термин «модифицированный» содержит любую химическую или ферментативную модификацию белка, пептида, полипептида и фермента, включая усечения последовательности дикого типа до более короткой, но все еще активной части.

В соответствии с настоящим изобретением, могут быть использованы общепринятые методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, известные специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, Сэмбрук, Фрич и Маниатис, *Молекулярное клонирование: инструкция по проведению лабораторных работ*, Второе издание (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк (в данном документе, «Сэмбрук и др., 1989»); *Клонирование ДНК: практический подход*, Тома I и II (под редакцией Д.Н. Гловера, 1985); *Синтез олигонуклеотидов* (под редакцией М.Дж. Гейта, 1984); *Гибридизация нуклеиновых кислот* (под редакцией Б.Д. Хемса и С.Дж. Хиггинса, (1985); *Транскрипция и трансляция* (под редакцией Б.Д. Хемса и С.Дж. Хиггинса, (1984); *Культура животных клеток* (под редакцией Р.Я. Фрешни, 1986); *Иммобилизованные клетки и ферменты* (IRL Press, (1986); Б. Пербэл, *Практическое руководство по молекулярному клонированию* (1984); Ф.М. Осубель и др. (под редакцией), *Текущие протоколы в молекулярной биологии*, John Wiley and Sons, Inc. (1994); и другие.

В контексте настоящего документа, термин «селектируемые фенотипы» или «фенотипически селектируемые», или «фенотипически скринируемые» определяет изменения в функционировании клетки или организма или в визуальных характеристиках в отношении роста, метаболизма, чувствительности к фитотоксическому (например, к гербициду) или другому соединению или в отношении потребления питательных веществ. Термин «селектируемый фенотип» также включает видимые или невидимые внешние признаки, наблюдаемые глазом или с помощью специального оборудования. Таким образом, фенотипически селектируемый признак кодируется, по меньшей мере, одной геномной областью и приводит к фенотипу, который может быть подвергнут скринингу визуально посредством микроскопа или любых инструментов молекулярной или аналитической биологии.

Всякий раз, когда настоящее изобретение относится к проценту гомологии или идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот, эти значения определяют значения, полученные для нуклеиновых кислот с использованием программы EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments (нуклеотиды) (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html) или для аминокислотных последовательностей с использованием программы EMBOSS Water Pairwise Sequence Alignments

(белки) (www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/). В инструментах, предложенных Европейским институтом молекулярной биологии (EBI) Европейской молекулярно-биологической лаборатории (EMBL) для локального выравнивания последовательностей, используется модифицированный алгоритм Смита-Уотермана (см. www.ebi.ac.uk/Tools/psa/ и Смит, Т.Ф. и Вотерман, М.С. «Идентификация общих молекулярных подпоследовательностей» *Journal of Molecular Biology*, 1981 147 (1):195-197). При проведении выравнивания используются параметры по умолчанию, определенные EMBL-EBI. Эти параметры предназначены (i) для аминокислотных последовательностей: Матрица = BLOSUM62, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5 или (ii) для последовательностей нуклеиновых кислот: Матрица = DNAfull, штраф за открытие гэпа = 10 и штраф за продолжение гэпа = 0,5.

Термин «разрыв цепи» применительно к последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты, например, геномной последовательности в виде последовательности ДНК-мишени, включает одноцепочечный разрыв и/или двухцепочечный разрыв. Одноцепочечный разрыв (ник) относится к прерыванию в одной из двух цепей последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты. В противоположность этому, двухцепочечный разрыв относится к прерыванию в обеих цепях последовательности двухцепочечной нуклеиновой кислоты. Разрывы цепи по настоящему изобретению могут быть введены в последовательность двухцепочечной нуклеиновой кислоты путем ферментативного разреза в интересующем положении основания нуклеиновой кислоты с использованием подходящей эндонуклеазы, включая эндонуклеазу CRISPR или ее вариант, причем вариантом может выступать мутированная или усеченная версия белка дикого типа или эндонуклеазы, которая по-прежнему может осуществлять ферментативную функцию белка дикого типа.

Термины «область-мишень», «сайт-мишень», «структура-мишень», «конструкция-мишень», «нуклеиновая кислота-мишень» или «клетка/ткань/организм-мишень», или «область ДНК-мишень», в контексте настоящего документа, относятся к мишени, которая может представлять собой любую область генома или эпигенома в любом компартменте клетки-мишени.

Термин «целенаправленный» или «сайт-специфичный», или «сайт-направленный», в контексте настоящего документа, относится к действию молекулярной биологии, которое использует информацию о последовательности интересующей геномной области, подлежащей модификации, и которое в дальнейшем опирается на информацию о механизме действия молекулярных инструментов, например, нуклеаз, включая нуклеазы CRISPR и их варианты, TALEN, ZFN, мегануклеазы или рекомбиназы, ферменты, модифицирующие ДНК, включая ферменты, модифицирующие основание, такие как ферменты цитидиндезаминазы, ферменты, модифицирующие гистоны, и тому подобное, ДНК-связывающие белки, cr/tracrPНК, направляющие РНК и тому подобное, которые позволяют прогнозировать *in silico*, по меньшей мере, одну модификацию, подлежащую осуществлению в интересующей области-мишени в геноме. Поэтому соответствующие молекулярные инструменты могут быть разработаны и сконструированы *ex vivo* или *in silico*.

Термины «трансген» или «трансгенный», в контексте настоящего документа, относятся, по меньшей мере, к одной последовательности нуклеиновой кислоты, которую берут из генома одного организма или продуцируют синтетически, и которую затем вводят в интересующую клетку, организм или ткань хозяина, и которая впоследствии интегрируется в геном хозяина посредством подходов «стабильной» трансформации или трансфекции. В противоположность этому, термин «транзистентная» трансформация или трансфекция, или введение относится к способу введения молекулярных инструментов, включающих, по меньшей мере, одну нуклеиновую кислоту (ДНК, РНК, одноцепочечную или двухцепочечную, или их смесь) и/или, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, при необходимости, содержащую подходящие химические или биологические агенты, для достижения переноса в, по меньшей мере, один интересующий компартмент клетки, включая, но не ограничиваясь этим, цитоплазму, органеллу, включая ядро, митохондрию, вакуоль, хлоропласт, или в мембрану, что приводит к транскрипции и/или трансляции, и/или ассоциации, и/или активности, по меньшей мере, одной молекулы, введенной без достижения стабильной интеграции или инкорпорации и, таким образом, наследования соответствующей, по меньшей мере, одной молекулы, введенной в геном клетки.

В контексте настоящего документа, термин «транзистентное введение» относится к транзистентному введению, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, включенной в вектор доставки или в рекомбинантную конструкцию, с помощью или без помощи вектора доставки, в структуру-мишень, например, в растительную клетку, при этом, по меньшей мере, одну последовательность нуклеиновой кислоты вводят в подходящих условиях реакции, благодаря чему не происходит интеграции, по меньшей мере, одной последовательности нуклеиновой кислоты в эндогенный материал нуклеиновой кислоты структуры-мишени, в геном в целом, поэтому, по меньшей мере, одна последовательность нуклеиновой кислоты не будет интегрирована в эндогенную ДНК клетки-мишени. Как следствие, в случае транзистентного введения, введенная генетическая конструкция не будет передаваться по наследству потомству структуры-мишени, например, прокариоту, животной или растительной клетке. По меньшей мере, одна последовательность нуклеиновой кислоты или продукты, полученные в результате ее транскрипции или трансляции, присутствуют только временно, то есть, транзистентным образом, в конститутивной или индуцибельной форме, и, таким образом, могут быть активными только в клетке-мишени для оказания своего действия в течение ограниченного времени. Следовательно, по меньшей мере одна последовательность нуклеиновой кислоты, введенная посредством транзистентного введения, не будет передаваться по наследству потомству клетки. Однако эффект, который последовательность нуклеиновой кислоты ввела транзистентным образом, потенциально может передаваться по наследству потомству клетки-мишени.

Термин «вариант» любого сайт-специфичного эффектора или редактора основания, раскрытого в настоящем документе, представляет собой молекулу, содержащую, по меньшей мере, одну мутацию, делецию или вставку, по сравнению с соответствующим ферментом дикого

типа, для изменения активности фермента дикого типа природного происхождения. Термин «вариант» может, в качестве неограничивающего примера, представлять собой каталитически неактивную Cas9 (dCas9) или сайт-специфичную нуклеазу, которая была модифицирована для функционирования в качестве нуклеазы.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Настоящее изобретение предлагает способы целенаправленного редактирования в растительной клетке, ткани, органе или материале, причем, эти способы специфично комбинируют и используют стратегию параллельного введения. Таким образом, предложенные в настоящем документе способы основаны на параллельном введении фенотипически селективируемого признака в первый сайт-мишень в геноме, при этом, этот фенотипически селективируемый признак, как таковой, обеспечивает легкий скрининг и не содержит введение трансгенной маркерной последовательности или маркерной кассеты. Кроме того, введение целенаправленной модификации в первый сайт-мишень в геноме для получения селективируемого фенотипа не зависит от предложения экзогенной полинуклеотидной матрицы, а также не зависит от введения двухцепочечного (ds) разрыва в сайт-мишень, а эти этапы обычно требуются для различных подходов к редактированию генома с использованием сайт-специфичных нуклеаз (SSN), вводящих двухцепочечный разрыв в сайт-мишень в геноме, который зачастую можно исправить, предложив матрицу для репарации для гомологичной репарации (HR) в качестве материала экзогенной нуклеиновой кислоты.

Таким образом, существуют способы, имеющие особое значение для стратегий размножения растений, причем признаки, представляющие агрономический интерес, должны быть скомбинированы в интересующем растении, что обычно требует итерационных и, как правило, трудоемких этапов селекции. Кроме того, специфичные этапы способа, предложенные в настоящем документе, распараллеливают трансгенную безмаркерную селекцию и целенаправленное редактирование в различных сайтах-мишенях в геноме, что приводит к приданию селективируемого или другого фенотипа растению или растительной клетке. Это, в свою очередь, позволяет выделить такой модифицированный растительный материал без селективной маркерной кассеты, в то время как эта фенотипическая селекция может значительно снизить затраты на скрининг для второй интересующей целенаправленной модификации, которая обычно не поддается фенотипическому скринингу как таковая. Благодаря такому синергетическому взаимодействию факторов одновременного введения двух целенаправленных модификаций, причем, одна модификация гарантирует трансгенную безмаркерную селекцию, а вторая модификация обеспечивает введение высоко сайт-специфичного и прогнозируемого редактирования в интересующий сайт-мишень в геноме, способы по настоящему изобретению обеспечивают осуществление точных стратегий размножения, содержащих существенно меньшие усилия по осуществлению селекции для идентификации интересующего генотипа, что, в свою

очередь, помогает сократить время и затраты, необходимые для идентификации соответствующих модификаций в интересующей растительной клетке или идиоплазме.

В первом аспекте, предложен способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции в трансгенную селектируемую маркерную последовательность, способ содержащий: (а) введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация основания вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селектируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну клетку потомства, ткани, органа или растения потомства, содержащего, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и (с) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной клетки потомства, ткани, органа или растения потомства путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селектируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией основания в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения.

В соответствии со способами по настоящему изобретению, нет необходимости в стабильной интеграции трансгенной экзогенной последовательности, подлежащей использованию в качестве селектируемого маркера. Вместо этого, фенотипически селектируемый признак или фенотип создают в первом сайте-мишени в геноме растения. Преимущество здесь заключается в том, что предлагается селектируемое редактирование, которое не зависит от интеграции конструкции экзогенной нуклеиновой кислоты, подлежащей использованию в качестве маркера во время селекции.

В контексте настоящего документа, термин «фенотипически селектируемый признак» относится к признаку, кодируемому, по меньшей мере, одним геном, вызывающим видимый или иным образом селектируемый фенотип после экспрессии соответствующего геномного признака.

Селекция указанного признака может быть осуществлена визуально или с помощью селективного агента, соединения или триггера, подлежащего применению в растительной клетке, ткани, органе, материале или целом растении.

Первый и второй сайты-мишени в геноме растения могут представлять собой одинаковые или разные локусы генома. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, первый и второй сайты-мишени в геноме растения находятся в разных локусах генома, которые могут быть расположены в одной и той же или в разных хромосомах.

В соответствии со способами по настоящему изобретению, осуществляется стратегия параллельного введения первой и второй целенаправленной модификации, при этом, такое распараллеливание различных целенаправленных модификаций, введенных в первый и второй сайты-мишени в геноме растения, значительно улучшает последующие этапы скрининга. Вторая модификация, как правило, не будет иметь возможности для селекции, потому что фенотип, который она придает, не будет экспрессирован или релевантен в процессе генерирования растений. Таким образом, целью, лежащей в основе способов по настоящему изобретению, является использование первой модификации, вызывающей фенотипически селектируемый фенотип в качестве инструмента для обеспечения возможности селекции. По сравнению с традиционными способами, способы, раскрытые в настоящем документе, имеют преимущество, заключающееся в том, что они не включают ген трансгенного маркера. Использование фенотипа, селектируемого с помощью селективного агента, по сравнению со способом, не предусматривающим его использование, имеет преимущество, заключающееся в повышении эффективности за счет элиминации всех или большинства необработанных клеток, которые в противном случае составляли бы большинство клеток, продуцирующих растения. Посредством элиминации необработанных клеток, количество растений, которые должны быть продуцированы, значительно уменьшается, и количество растений, которые должны быть подвергнуты скринингу на молекулярном уровне для второй целенаправленной модификации, значительно уменьшается, что, в свою очередь, увеличивает эффективность раскрытых способов для размножения растений.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, способы, в соответствии с его различными аспектами, основываются на одновременном или последующем введении, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания, делеции кодона или сдвиге рамки, или модификации делеции в одной и той же, по меньшей мере, одной растительной клетке, подлежащей модификации, также получающей, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию в интересующем втором сайте-мишени в геноме растения. Таким образом, модификации в первом и втором сайтах-мишенях, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, вводятся одновременно в одну и ту же клетку, то есть, одновременно, то есть, параллельно. Таким образом, последующее введение в этом смысле относится к тому факту, что различные введенные инструменты, содержащие, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания и/или, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор, могут действовать друг за другом через небольшой промежуток времени. Однако

впоследствии, данный термин в этом контексте подразумевает это параллельное и одновременное введение интересующих инструментов в пределах одной и той же клетки. Это, в свою очередь, имеет эффект улучшения возможностей скрининга за счет того, что связывание процессов введения молекулярных инструментов, опосредующих, по меньшей мере, одну первую и вторую целенаправленную модификацию, и модификации не являются полностью независимыми друг от друга. Клетки, подлежащие модификации, имеющие одну модификацию, таким образом, с гораздо большей вероятностью также будут иметь вторую целенаправленную модификацию. По сравнению с рандомной селекцией клеток, в частности, для второй модификации, обычно не имеющей четкого фенотипа от всей популяции обработанных и необработанных клеток, способы по настоящему изобретению предлагают преимущества селекции. Селекция, таким образом, значительно улучшается, поскольку доставка соответствующих инструментов функциональным способом, который обычно представляет собой проблему во время редактирования генома, является синхронизированной и выполняется одновременно. Таким образом, благодаря возможности селекции первой модификации целенаправленным способом, для, по меньшей мере, одной целенаправленной модификации второго сайта-мишени в геноме растения, требуется проведение скрининга лишь в ограниченном количестве, поскольку клетки, которые не получили никакого инструмента или комплекса по настоящему изобретению функциональным способом, не получают модификации, приводящей к фенотипически селективируемому признаку в первом сайте-мишени в геноме растения. Поскольку вероятность того, что указанные растительные клетки получили второй сайт-специфичный эффекторный комплекс по настоящему изобретению, добавляемый к клеткам параллельно, невелика, то для второй целенаправленной модификации не потребуется проводить трудоемкий скрининг, если скрининг для первой целенаправленной модификации имеет отрицательный результат.

Таким образом, способы по настоящему изобретению позволяют клеткам осуществлять селекцию клеток, которые получили или не получили, по меньшей мере, одну первую модификацию путем селекции фенотипически селективируемого признака, на который нацелена первая целенаправленная модификация посредством подходящих реагентов или посредством визуального скрининга. Таким образом, этот скрининг элиминирует клетки, не содержащие, по меньшей мере, одну первую модификацию, или скрининг обеспечивает визуальный контроль и разделение клеток на модифицированные клетки, получившие или не получившие первую целенаправленную модификацию. Можно ожидать, что среди клеток, успешно получивших первую целенаправленную модификацию, надлежащее количество клеток также будет иметь, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, а также, это осуществимо благодаря параллельному введению и подходу к доставке по настоящему изобретению. Термин «надлежащий» в данном контексте означает любое улучшение, то есть, уменьшение количества клеток, подлежащих скринингу на предмет наличия, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации путем селекции, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной

модификацией основания. Фактическую частоту присутствия, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации обычно трудно спрогнозировать, поскольку она будет изменяться в зависимости от нескольких факторов. Это делает скрининг в отношении любой модификации, введенной посредством геномной инженерии, трудоемким при осуществлении скрининга с использованием общих молекулярных методов, например, основанных на PCR: В соответствии со способами по настоящему изобретению, частота присутствия клеток, получивших как первую, так и вторую целенаправленную модификацию, может находиться в диапазоне от 2:1 до 1000:1 в растительных клетках или растениях, имеющих первую модификацию, по сравнению с растительными клетками или растениями, имеющими первую и вторую модификации. Таким образом, имеется внутреннее преимущество на любом этапе скрининга или селекции, поскольку общее количество клеток, подлежащих скринингу для второй модификации, будет уменьшено. В частности, те клетки, в которые доставка инструментов для введения первой и второй целенаправленной модификации не осуществилась, скорее всего, не получили никакого молекулярного инструмента(ов) и, таким образом, ни первая, ни вторая целенаправленная модификация не могут присутствовать. Таким образом, первый фенотипически селективируемый признак не будет очевидным, то есть, не будет селективируемым. Находясь под селективным давлением или после визуальной селекции, соответствующим растительным клеткам, тканям, органам или целым растениям, являющимся «отрицательными» для фенотипически селективируемого признака, не придется подвергаться последующему скринингу для второй целенаправленной модификации, поскольку вероятность того, что вторая модификация была введена, когда первая модификация отсутствует, является низкой из-за параллельного введения соответствующих инструментов.

При желании, первая модификация может быть удалена путем скрещивания производного растения и его генетической сегрегации из второй модификации.

Таким образом, раскрытые в настоящем документе способы могут быть использованы для обогащения репарации растений целенаправленной модификацией в интересующем втором гене путем элиминации или удаления клеток, которые не получили реагентов редактирования или не подверглись целенаправленной модификации, как подтверждено скринингом в отношении, по меньшей мере, одной интересующей первой целенаправленной модификации.

Целенаправленная модификация основания, в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, относится к редактированию генома, которое позволяет осуществить непосредственное, необратимое преобразование одного основания ДНК-мишени в другое программируемым образом, при котором не требуется расщепление остова dsДНК или донорской матрицы (см. Комор и др., Nature, Том 533, 2016).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, способ, в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, дополнительно содержит на этапе (b) введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, втором сайте-мишени в геноме растения.

Матрица для репарации (RT) представляет собой одноцепочечную или двухцепочечную последовательность нуклеиновой кислоты, которая может быть предложена во время редактирования любого генома, вызывающего двухцепочечный или одноцепочечный разрыв ДНК, для содействия целенаправленной репарации указанного разрыва ДНК, посредством предложения RT в качестве матрицы известной последовательности, содействующей гомологически направленной репарации. Размер, по меньшей мере, одной репарационной матричной последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в виде части может варьироваться. Он может находиться в диапазоне от, примерно, 20 пар оснований до, примерно, 5000 пар оснований или даже до 8000 пар оснований, в зависимости от последовательности ДНК-мишени, подлежащей модификации сайт-направленным способом. RT может быть предложена в виде отдельного физического объекта или в виде части комплекса по настоящему изобретению. Использование RT может быть благоприятным для определенных применений, что позволяет избежать нежелательных вставок или делеций из-за клеточного механизма репарации NHEJ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, способ, предложенный в настоящем документе, содержит дальнейший этап (d) скрещивания, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала для достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

Другое интересующее растение или растительный материал может представлять собой любой растительный материал, содержащий интересующий геномный материал, при этом, этот материал, содержащий, например, элитное событие или любой интересующий признак, предназначен, например, для последующих раундов размножения для создания генотипа и, таким образом, интересующего растения. Интересующий генотип, таким образом, является результатом предшествующих этапов размножения, комбинирующих признаки от различных интересующих растений.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии со всеми его аспектам, интересующий конечный генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию, то есть, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак. Как показано на **Фигуре 1**, способы по настоящему изобретению особенно подходят для удаления первой целенаправленной модификации, вызывающей фенотипически селективируемый признак путем скрещивания производного растения и путем его генетической сегрегации из второй целенаправленной модификации (см. **Фигуру 1 С**), при желании, для определенных применений. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, первая целенаправленная модификация, кодирующая интересующий фенотипически селективируемый признак, может быть сохранена в интересующем генотипе в том случае, если фенотипически

селектируемый признак, как таковой, важен для интересующего получаемого генотипа и соответствующего растения или растительного материала.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его первым аспектом, при этом, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним комплексом редактирования основания, при этом, комплекс редактирования основания опосредует, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию основания этапа (а). Таким образом, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор может быть нековалентно (временно) или ковалентно (постоянно) присоединен к, по меньшей мере, одному комплексу редактирования основания. Любой компонент, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания может быть временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним сайт-специфичным эффектором. Таким образом, термины «временно» и «постоянно» должны толковаться широко и содержат как ковалентные, так и нековалентные связи или присоединения для достижения физической близости, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффектора и, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания. Сцепление, по меньшей мере, одного компонента, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания и, по меньшей мере, одного сайта-специфичного эффектора, или также любого другого компонента, например, gРНК или RT, ассоциированного, по меньшей мере, с одним сайтом-специфичным эффектором, может представлять интерес в том случае, если, по меньшей мере, один первый и, по меньшей мере, один второй сайт-мишень в геноме находятся в непосредственной близости в интересующем геноме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза, содержащая нуклеазу CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные нуклеазы, или редактор основания, или любой вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

Таким образом, в контексте настоящего документа, «сайт-специфичный эффектор» может быть определен как любая нуклеаза, никаза, рекомбиназа или редактор основания, обладающий способностью вводить одноцепочечное или двухцепочечное расщепление в сайт-мишень в геноме или обладающий способностью вводить целенаправленную модификацию, включая точечную мутацию, вставку или делецию, в интересующий сайт-мишень в геноме. По меньшей мере, один «сайт-специфичный эффектор» может действовать самостоятельно или в комбинации с другими молекулами в качестве части молекулярного комплекса. «Сайт-специфичный эффектор» может присутствовать в виде молекулы слияния или в виде отдельных молекул, ассоциирующихся посредством или ассоциированных посредством, по меньшей мере, одного ковалентного или нековалентного взаимодействия, в результате чего компоненты сайта-специфичного эффекторного комплекса приводятся в непосредственную физическую близость.

Термин «редактор основания», в контексте настоящего документа, относится к белку или его фрагменту, обладающему той же каталитической активностью, что и белок, из которого он получен, причем, белок или его фрагмент, сам по себе, или когда он предложен в виде молекулярного комплекса, называемый в настоящем документе комплексом редактирования основания, обладает способностью опосредовать целенаправленную модификацию основания, то есть, преобразование интересующего основания, приводящее к интересующей точечной мутации, которая, в свою очередь, может привести к целенаправленной мутации, если преобразование основания не вызывает молчащей мутации, но скорее преобразование аминокислоты, кодируемой кодоном, содержащим положение, подлежащее преобразованию с помощью редактора основания. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один редактор основания по настоящему изобретению временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним сайт-специфичным эффектором или, при необходимости, с компонентом, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффекторного комплекса. Сцепление может быть ковалентным и/или нековалентным.

Любой редактор основания или сайт-специфичный эффектор, или его каталитически активный фрагмент, или любой компонент комплекса редактора основания, или сайт-специфичного эффекторного комплекса, как раскрыто в настоящем документе, может быть введен в клетку в виде фрагмента нуклеиновой кислоты, фрагмента нуклеиновой кислоты, представляющего или кодирующего ДНК, РНК или эффектор белка, или он может быть введен в виде ДНК, РНК и/или белка, или любой их комбинации.

Ключевым набором инструментов, элиминирующим необходимость осуществления селективируемых модификаций с эндонуклеазой, DSB и матрицей для репарации, является использование редакторов основания или доменов с целенаправленным мутагенезом. В многочисленных публикациях показано целенаправленное преобразование основания, в первую очередь цитидина (C) в тимин (T), с использованием системы CRISPR/Cas9 или нефункциональной нуклеазы, сцепленной с доменом цитидиндезаминазы, Аполипопротеин В mРНК-редактирующим каталитическим полипептидом (APOBEC1), например, с APOBEC, полученным из крысы. Дезаминирование цитозина (C) катализируется цитидиндезаминазами и приводит к образованию урацила (U), который обладает свойствами спаривания оснований тимина (T). Большинство известных цитидиндезаминаз оказывают влияние на РНК, и известно несколько примеров, где принимается ДНК, в которых требуется одноцепочечная (ss) ДНК. Исследования комплекса dCas9-ДНК-мишень показывают, что, по меньшей мере, девять нуклеотидов (nt) смещенной цепи ДНК не спариваются при образовании комплекса Cas9-направляющая РНК-ДНК 'R-петля' (Джор и др., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 529-536 (2011)). Действительно, в структуре комплекса Cas9 R-петля первые 11 nt (нуклеотидов) протоспейсера на смещенной цепи ДНК неупорядочены, что говорит о том, что их движение не сильно ограничено. Также было высказано предположение о том, что мутации, индуцированные системой Cas9, в цитозинах в нематричной цепи могут возникать из-за их доступности для клеточных ферментов цитозиндезаминазы. По нашему

мнению, подмножество этого удлинения ssДНК в R-петле могло бы служить эффективным субстратом для dCas9-привязанной цитидиндезаминазы для осуществления непосредственного программируемого преобразования С в U в ДНК (см. выше, Комор и др.).

Любой комплекс редактирования основания, в соответствии с настоящим изобретением, может, таким образом, содержать, по меньшей мере, одну цитидиндезаминазу или ее каталитически активный фрагмент. По меньшей мере, один комплекс редактирования основания может содержать цитидиндезаминазу или ее домен в виде каталитически активного фрагмента в качестве редактора основания.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания представляет собой преобразование любого нуклеотида С, А, Т или G в любой другой нуклеотид. Любой из нуклеотидов С, А, Т или G может быть обменен сайт-направленным способом, опосредованным редактором основания или его каталитически активным фрагментом, на другой нуклеотид. Таким образом, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания может содержать любой редактор основания или домен редактора основания, или его каталитически активный фрагмент, который может преобразовывать интересующий нуклеотид в любой другой интересующий нуклеотид целенаправленным способом.

Настоящее изобретение предлагает способы, комбинирующие знание инструментов редактора основания как таковых, и использует эту технологию в комбинированном способе для достижения интересующего фенотипически селективируемого фенотипа, что позволяет избежать необходимости в трансгенном маркере, поскольку редактор основания может искусственно создавать эндогенный маркер, имеющий фенотипический выходной продукт, являющийся селективируемым. С этой целью редактор основания комбинируют с модифицированным сайт-специфичным эффектором, который сохраняет способность распознавать и связывать область-мишень в геноме, при необходимости, направляемую gРНК для нуклеаз на основе CRISPR, чтобы опосредовать преобразование С в U или G в А для введения сайт-направленного мутагенеза. В свою очередь, могут быть осуществлены целенаправленные мутации, которые приводят к интересующему фенотипу. Это открывает путь для целенаправленных стратегий размножения, тем более, что способы, раскрытые в настоящем документе, дополнительно комбинируют использование, по меньшей мере, одного редактора основания или комплекса редактирования основания для введения целенаправленной модификации основания в первый сайт-мишень в геноме, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, со второй модификацией, опосредованной, по меньшей мере, одним сайт-специфичным эффектором параллельным образом. Этот подход обеспечивает осуществление безмаркерной селекции и скрининга для модификации или интересующего генотипа синергическим способом, без необходимости введения DSB или RT для, по меньшей мере, одной первой модификации в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, то есть, для целенаправленной модификации основания, целенаправленной делеции кодона или целенаправленного сдвига рамки, или модификации делеции.

Добавление домена урацил-ДНК-гликозилазы (UGI) дополнительно увеличило эффективность редактирования основания. Сигнал ядерной локализации (NLS) или любой другой сигнал нацеливания на органеллу может дополнительно потребоваться для обеспечения надлежащего нацеливания комплекса.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии со всеми его аспектами, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, направляющий, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR, или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей (a) Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9, (b) Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1, (c) CasX или (d) CasY, или любой вариант, или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в нуклеазу специфичной одноцепочечной ДНК или в ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

«Нуклеаза на основе CRISPR», в контексте настоящего документа, представляет собой любую нуклеазу, которая была идентифицирована в системе CRISPR природного происхождения, которая впоследствии была выделена из ее естественного контекста, и которая, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, была модифицирована или скомбинирована в виде интересующей рекомбинантной конструкции с тем, чтобы она подходила в качестве инструмента для целенаправленной геномной инженерии. Любая нуклеаза на основе CRISPR может быть использована и, при необходимости, перепрограммирована или подвергнута дополнительной мутации с тем, чтобы она подходила для различных вариантов осуществления настоящего изобретения, в том случае, если предлагается исходная нуклеаза на основе CRISPR дикого типа для распознавания ДНК, то есть, связывающие свойства. Упомянутое распознавание ДНК может быть зависимым от PAM. Нуклеазы CRISPR, имеющие оптимизированные и сконструированные паттерны распознавания PAM, могут быть использованы и созданы для специфичного применения. Расширение кода распознавания PAM может быть подходящим для нацеливания сайт-специфичных эффекторных комплексов на интересующий сайт-мишень, независимо от специфичности исходного PAM нуклеазы на основе CRISPR дикого типа. Варианты Cpf1 могут содержать, по меньшей мере, одну из мутаций: S542R, K548V, N552R или K607R, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мутацию S542R/K607R или S542R/K548V/N552R в AsCpf1 из *Acidaminococcus* (см. SEQ ID NO:24). Кроме того, модифицированный вариант Cas вариант, например, варианты Cas9, может быть использован в соответствии со способами по настоящему изобретению в качестве части комплекса редактирования основания, например, BE3, VQR-BE3, EQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaKKH-BE3

(см. Ким и др., Nat. Biotech., 2017, doi (идентификатор цифрового объекта):10.1038/nbt.3803). Поэтому, в соответствии с настоящим изобретением, предусмотрены искусственно модифицированные нуклеазы CRISPR, которые в действительности могут не представлять собой какие-либо «нуклеазы» в смысле ферментов, расщепляющих двухцепочечные цепи, но которые представляют собой никазы или варианты мертвых нуклеаз, которые все еще обладают изначально присущей способностью распознавания ДНК и, таким образом, связывающей способностью. Примерные конструкции на основе Cas или Cpf1, подходящие для целей настоящего изобретения, раскрыты в SEQ ID NO: 17-19. Последовательность дикого типа AsCpf1 раскрыта в SEQ ID NO: 24. Другие подходящие эффекторы на основе Cpf1 для использования в способах по настоящему изобретению получены из *Lachnospiraceae bacterium* (LbCpf1, например, Стандартная/эталонная последовательность NCBI: WP_051666128.1) или из *Francisella tularensis* (FnCpf1, например, UniProtKB/Swiss-Prot: A0Q7Q2.1). Известны варианты Cpf1 (см. Гао и др., BioRxiv, dx.doi.org/10.1101/091611). Варианты AsCpf1 с мутациями S542R/K607R и S542R/K548V/N552R, которые могут расщеплять сайты-мишени посредством TYCV/CCCC и TATV PAM, соответственно, с повышенной активностью *in vitro* и *in vivo*, таким образом, рассматриваются как сайт-специфичные эффекторы в соответствии с настоящим изобретением. Общегеномная оценка нецелевой активности показала, что эти варианты сохраняют высокий уровень специфичности нацеливания на ДНК, который может быть дополнительно улучшен путем введения мутаций в домены, не взаимодействующие с PAM. Вместе, эти варианты расширяют диапазон нацеливания AsCpf1 на один сайт расщепления для каждой ~8,7 пары оснований в неповторяющихся областях генома человека, предлагая полезное дополнение к инструментарию CRISPR/Cas в геномной инженерии (см. выше, Гао и др.).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его первым аспектом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания осуществляется, по меньшей мере, посредством одного комплекса редактирования основания, содержащего, по меньшей мере, один редактор основания в качестве компонента. Комплекс редактирования основания по настоящему изобретению содержит редактор основания, а также другие необязательные компоненты.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания содержит компонент APOBEC1, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, компонент APOBEC1 крысы. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания может содержать любой фермент цитидин/цитозиндезаминазы в качестве редактора основания, например, человеческий AID, например, UniProtKB/Swiss-Prot: Q9GZX7.1, человеческий APOBEC3G, например, GenBank: CAK54752.1, или CDA1 миноги, например, GenBank: ABO15150. 1, но любой фермент или его каталитически активный фрагмент предусмотрен в рамках объема настоящего изобретения. Примерный компонент APOBEC, подходящий для использования в способах по настоящему изобретению, представлен посредством SEQ ID NO:20. Кроме того, модифицированный редактор

основания может быть использован в соответствии со способами по настоящему изобретению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, редактор основания имеет узкую ширину редактирования, меньше 6 nt, меньше 5 nt, меньше 4 nt, меньше 3 nt или даже 2 nt, или 1 nt. Чем уже окно редактирования, тем более точное редактирование может быть введено в интересующий сайт-мишень в геноме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания содержит компонент UGI (ингибитор урацил-ДНК-гликозилазы). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, можно использовать UGI, полученный из *Bacillus subtilis*, или любой другой домен, ингибирующий активность UDG, для подавления активности эндогенной эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), действующей в определенных клетках. Примерный компонент UGI, подходящий для использования в способах по настоящему изобретению, представлен посредством SEQ ID NO:21.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания содержит компонент XTEN, то есть, специфический линкер, для того, чтобы предложить оптимальную активность дезаминирования, по меньшей мере, одного редактора основания, сцепленного, по меньшей мере, с одним сайт-специфичным эффектором. Можно использовать и другие линкеры, имеющие длину, по меньшей мере, 2 нуклеотида (nt) между редактором основания и сайт-специфичным эффектором, которые не влияют на активность связывания, придаваемую сайт-специфичным эффектором, и/или активность редактирования основания редактора основания. Подходящая последовательность линкера XTEN предложена посредством SEQ ID NO:1 (положение 688-735), SEQ ID NO:2 (положение 706-753), SEQ ID NO:14 (положение 706-753) или SEQ ID NO:15 (положение 706-753). Существует множество других линкеров, известных специалисту в данной области техники, а также литература по конструированию линкеров. Таким образом, как жесткие, так и гибкие линкеры могут быть использованы в соответствии с различными способами по настоящему изобретению.

Примерные конструкции слияния по настоящему изобретению предложены посредством SEQ ID NO:1, 2, 14, 15 или 16.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, и, при этом, по меньшей мере, два компонента физически сцеплены. Физическое сцепление может содержать ковалентное сцепление, например, путем слияния фрагментов ДНК друг с другом для создания белка слияния после экспрессии или путем поперечного сшивания химическим способом различных компонентов комплекса по настоящему изобретению друг с другом. Физическое сцепление может дополнительно содержать нековалентное взаимодействие. Таким образом, нековалентные взаимодействия или присоединения содержат электростатические взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы силы, ТТ-эффекты и гидрофобные эффекты. Особое значение в контексте молекул нуклеиновой кислоты имеют водородные связи в виде электростатического взаимодействия. Водородная связь (Н-связь) представляет собой особый тип диполь-дипольного взаимодействия,

которое включает взаимодействие между частично положительным атомом водорода и высоко электроотрицательным, частично отрицательным атомом кислорода, азота, серы или фтора, нековалентно связанным с указанным атомом водорода.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, комплекс редактирования основания содержит компонент PmCDA1 (индуцированная активацией цитидиндезаминаза (AID) в ортологе PmCDA1 из морской миноги, см. Нисида и др. (Science, 2016, том 353, выпуск 6305, aaf8729)) в качестве редактора основания. Примерный PmCDA1 для использования в соответствии со способами по настоящему изобретению предложен посредством SEQ ID NO:22.

Нуклеазы на основе CRISPR действуют посредством распознавания мотива, примыкающего к протоспейсеру (PAM), присутствующего в интересующей подлежащей модификации области-мишени в геноме. Для дальнейшего увеличения объема и точности редактирования основания с использованием модифицированных нуклеаз на основе CRISPR, введение PAM с различной специфичностью для расширения количества сайтов, на которые можно нацеливаться, представляет, таким образом, большой интерес (Ким и др., Nat. Biotech., 2017, doi:10.1038/nbt.3808). Как известно специалисту в данной области техники, нуклеазы CRISPR дикого типа имеют внутреннюю специфичность PAM, варьирующуюся от нуклеазы к нуклеазе. В соответствии с настоящим изобретением, предусмотрены нуклеазы на основе CRISPR, которые имеют измененную специфичность PAM и, следовательно, модифицированный диапазон нацеливания, например, мутанты SpCas9, которые принимают NGA (VQR-Cas9), NGAG (EQR-Cas9) или NGCG (VRER-Cas9) последовательности PAM, а также сконструированный вариант SaCas9, содержащий три мутации (SaKKH-Cas9), которые ослабляют PAM-требование варианта к NNNRRT (Клейнстивер и др., Nat. Biotechnol. 33, 1293-1298 (2015)). Примерные последовательности PAM по настоящему изобретению, подходящие для различных нуклеаз на основе CRISPR, представлены посредством SEQ ID NO: 3-13 и 23.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, при этом, по меньшей мере, два компонента предложены в виде отдельных компонентов. Этот подход может подходить для определенных стратегий трансформации или трансфекции.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его способами, по меньшей мере, один компонент любого комплекса по настоящему изобретению может содержать часть или участок, который может специфически взаимодействовать или ассоциироваться с когнатным связывающим партнером в пределах интересующей клетки таким образом, что комплекс будет образовываться в пределах клетки, или комплекс может быть образован *ex vivo* до трансформации или трансфекции. Связывающиеся пары могут ассоциироваться посредством стыковочного домена или домена ассоциации, или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность, которая выбрана из, по меньшей мере, одного из следующих: биотин, аптамер, ДНК, РНК или белковый краситель, содержащий флуорофоры, содержащие флуоресцеин или его вариант, малеимиды или Tetraholium

(ХТТ), направляющая последовательность нуклеиновой кислоты, специфично сконструированная для взаимодействия с, по меньшей мере, одной репарационной матричной последовательностью нуклеиновой кислоты, стрептавидин или его вариант, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, мономерный стрептавидин, авидин или его вариант, аффинная метка, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, стрептовидиновая метка, антитело, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), антиген, специфичный для данного антитела или scFv, однодоменное антитело (наночастица), антикалин, белок VirD2 *Agrobacterium* или его домен, пикорнавирус VPg, топоизомераза или ее домен, белок А бактериофага ΦX174, белок А* ΦX, белок VirE2 или его домен, или дигоксигенин. Другие подходящие связывающиеся пары известны специалисту в данной области техники. В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, когнатные связывающиеся партнеры имеют высокую константу аффинности или аффинность связывания и, таким образом, низкую константу диссоциации (K_d) в отношении друг друга в физиологических условиях, то есть, имеют значение K_d в диапазоне низких значений μM или, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, в диапазоне значений nM , и, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, ниже этих значений, чтобы способствовать образованию комплекса, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания или, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффекторного комплекса в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии со всеми аспектами способов по настоящему изобретению, по меньшей мере, один компонент, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания и/или, по меньшей мере, один компонент, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффекторного комплекса содержит, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид хлоропласта. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид митохондрии. По меньшей мере, один сигнал локализации может присутствовать, будучи ассоциированным с, по меньшей мере, одним компонентом редактирования основания или с сайт-специфичным эффекторным комплексом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак

преимущества роста, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста в отношении соединения или триггера, подлежащего добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.

Термин «преимущество роста», в контексте настоящего документа, относится к любому физиологически или метаболически благоприятному свойству на всех этапах развития и репродукции растения, например, содействие устойчивости к биотическому и абиотическому стрессу, или влияние на рост и развитие растения, например, в условиях стресса, таких как засуха, засоление и тому подобное.

Термин «соединение» или «триггер», в соответствии с настоящим изобретением, может означать гербицид, например, выбранный из ингибиторов клеточного метаболизма, например: ингибирование EPSPS (глицины, например, глифосат); ингибирование ALS/AHAS (продуцирование разветвленных аминокислот) (например, имидазолины, сульфонилмочевина); ингибирование синтеза липидов/ACCases (арилоксифеноксипропионат (FOP), циклогександион (DIM), фенилпиразолин (DEN); ингибиторы глутаминсинтетазы (глюфосинат/фосфинотрицин), ингибиторы роста/деления клеток, например, деструкторы роста растительных клеток (феноксикарбоновые кислоты, например, 2,4-D), синтетические ауксины (бензойная кислота, например, дикамба), ингибирование транспорта ауксинов (фталаматы); и интерференция со световыми процессами, например: отбеливатели/ингибиторы HPPD (пиразолы и изоксазол), ингибиторы фотосистемы II (ингибиторы PS II) (триазины, триазины, пиридазоны, C3: иоксинил и бромоксинил, и многие другие); ингибиторы протопорфириногенаоксидазы (PPO/PPX) (например, дифенилэферы и N-фенилфталимиды).

Кроме того, термин «соединение» или «триггер», в соответствии с настоящим изобретением, может означать фактор роста растения или любое другое вещество, эндогенно продуцируемое растением или экзогенно применяемое, которое влияет на метаболизм растения.

Для всех вариантов осуществления способов, раскрытых в настоящем документе, соединение или триггер можно применять экзогенно для обеспечения возможности селекции интересующего признака, фенотипически селективируемого признака, кодируемого, по меньшей мере, одной растительной клеткой, тканью, органом, материалом или целым растением, модифицированным целенаправленным способом, в соответствии с различными способами всех аспектов настоящего изобретения. Таким образом, предложение специфической взаимодействующей пары в виде модификации фенотипически селективируемого признака и предложение соответствующего соединения или триггера во время последующих этапов селекции и скрещивания может облегчить любые усилия по размножению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или,

по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербицидам, при этом, устойчивость/толерантность к гербицидам выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат, устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам PPO и устойчивости/толерантности к синтетическим ауксином, включая дикамбу (2,4-D, например, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодируют, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к биотическому стрессу, включая устойчивость/толерантность к патогену, при этом, патоген выбран из вирусного, бактериального, грибкового или животного патогена, устойчивости/толерантности к абиотическому стрессу,

включая устойчивость/толерантность к охлаждению, устойчивости/толерантности к засухе, устойчивости/толерантности к осмотическому стрессу, устойчивости/толерантности к тепловому стрессу, устойчивости/толерантности к стрессу из-за холода, устойчивости/толерантности к оксидативному стрессу, устойчивости/толерантности к стрессу под действием тяжелых металлов, устойчивости/толерантности к солевому стрессу или к переувлажнению, устойчивости/толерантности к полеганию, устойчивости/толерантности к осыпанию, или, при этом, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак выбран из группы, состоящей из модификации интересующего дополнительного агрономического признака, включая повышение урожайности, модификации времени цветения, модификации цвета семян, модификации композиции эндосперма, модификации содержания питательных веществ или метаболической инженерии интересующего пути.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, признак устойчивости/толерантности к гербицидам, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придаст устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

Любой дополнительный фенотипически селективируемый признак, кодируемый геном интересующей растительной клетки, может стать мишенью, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации, в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения, при условии, что известен, по меньшей мере, один ген, кодирующий интересующий фенотипически селективируемый признак, и при условии, что соответствующее и комплементарное соединение или триггер доступны или могут быть сконструированы для осуществления скрининга целенаправленной модификации. Для видимых фенотипов не требуется никакого соединения или триггера для целей скрининга, вместо этого, должна быть доступна подходящая стратегия считывания и определения, основанная на наблюдении визуально скринируемых признаков.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой ген, придающий устойчивость или толерантность к гербициду или к фитотоксическому соединению, при этом, первый сайт-мишень в геноме растения содержит, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты, приводящее к, по меньшей мере, одному преобразованию соответствующей аминокислоты, при этом, по

меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты осуществляется, по меньшей мере, одним редактором основания.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой ALS. Любая последовательность ALS подходит для целей настоящего изобретения. Примерная последовательность ALS представлена посредством SEQ ID NO:25.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO. Любая последовательность PPO подходит для целей настоящего изобретения. Примерная последовательность PPO представлена посредством SEQ ID NO:26.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS. Любая последовательность EPSPS подходит для целей настоящего изобретения. Примерная последовательность EPSPS представлена посредством SEQ ID NO:27.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS, ALS или PPO, или любой аллельный или растительный его вариант, и, при этом, EPSPS, ALS или PPO содержит, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты, приводящее к, по меньшей мере, одному преобразованию соответствующей аминокислоты, при этом, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты осуществляется, по меньшей мере, одним редактором основания.

Одной из таких мишеней, кодирующих фенотипически селективируемый признак по настоящему изобретению, является ген 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазы (EPSPS). Было показано, что несколько замещений одноцепочечной и двухцепочечной аминокислоты снижают чувствительность фермента к глифосату (Сэммонс, Р.Д. и Гейнс, Т.А. (2014), Устойчивость к глифосату: современные сведения. *Pest. Manag. Sci.*, 70: 1367–1377).

Другой мишенью является ген ацетолактатсинтазы (ALS), для которого множество мутаций одноцепочечной аминокислоты были связаны с толерантностью к, по меньшей мере, одному гербициду из классов триазолопиримидинов, сульфонилмочевин, пиримидинилтиобензонатов, имидазолинонов и сульфониламинокарбонилтриазолинона. Подходящие замещения остатков для целей настоящего изобретения включают A122, P197, A205, D376, W574 и S653).

Еще одна селективируемая модификация могла бы осуществляться в гене протопорфириногеноксидазы (PPO) *Zea mays* и *Arabidopsis thaliana*. В настоящем документе модификация цистеина в положении 215 в фенилаланине (A215F), лейцине (A215L) или лизине

(A215K), а также аланина в положении 220 в валине (A220V), треонине (A220T) или лейцине (A220L), а также глицина в положении 221 в серине (A221S) или лейцине (A221L) относится к устойчивости к гербицидам РРО, таким как дифенилэфиры, N-фенилфталимиды, оксадиазолы, оксазолидиндионы, фенилпиразолы, пиримидиндионы, тиадиазолы, триазиноны, а также и к другим гербицидам РРО (Ли, Сянган и др. «Разработка протопорфириногенаоксидазы как эффективного селективного маркера для *Agrobacterium Tumefaciens*-опосредованной трансформации кукурузы.» Plant Physiology 133.2 (2003): 736–747). PMC. Web. 15 марта 2017 г.). В дополнение к вышеупомянутым замещениям остатков, делеция одноцепочечной аминокислоты глицина в положении 178 в *N. tabacum* или в его гомологе препятствует связыванию ингибитора РРО и предлагает устойчивость к вышеупомянутым ингибиторам (Петцольдт, В.Л. и др. (2006). «Делеция кодона придаст устойчивость к гербицидам, ингибирующим протопорфириногенаоксидазу» PNAS 103 (33): 12329-12334), и может быть использована в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения.

Кроме того, технология, представленная в настоящей заявке, обеспечивает осуществление точной модификации и делеции аминокислоты, а также введение стоп-кодонов для изменения или прерывания последовательности гена, которая приводит к селектируемому фенотипу. Из 61 кодона, которые кодируют аминокислоты, пять аминокислот могут быть преобразованы в стоп-кодон посредством, по меньшей мере, одного преобразования цитозина/цитидина в тимин/тимидин на любой цепи.

Инструментом для осуществления этих модификаций является сама нуклеаза CRISPR. Нуклеазы CRISPR, которые, как было показано, предлагают делеции одной или нескольких пар оснований, включают Cas9, Cpf 1, CasX и CasY. Хотя на данный момент это наиболее удобные варианты, будущая разработка сайт-направленных нуклеаз будет легко адаптироваться к процедурам, описанным в настоящем документе.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой ALS, и целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A122, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей P197, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A205, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей D376, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей R377, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей W574, по сравнению со стандартной/эталонной

последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей S653, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G654, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25, или в любой комбинации вышеупомянутых мутаций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO, и целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей C215, A220, G221, N425 или Y426, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26, или в любой комбинации вышеупомянутых мутаций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой продукт гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus* для цели селекции. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первая целенаправленная модификация, содержащая целенаправленную модификацию основания, целенаправленную делецию кодона или целенаправленный сдвиг рамки, или модификацию делеции, происходит в положении, сопоставимом с остатком G210 продукта гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus*, в соответствии с SEQ ID NO:28.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS, и, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация происходит в любой одной из целенаправленных модификаций, происходит в последовательности, кодирующей G101, T102, P106, G144 или A192, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27, или в любой комбинации вышеупомянутых мутаций. В определенных предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, целенаправленные изменения происходят в последовательности, кодирующей G101, и в G144, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27, или целенаправленные изменения происходят в последовательности, кодирующей G101, и в A192, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27, или целенаправленные изменения происходят в последовательности, кодирующей T102, и в P106, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27.

Человек, обладающий обычной квалификацией в данной области техники, основываясь на изобретении, предложенном в настоящем документе, также может определить другие подходящие признаки фитотоксической устойчивости/толерантности и соответствующие мутации для

создания, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака в соответствии с настоящим изобретением.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения. Термин «видимый» фенотип означает любой фенотип, который может быть определен посредством наблюдения глазами, либо макроскопически, либо микроскопически, в результате чего проведение скрининга посредством молекулярной биологии не потребуется.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой глянцевый фенотип, золотой фенотип, фенотип пигментации или фенотип преимущества роста. Некоторые другие видимые фенотипы известны специалисту в данной области техники. Указанные видимые фенотипы будут варьироваться в зависимости от интересующего растения или растительной клетки на основании ее генетического фона.

Во втором аспекте, в соответствии с настоящим изобретением, предложен способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции с трансгенной селективируемой маркерной последовательностью, способ содержащий: (а) введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации делеции кодона в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфического эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация делеции кодона вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфического эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну, принадлежащую потомству клетку, ткань, орган или растение потомства, содержащее, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и (с) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа

или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной, принадлежащей потомству клетки, ткани, органа или растения потомства путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией делеции кодона в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, (d) при необходимости: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала с целью достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

В другом аспекте, в соответствии с настоящим изобретением, предложен способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции с трансгенной селективируемой маркерной последовательностью, способ содержащий: (a) введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации сдвига рамки или делеции в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфического эффектора, при этом, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация сдвига рамки или делеции вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака; (b) введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфического эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию вводят одновременно или последовательно для введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну принадлежащую потомству клетку, ткань, орган или целое растение потомства, содержащее, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и (c) выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной, принадлежащей потомству клетки, ткани, органа или растения потомства путем селекции (i), по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере,

одной первой целенаправленной модификацией сдвига рамки или делеции в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, путем дальнейшей селекции (ii), по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, (d) при необходимости: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученных растений потомства или растительного материала с целью достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

Как было подробно описано выше, способы, в соответствии с настоящим изобретением, предлагают новый способ комбинирования двух различных молекулярных комплексов, причем один комплекс выполнен с возможностью введения, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации, приводящей к селектируемому фенотипу без вставления трансгенного маркера, а другой комплекс выполнен с возможностью введения, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации, при этом, первая модификация служит для целей скрининга, в то время как вторая модификация представляет собой геномное редактирование, подлежащее введению. Таким образом, способы по настоящему изобретению синергически комбинируют стратегии редактирования генома в различных сайтах-мишенях в геноме для достижения различных целенаправленных модификаций, в конечном счете приводящих к эффективному процессу размножения для получения растения, имеющего интересующий генотип.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, этап (b) способов по настоящему изобретению дополнительно содержит введение матрицы для репарации (RT) для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, одном первом и/или втором сайте-мишени в геноме растения. Эта RT добавляет еще один уровень точности подходу к редактированию генома, поскольку предложена подходящая RT, предложенная отдельно или как часть, по меньшей мере, одного комплекса в соответствии с настоящим изобретением, поскольку разрыв, возникающий из-за нуклеазы или никазы, может быть репарирован предварительно заданным образом путем предложения интересующей RT для того, чтобы содействовать гомологически направленной репарации вместо того, чтобы полагаться на подверженный ошибкам эндогенный путь NHEJ, применяемый в качестве механизма репарации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, нуклеаза на основе CRISPR используется в качестве сайт-специфичного эффектора, взаимодействующего с gPНК, при этом, gPНК может быть ковалентно сцеплена с RT, или, при этом, нуклеаза на основе CRISPR и/или gPНК нековалентным образом взаимодействуют с RT. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, RT предложена отдельно, включая добавление на конструкцию, кодирующую интересующую RT, и RT будет ассоциироваться с комплексом сайт-специфичного эффектора посредством комплементарного спаривания оснований, опосредованного плечами

гомологии в рамках RT, отжигая, по меньшей мере, до одного интересующего сайта-мишени в геноме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, белок слияния или нековалентно ассоциированный активный Cpf1 и инактивный dCas9 в качестве взаимодействующего домена могут быть предложены в виде сайт-специфичного эффектора. gРНК для Cas9 может нацеливаться на матрицу для репарации или ее удлинение, образуя комплекс Cpf1-dCas9-RT. crRNA (Cpf1) нацеливается на геномный локус, определенный для двухпочечного разреза, чтобы инициировать HDR. Аналогичным образом, можно использовать высокоактивный цинк-пальцевый белок, мегаTAL или инактивную мегануклеазу.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, предлагается растительная клетка, ткань, орган, материал или целое растение или его потомство, получаемое любым из способов, раскрытых в настоящем документе.

В связи с тем, что способы, предложенные в настоящем документе, специально разработаны для содействия предложению новых растений, обладающих агрономически благоприятными признаками, но не содержат трансгенной маркерной последовательности, способы, раскрытые в настоящем документе, подходят для создания множества различных генотипов растения быстрым и надежным способом.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, в соответствии с его различными аспектами, по меньшей мере, одна растительная клетка, подлежащая модификации, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, получена из растения, выбранного из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta spp.*, включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine hirsuta*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum* или из любого сорта, или подвида, принадлежащего одному из вышеупомянутых растений.

Способ продуцирования генетически модифицированных нетрансгенных растений:

В другом аспекте, настоящее изобретение предлагает способ получения генетически модифицированного растения путем редактирования генома, способ, содержащий этапы:

- а) предложения клеток или тканей растения, подлежащих генетической модификации;
- б) предложения первой системы редактирования генома и второй системы редактирования генома, при этом, первая система редактирования генома может нацеливаться и модифицировать селективируемый маркерный ген растения, а вторая система модификации генома может нацеливаться и модифицировать интересующий ген растения;
- с) совместной трансформации клеток или тканей с помощью первой и второй систем редактирования генома;
- д) регенерации растений из указанных трансформированных клеток или тканей, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, без селективного давления;
- е) селекции растений, в которых селективируемый маркерный ген был модифицирован из растений, регенерированных на этапе d); и
- ф) идентификации растения, ген-мишень которого модифицирован из растений, выбранных на этапе е).

Клетки или ткани растения включают любые клетки или ткани, которые могут быть регенерированы в интактные растения, такие как, протопласты, каллус, эксплантаты, незрелые зародыши и тому подобное.

В контексте настоящего документа, термин «генетическая модификация» включает изменение последовательности гена и/или изменение экспрессии гена.

В контексте настоящего документа, термин «интересующий ген» означает любую нуклеотидную последовательность, подлежащую модификации в растении, включая как структурные, так и неструктурные гены. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, интересующий ген ассоциирован с признаком растения, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, с агрономическим признаком.

В контексте настоящего документа, термин «селективируемый маркерный ген» означает эндогенный ген растения, который после соответствующей модификации придает растению селективируемый признак, который может быть выбран. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, селективируемый маркерный ген, при условии, что он модифицирован подходящим образом, существенно не изменяет другие признаки растения.

Например, селективируемый маркерный ген может представлять собой эндогенный ген растения с устойчивостью к гербицидам, который придает растению устойчивость к гербицидам при условии, что он модифицирован подходящим образом. Эндогенные гены растения с устойчивостью к гербицидам включают, но этим не ограничиваются, PsbA, ALS, EPSPS, ACCase,

PPO и HPPD, PDS, GS, DOXPS, и P450. Сайты мутаций ALS, способные придавать устойчивость к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, A122, P197, A205 и S653 (нумерация аминокислот относится к аминокислотной последовательности ALS из *Arabidopsis thaliana*). Сайты мутаций EPSPS, способные придавать устойчивость к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, T102, P106 (нумерация аминокислот относится к аминокислотной последовательности EPSPS из *Arabidopsis thaliana*). Сайты мутации ACCase, способные придавать устойчивость к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, I1781, W2027, I2041, D2078 и G2096 (нумерация аминокислот относится к аминокислотной последовательности ACCase хлоропласта из *Alopecurus myosuroides*). Сайты мутаций HPPD, способные придавать устойчивость к гербицидам, включают, но этим не ограничиваются, P277, L365, G417 и G419 (нумерация аминокислот относится к аминокислотной последовательности фермента HPPD из риса).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт мутации ALS, способный придавать устойчивость к гербицидам у пшеницы, включает TaALS P173. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт мутации ALS, способный придавать устойчивость к гербицидам у кукурузы, включает ZmALS P165. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, сайт мутации ALS, способный придавать устойчивость к гербицидам у риса, включает OsALS P171.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения, селективируемый маркерный ген может представлять собой геном, который, при надлежащей модификации, заставляет растение продуцировать визуально наблюдаемые изменения признака, такие как, гены, контролирующие лигулу, цвет листьев, воск листьев, включая, но этим не ограничиваясь, LIG, PDS, zb7 и GL2.

Традиционные способы модификации растений (трансгенные способы) требуют применения определенных селективных давлений во время регенерации растений (например, скрининг с использованием различных антибиотиков в зависимости от используемого трансгенного вектора) для повышения эффективности. Однако это приведет к интеграции чужеродных генов, в частности, генов устойчивости к антибиотикам, в геном растения, что приведет к потенциальным проблемам безопасности.

Используя технологию редактирования генома для модификации растения, система редактирования генома может достичь модификации гена-мишени без интеграции в геном растения. Таким образом, в способе по настоящему изобретению, регенерацию этапа d), в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, проводят без селективного давления. Это позволяет избежать интеграции чужеродных генов и приводит к генетически модифицированным (отредактированным в геномическом смысле) трансгенным растениям. Однако регенерация растений без селективного давления значительно снизит эффективность проведения скрининга.

Эта проблема решается в настоящем изобретении путем совместной трансформации системы редактирования генома, которая нацеливается на интересующий ген, и системы редактирования генома, которая нацеливается на эндогенный селектируемый маркерный ген.

Без привязки к какой-либо теории, поскольку в способе по настоящему изобретению система редактирования генома, которая нацеливается на интересующий ген, и система редактирования генома, которая нацеливается на эндогенный селектируемый маркерный ген, совместно трансформируются в растение (такое как, растительная клетка или ткань), то редактирование интересующего гена и редактирование эндогенных селектируемых маркерных генов будут иметь тенденцию происходить совместно. Таким образом, высока вероятность того, что интересующий ген растения, выбранного на основе эндогенного селектируемого маркерного гена, также будет модифицирован. Первый скрининг для редактирования эндогенных селектируемых маркерных генов значительно повысит эффективность скрининга редактирования интересующего гена. И, поскольку используются только эндогенные селектируемые маркерные гены, то это позволяет избежать трансгенных проблем. В настоящем изобретении, эндогенный селектируемый маркерный ген, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, не влияет на интересующий признак после модификации, например, не снижает урожайность и тому подобное. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, модификация эндогенного селектируемого маркерного гена придает растению дополнительные интересующие признаки, такие как, устойчивость к гербицидам. То есть, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, признаки, доступные для селекции растений по настоящему изобретению, также представляют собой агрономически полезные признаки, такие как, устойчивость к гербицидам.

Способ осуществления селекции на этапе е) зависит от природы селектируемого маркерного гена. Например, если селектируемый маркерный ген модифицирован для придания растению устойчивости к гербицидам, то регенерированное растение может быть помещено в подходящую концентрацию, при которой растение, имеющее селектируемый маркерный ген дикого типа, не может выжить или плохо растет. Затем выбирают растения, которые выживают или хорошо растут при такой концентрации гербицида.

Идентификация на этапе f) может быть осуществлена, например, посредством PCR/R или способов секвенирования. Специалист в данной области техники хорошо знаком с тем, как идентифицировать тот факт, был ли ген мутирован или нет.

Подходящие способы трансформации растения (клетки или ткани) по настоящему изобретению включают, но этим не ограничиваются, бомбардировку частицами, PEG-опосредованную трансформацию протопластов и опосредованную Агробактериями трансформацию.

Настоящее изобретение конкретно не ограничивается специфичной системой редактирования генома, при условии, что оно обеспечивает точное редактирование генома растения. Например, системы редактирования генома, подходящие для использования в

настоящем изобретении, включают, но этим не ограничиваются, системы точного редактора основания (PBE), системы CRISPR-Cas9, системы CRISPR-Cpf1, системы CRISPRi, системы цинк-пальцевых нуклеаз и системы TALEN. Выбор или конструирование подходящих систем редактирования генома, которые нацеливаются на интересующий ген и эндогенный селектируемый маркерный ген, находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники.

Системы CRISPR продуцированы бактериями в процессе эволюции для защиты от вторжения чужеродных генов. Их модифицировали и широко использовали при редактировании генома эукариот.

Система CRISPR-Cas9 относится к системе CRISPR редактирования генома на основе нуклеазы Cas9. Термины «нуклеаза Cas9» и «Cas9» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо, и они относятся к РНК-направляемой нуклеазе, которая включает белок Cas9 или его фрагмент (например, белок, содержащий активный домен расщепления ДНК Cas9 и/или gРНК-связывающий домен Cas9). Cas9 представляет собой компонент прокариотической иммунной системы CRISPR/Cas, которая может нацеливаться и расщеплять последовательности-мишени ДНК для формирования двухцепочечных разрывов ДНК (DSB) под руководством направляющей РНК. Системы CRISPR-Cas9, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, но этим не ограничиваются, системы, описанные в работе Шань, К. и др. Целенаправленная модификация генома сельскохозяйственных растений с использованием системы CRISPR-Cas. *Nat. Biotechnol.* 31, 686-688 (2013).

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

Система CRISPR-Cas9 по настоящему изобретению может включать одно из следующего:

- i) белок Cas9 и направляющую РНК;
- ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas9 и направляющую РНК;
- iii) белок Cas9 и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas9, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК; или

v) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cas9, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК.

Система CRISPR-Cpf1 представляет собой систему CRISPR редактирования генома на основе нуклеазы Cpf1. Разница между Cpf1 и Cas9 заключается в том, что молекулярная масса белка Cpf1 – невелика, и в качестве направляющей РНК требуется только crРНК, и последовательность PAM также отличается. Система CRISPR-Cpf1, подходящая для использования в настоящем изобретении, включает, но этим не ограничивается, систему, описанную в работе Тан и др., 2017.

Система CRISPR-Cpf1 по настоящему изобретению может включать одно из следующего:

- i) белок Cpf1 и направляющую РНК (crРНК);
- ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf1 и направляющую РНК;
- iii) белок Cpf1 и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf1, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК; или
- v) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Cpf1, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК.

Интерференция CRISPR (CRISPRi) представляет собой систему замалчивания гена, полученную из системы CRISPR-Cas9, которая использует инактивированный нуклеазой белок Cas9. Хотя эта система не изменяет последовательность гена-мишени, она также определена в настоящем документе, как система редактирования генома. Системы CRISPR-Cas9, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, но этим не ограничиваются, системы, описанные в работе Сет и Хариш, 2016.

Система CRISPRi по настоящему изобретению может включать одно из следующего:

- i) инактивированный нуклеазой белок Cas9 и направляющую РНК;
- ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую инактивированный нуклеазой белок Cas9 и направляющую РНК;
- iii) инактивированный нуклеазой белок Cas9 и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;
- iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую инактивированный нуклеазой белок Cas9, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК; или

v) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую инактивированный нуклеазой белок Cas9, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК.

Система точного редактора основания представляет собой систему, которая была разработана недавно на основе CRISPR-Cas9, которая позволяет осуществлять точное редактирование одного основания генома с использованием инактивированного нуклеазой белка слияния белка Cas9 и цитидиндезаминазы. Инактивированный нуклеазой Cas9 (из-за мутаций в субдомене HNH и/или субдомене RuvC домена расщепления ДНК) сохраняет gРНК-направленную ДНК-связывающую способность, и цитидиндезаминаза может катализировать дезаминирование цитидина(С) на ДНК с образованием урацила (U). Инактивированный нуклеазой Cas9 слит с цитидиндезаминазой. Под руководством направляющей РНК, белок слияния может нацеливаться на последовательность-мишень в геноме растения. Из-за отсутствия активности нуклеазы Cas9, двойная цепь ДНК не расщепляется. Домен дезаминазы в слитом белке преобразует цитидин одноцепочечной ДНК, продуцированной при образовании комплекса Cas9-gРНК-ДНК, в U, а замещение С на Т достигается посредством репарации ошибочного спаривания оснований. Система точного редактора основания, подходящая для использования в настоящем изобретении, включает, но этим не ограничивается, систему, описанную в работе Цзун и др., 2017.

Система точного редактирования основания по настоящему изобретению может включать одно из следующего:

i) белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9 и цитидиндезаминазу, а также направляющую РНК;

ii) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9, и направляющую РНК;

iii) белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9 и цитидиндезаминазу, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК;

iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9 и цитидиндезаминазу, и экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК; или

iv) экспрессионную конструкцию, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9, и цитидиндезаминазу, и нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, инактивированный нуклеазой белок Cas9 по настоящему изобретению содержит замещения аминокислоты D10A и/или H840A относительно Cas9 дикого типа (SpCas9 *S. pyogenes*). Примеры цитидиндезаминазы включают, но этим не ограничиваются, APOBEC1-дезаминазу, цитидиндезаминазу, индуцируемую активацией (AID), APOBEC3G или CDA1(PmCDA1).

«Цинк-пальцевая нуклеаза (ZFN)» представляет собой искусственный рестрикционный фермент, полученный путем слияния цинк-пальцевого ДНК-связывающего домена с доменом расщепления ДНК. Цинк-пальцевый ДНК-связывающий домен одиночной ZFN обычно содержит 3-6 индивидуальных цинк-пальцевых повторов, причем, каждый цинк-пальцевый повтор распознает, например, 3 пары оснований. Системы ZFN, подходящие для использования в настоящем изобретении, могут быть получены, например, на основании работы Шукла и др., 2009 и Таунсенд и др., 2009.

«Эффекторные нуклеазы, подобные трансактиватору (TALEN)» представляют собой рестрикционные ферменты, которые могут быть сконструированы для расщепления последовательностей специфичных ДНК, обычно получаемых слиянием ДНК-связывающего домена эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и домена расщепления ДНК. TALE может быть сконструирован для связывания практически любых желаемых последовательностей ДНК. Система TALEN, подходящая для использования в настоящем изобретении, может быть получена, например, на основании работы Ли и др., 2012.

Специалисты в данной области техники могут надлежащим образом определить комбинацию первой системы редактирования генома и второй системы редактирования генома в способе по настоящему изобретению, в соответствии с соответствующими характеристиками различных систем редактирования генома и желаемым для осуществления специфичным типом редактирования генома, например, выбирая подходящую комбинацию с тем, чтобы избежать взаимной интерференции, например, интерференции между различными системами, которые могут совместно использовать одну и ту же gРНК.

Например, если для эндогенного селективируемого маркерного гена требуется система редактирования одного основания для точной мутации с целью генерации селективируемых признаков, то систему CRISPR-Cas9 обычно не используют для нацеливания на интересующий ген, потому что две системы могут совместно использовать одну и ту же gРНК и, следовательно, Cas9, используемый для нокаута интересующего гена, также может нокаутировать эндогенный селективируемый маркерный ген, и наоборот.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления способов по настоящему изобретению, при этом, как первая, так и вторая системы редактирования генома представляют собой системы точного редактора основания.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, компоненты первой и второй систем редактирования генома могут быть экспрессированы посредством одной и той же экспрессионной конструкции или различных экспрессионных конструкций, среди которых специалисты в данной области техники могут легко выбрать подходящие. Например, направляющие РНК для интересующего гена и селективируемый маркерный ген могут быть транскрибированы посредством одной и той же экспрессионной конструкции. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, компоненты первой и

второй систем редактирования генома экспрессируются посредством одной и той же экспрессионной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению, при этом, первая и вторая системы редактирования генома обе представляют собой системы точного редактора основания, и, при этом, белок слияния инактивированного нуклеазой белка Cas9 и цитидиндезаминаза, и направляющие РНК для интересующего гена, и селективируемый маркерный ген экспрессируются посредством одной и той же экспрессионной конструкции.

В некоторых вариантах осуществления способа по настоящему изобретению, растение является однодольным или двудольным. Например, растение выбрано из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta spp.*, включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythraea guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Maris notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine nexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum*, или из любого сорта, или подвида, принадлежащему одному из вышеупомянутых растений. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, растение представляет собой сельскохозяйственное растение.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, способ дополнительно содержит получение потомства генетически модифицированного нетрансгенного растения.

В другом аспекте, настоящее изобретение также предлагает генетически модифицированное растение или его потомство, или его часть, при этом, растение получают вышеуказанным способом по настоящему изобретению.

В другом аспекте, настоящее изобретение также предлагает способ размножения растений, содержащий скрещивание первого генетически модифицированного растения, полученного вышеупомянутым способом по настоящему изобретению, со вторым растением, которое не содержит генетическую модификацию, посредством чего вводится упомянутая генетическая модификация во второе растение.

При одновременном нацеливании на интересующий ген, подлежащий модификации, и на эндогенный селектируемый маркерный ген в растении, эффективность скрининга генетически модифицированных нетрансгенных растений может быть значительно повышена. Посредством способа по настоящему изобретению, эффективность скрининга нетрансгенных мутантов может быть повышена, примерно, в 10-100 раз для интересующего гена, имеющего частоту мутаций менее 1%.

Способы доставки:

Специалисту в данной области техники известны различные подходящие методы доставки для введения генетического материала в растительную клетку, например, путем выбора методов прямой доставки, начиная от обработки протопластов полиэтиленгликолем (PEG) (Потрикус и др., 1985), процедур, подобных электропорации (Даллуин и др., 1992), микроинъекции (Нейгауз и др., 1987), технологии вискероов карбидокремниевое волокна (Кэплер и др., 1992), вирусно-опосредованных подходов (Гелвин, *Nature Biotechnology* 23, «Опосредованная вирусом трансформация растений получает стимул», 684-685 (2005)) и заканчивая бомбардировкой частицами (см., например, Соод и др., 2011, *Biologia Plantarum*, 55, 1-15).

Однако способы трансформации на основе биологических подходов, таких как, трансформация посредством *Agrobacterium* или трансформация растений, опосредованная вирусным вектором, и способы на основе физических способов доставки, таких как, бомбардировка частицами или микроинъекция, развивались как методы, играющие существенную роль в введении генетического материала в интересующую растительную клетку или ткань. В работе Хелениус и др. («Доставка генов в интактные растения с использованием генной пушки Helios™», *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18 (3):287-288) раскрыта бомбардировка частицами как физический способ введения материала в растительную клетку. Таким образом, в настоящее время существует множество способов трансформации растений для введения генетического материала в виде генетической конструкции в интересующую растительную клетку, содержащей биологические и физические механизмы, известные специалисту в области биотехнологии растений, и которые могут быть применены для введения, по меньшей мере, одного редактора основания и, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффектора, а также соответствующих комплексов, содержащих, по меньшей мере, один редактор основания и, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор. Примечательно, что указанные способы доставки для трансформации и трансфекции могут быть применены для одновременного введения инструментов по настоящему изобретению. Общим биологическим механизмом является трансформация посредством *Agrobacterium spp.*, которая использовалась в течение многих десятилетий для множества различных растительных материалов. Опосредованная вирусным вектором трансформация растений представляет собой дополнительную стратегию для введения генетического материала в интересующую клетку. Физические механизмы, находящие применение в биологии растений, представляют собой бомбардировку частицами, также называемую биолистической трансфекцией или опосредованным микрочастицами переносом

генов, который относится к способу физической доставки для переноса покрытой микрочастицы или наночастицы, содержащей нуклеиновую кислоту или интересующую генетическую конструкцию в клетку-мишень или ткань-мишень. Механизмы физического введения подходят для введения нуклеиновых кислот, то есть, РНК и/или ДНК, и белков. Аналогичным образом, существуют способы специфичной трансформации или трансфекции для специфичного введения интересующей конструкции нуклеиновой кислоты или аминокислотной конструкции в растительную клетку, включая электропорацию, микроинъекцию, наночастицы и проникающие в клетку пептиды (СРР). Кроме того, существуют способы трансфекции на химической основе для введения генетических конструкций и/или нуклеиновых кислот, и/или белков, содержащие, среди прочего, трансфекцию посредством фосфата кальция, трансфекцию с использованием липосом, например, катионных липосом, или трансфекцию посредством катионных полимеров, включая DEAD-декстран или полиэтиленмин, или их комбинации. Указанные способы доставки и носители или грузы, таким образом, по своей природе отличаются от инструментов доставки, которые используются для других эукариотических клеток, включая клетки животных и млекопитающих, и каждый способ доставки должен быть специально отрегулирован и оптимизирован, чтобы можно было ввести интересующую конструкцию для опосредования редактирования генома в конкретный компартмент интересующей клетки-мишени полностью функциональным и активным образом. Вышеуказанные методы доставки, по отдельности или в комбинации, могут быть использованы для вставки, по меньшей мере, одного молекулярного комплекса по настоящему изобретению, то есть, комплекса редактирования основания и/или комплекса сайт-специфичного эффектора или, по меньшей мере, одного его субкомпонента, то есть, по меньшей мере, одной SSN, по меньшей мере, одной gРНК, по меньшей мере, одной RT, или, по меньшей мере, одного редактора основания, или последовательностей, кодирующих вышеупомянутые субкомпоненты по настоящему изобретению, в клетку-мишень *in vivo* или *in vitro*.

Физические и химические способы доставки являются особенно предпочтительными в соответствии с настоящим изобретением, поскольку указанные способы обеспечивают осуществление совместной доставки и, следовательно, параллельное введение различных интересующих инструментов, по меньшей мере, в одну растительную клетку.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, участок sgРНК gРНК содержит петлю стебля или оптимизированную структуру петли стебля, или оптимизированную вторичную структуру. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, зрелая sgРНК содержит петлю стебля или оптимизированную структуру петли стебля в последовательности прямого повтора, при этом, петля стебля или оптимизированная структура петли стебля важна для активности расщепления. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, зрелая sgРНК, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, содержит одиночную петлю стебля. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательность прямого повтора, в предпочтительном варианте осуществления настоящего

изобретения, содержит одиночную петлю стебля. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, активность расщепления эффекторного белкового комплекса модифицируют путем введения мутаций, которые влияют на дуплексную структуру РНК петли стебля. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть введены мутации, которые поддерживают дуплекс РНК петли стебля, благодаря чему сохраняется активность расщепления эффекторного белкового комплекса. В других предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения, могут быть введены мутации, которые нарушают дуплексную структуру РНК петли стебля, в результате чего активность расщепления эффекторного белкового комплекса полностью исчезает.

Примечательно, что способы в соответствии с различными аспектами настоящего изобретения не ограничиваются первой и/или второй целенаправленной модификацией, являющейся модификацией в кодирующей области, кодирующей аминокислоту. Предусматривается также модификация регуляторной последовательности. Любая модификация, имеющая эпигенетическое действие, также может быть осуществлена способами по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна последовательность-мишень в геноме, подлежащая модификации, может представлять собой регуляторную последовательность, такую как, промотор, при этом, редактирование промотора содержит замену промотора или фрагмента промотора другим промотором (также называемым заместительным промотором) или фрагментом промотора (также называемым фрагментом заместительного промотора), при этом, замена промотора приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: повышенная активность промотора, повышенная тканеспецифичность промотора, пониженная активность промотора, пониженная тканеспецифичность промотора, новая активность промотора, активность индуцируемого промотора, расширенное окно экспрессии генов, модификация времени или прогресса развития экспрессии генов в одном и том же клеточном слое или в другом клеточном слое, например, удлинение времени экспрессии генов в тапетуме пыльников, мутация ДНК-связывающих элементов и/или делеция, или добавление ДНК-связывающих элементов. Промотор (или фрагмент промотора), подлежащий модификации, может представлять собой промотор (или фрагмент промотора), который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке. Заместительный промотор или его фрагмент может представлять собой промотор или его фрагмент, который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна последовательность-мишень в геноме может представлять собой промотор, при этом, редактирование промотора содержит замену нативного промотора EPSPS1 на промотор убиквитина растения. В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, одна последовательность-мишень в геноме, подлежащая модификации, может представлять

собой промотор, при этом, промотор, подлежащий редактированию, выбран из группы, содержащий промотор *Zea mays*-PEPC1 (Кауш и др., Plant Molecular Biology, 45: 1-15, 2001), промотор убиквитина *Zea mays* (UBI1ZM PRO, Кристенсен и др., Plant Molecular Biology 18: 675-689, 1992), промотор актина риса (Макэлрой и др., The Plant Cell, Том 2, 163-171, февраль 1990 г.), промотор *Zea mays*-GOS2 (Патент США № 6,504,083), или промотор олеозина *Zea mays* (Патент США № 8,466,341).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора может быть использован в комбинации с совместно доставляемой РТ для обеспечения возможности вставки промотора или элемента промотора в интересующую геномную нуклеотидную последовательность без включения селектируемого трансгенного маркера, при этом, вставка промотора (или вставка элемента промотора) приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: повышенная активность промотора, то есть, повышенная сила промотора, повышенная тканеспецифичность промотора, пониженная активность промотора, пониженная тканеспецифичность промотора, новая активность промотора, активность индуцируемого промотора, расширенное окно экспрессии генов, модификация времени или прогресса развития экспрессии генов, мутация ДНК-связывающих элементов и/или добавление ДНК-связывающих элементов. Элементы промотора, подлежащие вставке, могут представлять собой, но этим не ограничиваются, основные элементы промотора, такие как, но этим не ограничиваясь, СААТ-бокс, ССААТ-бокс, Прибнов-бокс и/или ТАТА-бокс, последовательности трансляционной регуляции и/или систему репрессоров для индуцируемой экспрессии, такую как, элементы репрессора/оператора/индуктора оператора ТЕТ или элементы репрессора/оператора/индуктора сульфонилмочевины. Элемент, реагирующий на дегидратацию (DRE), был впервые идентифицирован как элемент цис-действующего промотора в промоторе гена *rd29A*, реагирующего на засуху, который содержит консервативную сердцевинную последовательность из 9 пар оснований, ТАССGACAT (Ямагучи-Синодзаки, К. и Синодзаки, К. (1994) Plant Cell 6, 251-264). Вставка DRE в эндогенный промотор может придать индуцируемую засухой экспрессию нижерасположенного гена. Другим примером являются элементы, реагирующие на ABA (ABRE), которые содержат консенсусную последовательность (С/Т)ACGTGGC, обнаруженную в многочисленных ABA и/или стресс-регулируемых генах (Баск П.К., Пейджес М. (1998) Plant Mol. Biol. 37:425-435). Вставка энхансера 35S или энхансера MMV в область эндогенного промотора будет повышать экспрессию генов (Патент США № 5,196,525). Промотор, или элемент промотора, подлежащий вставке, может представлять собой промотор или элемент промотора, который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора может быть использован для вставки энхансерного элемента, такого как, но этим не ограничиваясь, энхансер 35 S вируса мозаики цветной капусты, перед эндогенным промотором FMT1 для усиления экспрессии FMT1. В другом варианте

осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора может быть использован для вставки компонента системы репрессора/оператора/индуктора оператора ТЕТ или компонента системы репрессора/оператора/индуктора сульфонилмочевины в геномы растений для генерирования или управления системами индуцируемой экспрессии без включения селектируемого трансгенного маркера.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора может быть использован для обеспечения возможности делеции промотора или элемента промотора, при этом, делеция промотора (или делеция элемента промотора) приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: постоянно инактивированный локус гена, повышенная активность промотора (повышенная сила промотора), повышенная тканеспецифичность промотора, пониженная активность промотора, пониженная тканеспецифичность промотора, новая активность промотора, активность индуцируемого промотора, расширенное окно экспрессии генов, модификация времени или прогресса развития экспрессии генов, мутация ДНК-связывающих элементов и/или добавление ДНК-связывающих элементов. Элементы промотора, подлежащие делеции, могут представлять собой, но этим не ограничиваются, основные элементы промотора, элементы энхансера промотора или элементы энхансера 35S. Промотор или фрагмент промотора, подлежащий делеции, может быть эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий сайт-мишень в геноме, подлежащий модификации, может представлять собой терминатор, при этом, редактирование терминатора содержит замену терминатора, также называемую «обменом терминатора» или «заменой терминатора», или фрагмента терминатора другим терминатором, также называемым заместительным терминатором, или фрагментом терминатора, также называемым фрагментом заместительного терминатора, при этом, замена терминатора приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: повышенная активность терминатора, повышенная тканеспецифичность терминатора, пониженная активность терминатора, пониженная тканеспецифичность терминатора, мутация ДНК-связывающих элементов и/или делеция или добавление ДНК-связывающих элементов. Терминатор или его фрагмент, подлежащий модификации, может представлять собой терминатор, который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке. Заместительный терминатор может представлять собой терминатор или его фрагмент, который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий сайт-мишень в геноме, подлежащий модификации, может представлять собой терминатор, при этом, терминатор, подлежащий редактированию, выбран из группы, содержащей

терминаторы из генов кукурузы Argos 8 или SRTF18, или другие терминаторы, такие как, терминатор PinII картофеля, терминатор актина сорго (WO 2013/184537 A1), терминатор T28 риса (WO 2013/012729 A2), AT-T9 TERM (WO 2013/012729 A2) или GZ-W64A TERM (Патент США № 7,053,282).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора по настоящему изобретению может быть использован в комбинации с совместно доставляемой последовательностью RT для обеспечения возможности вставки терминатора или элемента терминатора в интересующую геномную нуклеотидную последовательность, при этом, вставка терминатора (элемента) приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: повышенная активность терминатора, то есть, повышенная сила терминатора, повышенная тканеспецифичность терминатора, пониженная активность терминатора, пониженная тканеспецифичность терминатора, мутация ДНК-связывающих элементов и/или добавление ДНК-связывающих элементов.

Терминатор или элемент, или его фрагмент, подлежащий вставке, может представлять собой терминатор (или элемент терминатора), который является эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора по настоящему изобретению может быть использован для обеспечения возможности делеции терминатора или элемента терминатора, при этом, делеция терминатора (или делеция элемента терминатора) приводит к любому из следующих факторов или к любой комбинации из следующих факторов: повышенная активность терминатора (повышенная сила терминатора), повышенная тканеспецифичность терминатора, пониженная активность терминатора, пониженная тканеспецифичность терминатора, мутация ДНК-связывающих элементов и/или добавление ДНК-связывающих элементов. Терминатор или фрагмент терминатора, подлежащий делеции, может быть эндогенным, искусственным, уже существующим или трансгенным по отношению к редактируемой клетке.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один комплекс сайт-специфичного эффектора по настоящему изобретению может быть использован для модификации или замены регуляторной последовательности в геноме клетки без включения селектируемого трансгенного маркера. Регуляторная последовательность представляет собой сегмент молекулы нуклеиновой кислоты, который способен повышать или понижать экспрессию специфичных генов в организме и/или способен изменять тканеспецифичную экспрессию генов в организме. Примеры регуляторных последовательностей включают, но этим не ограничиваются, область 3' UTR (нетранслируемая область), область 5' UTR, активаторы транскрипции, транскрипционные репрессоры транскрипционных энхансеров, трансляционные репрессоры, факторы сплайсинга, miРНК, siРНК, искусственные miРНК, элементы промотора, энхансер 35 S CAMV, элементы энхансера MMV, элементы SECIS, сигналы полиаденилирования и сайты полиубиквитинирования. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения,

редактирование в форме, по меньшей мере, одной целенаправленной модификации по настоящему изобретению или замена регуляторного элемента приводит к трансляции измененного белка, расщеплению РНК, сплайсингу РНК, терминации транскрипции или к посттрансляционной модификации. В одном варианте осуществления настоящего изобретения, регуляторные элементы могут быть идентифицированы в промоторе, и эти регуляторные элементы могут быть отредактированы или модифицированы для оптимизации этих регуляторных элементов для угнетающей или стимулирующей регуляции промотора.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий сайт-мишень в геноме, подлежащий модификации, представляет собой сайт полиубиквитинирования, при этом, модификация сайтов полиубиквитинирования приводит к модифицированной скорости деградации белка. Метка убиквитина обрекает белки на деградацию протеасомами или аутофагией. Известно, что ингибиторы протеасом вызывают перепродуцирование белка. Модификации, вносимые в последовательность ДНК, кодирующую интересующий белок, могут приводить, по меньшей мере, к одной модификации аминокислоты интересующего белка, при этом, указанная модификация обеспечивает полиубиквитинирование белка (посттрансляционная модификация), приводящее к модификации деградации белка.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий сайт-мишень в геноме, подлежащий модификации, представляет собой сайт полиубиквитинирования на гене EPSPS кукурузы, при этом, модифицированный сайт полиубиквитинирования приводит к увеличению содержания белка вследствие более медленной скорости деградации белка EPSPS.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, по меньшей мере, один интересующий сайт-мишень в геноме, подлежащий модификации, представляет собой интронный сайт, при этом, модификация состоит из вставки интронного усиливающего мотива в интрон, что приводит к модуляции транскрипционной активности гена, содержащего указанный интрон.

Настоящее изобретение далее будет проиллюстрировано на следующих примерах, которые не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Примеры:

Пример 1: Секвенирование следующего поколения для верификации редактирования основания

Для тестирования активности с использованием соединенной никазы редактора основания для мишеней, описанных ранее, сконструировали плазмиду, кодирующую APOBEC-XTEN-Cas9 (никаза)-UGI (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2), посредством стандартных способов, и редактор основания, и sgРНК были экспрессированы транзientным образом в клетках, полученных из тканей *Zea mays*. Вместе с комплексом были протестированы gРНК, сконструированные для примеров 2-6. Кроме того, специфичные мотивы РАМ (см. SEQ ID NO:3-13 и 23) были определены в отношении интересующего сайта-мишени.

Кроме того, для расширения диапазона сайтов-мишеней, доступных для преобразования соответствующих аминокислот в генах-мишенях определенных гербицидов, белки SaKKH-BE3 и VQR-BE3 (Комор А. и др., Увеличение диапазона нацеливания на геном и точность редактирования основания посредством сконструированного слияния Cas9 с цитидиндезаминазой, Nat. Biotech. (2017)) были оптимизированы по кодонам для экспрессии в кукурузе, синтезированы и клонированы в плазмиду вместе с соответствующими sgРНК для экспрессии в одних и тех же системах клеток кукурузы.

Общую геномную ДНК выделяли из клеточных популяций через 12-96 часов после обработки редактором основания, экспрессирующим плазмиды, и подвергали целенаправленному глубокому секвенированию для анализа частоты и паттерна преобразований оснований в мишенях. Оценивали способность осуществления преобразования, вызывающего устойчивые к гербицидам замещения аминокислот в генах *ALS1* (особенно P197, S653), *ALS2* (особенно P197, S653) и *PPO* (особенно C215, A220, G221, N425, Y426).

Пример 2: Трансформация компонентов редактирования основания и выбор против сульфонилмочевин или имидазолинонов

Для демонстрации возможности редактирования основания придавать устойчивость к гербицидам с использованием способов, описанных в настоящем документе, редакторы основания, описанные в Примере 1, и используя несколько специфически сконструированных gРНК, нацеленных на гены кукурузы *ALS1*, *ALS2*, которые были валидизированы посредством NGS в Примере 1, трансформировали в ткани из *Zea mays* и регенерировали на селекционных средах, содержащих либо сульфонилмочевину (для замещений P197 или S653), либо имидазолинон (для замещений S653). В устойчивых к гербицидам растениях провели преобразование основания посредством действия редактора основания, что привело к замещению пролина в положении 197 или серина в положении 653, в зависимости от того, какой редактор основания был доставлен. Для верификации события преобразования основания, гены *ALS* в устойчивых к гербицидам растениях выбирали с использованием комплементарного гербицида и анализировали с использованием молекулярных методов.

Пример 3: Совместная селекция на устойчивость к гербицидам посредством действия редактора основания для обогащения частоты неселектируемой модификации в несцепленном локусе

Чтобы продемонстрировать тот факт, что нетрансгенная селекция для выделения растений с событиями редактирования генов предлагает подходящий и простой инструмент в процессе геномной инженерии, методологию, описанную в Примере 2, скомбинировали с совместной доставкой сайт-специфичной нуклеазы для одновременного генерирования преобразований основания гена гербицида и целенаправленных модификаций интересующего гена параллельно в одной и той же клетке. На одной и той же плазмиде или на второй плазмиде, нуклеаза кодируется вместе с sgРНК и, при необходимости, с матрицей для репарации, чтобы осуществить целенаправленную модификацию в тех же клетках, основание которых подверглось

преобразованию посредством действия редактора основания. На более поздней стадии, растения могут быть регенерированы при селекции гербицидов, как описано в Примере 2, а затем подвергнуты скринингу с помощью молекулярных и других соответствующих методов для целенаправленных модификаций в интересующем гене, в то время как селекция гербицидов обеспечивает значительное уменьшение количества клеток, подлежащих скринингу, по меньшей мере, для одной второй модификации, то есть, по меньшей мере, для одной целенаправленной модификации во втором геномном локусе, представляющем интересующий ген, подлежащий модификации.

Пример 4: Конструирование функционального редактора основания CRISPR/Cpf1 и определение окна редактирования основания

В этом примере второй белок CRISPR, Cpf1, использовали для доставки комплекса редактора основания к геномной мишени. Как и CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1 также формирует петлю R в виде структуры, когда связывает свою ДНК-мишень, оставляя цепь, не являющуюся мишенью, нетронутой в виде одной цепи для преобразований основания. Однако, поскольку точное положение окна преобразования основания посредством редактора основания, полученного из Cpf1, неизвестно, то необходимо проанализировать паттерн преобразования основания относительно последовательности РАМ в мишени. Окно преобразования основания можно определить посредством целенаправленного NGS на GC-богатых последовательностях генома кукурузы, после доставки редакторов на основе Cpf1, нацеленных на эти последовательности в клеточных популяциях, как описано в Примере 1. Для других растений-мишеней, стратегия может быть адаптирована соответствующим образом.

Пример 5: Использование однонуклеотидной делеции в гене PPO для продуцирования селективируемой модификации без матрицы для репарации или гомологичной рекомбинации

Делеция одноцепочечной аминокислоты глицина в положении 210 гена PPO в *Amaranthus tuberculatus* сделала этот сорняк устойчивым к гербицидам, ингибирующим PPO (Петцольдт, В.Л. и др. (2006). «Делеция кодона придает устойчивость к гербицидам, ингибирующим протопорфириногеноксидазу» PNAS 103 (33):12329-12334). Эта изоформа также называется PPX2L. Эквивалентная аминокислота в *Nicotiana tabacum* представляет собой глицин в положении 178 гена PPO2. В *Zea mays*, эквивалентная аминокислота представляет собой аланин, но окружающие остатки являются высококонсервативными и, вероятно, по-прежнему составляют функциональный активный сайт, который мог бы стать устойчивым, благодаря делеции аланина.

В этом примере, сайт-направленную нуклеазу, такую как, Cas9 или Cpf1, можно использовать с соответствующей crПНК или sgПНК, чтобы осуществить двухцепочечный разрез вблизи кодона для этой аминокислоты. Делеции с тремя основаниями, которые сохраняют активный фермент PPO при ингибировании связывания гербицидов, приведут к появлению устойчивых к гербицидам растений. Таким образом, эта селективируемая модификация может быть

выполнена без использования матрицы для репарации или гомологичной рекомбинации, что предлагает стратегию без использования трансгенных маркеров.

Пример 6: Дополнительные заявки

Допустимы дополнительные примеры с использованием нуклеаз CRISPR CasX, CasY, и Cpf1 вместе с заявками, описанными для CRISPR Cas9 выше в Примерах 1-3. Кроме того, введение ранних стоп-кодонов с использованием редактора основания, сцепленного с Cas9, описанного в Примере 1, или редактора основания, сцепленного с Cpf1, как описано в Примере 4, в селектируемые гены-мишени или фенотипические маркеры для скрининга растений. Конкретными примерами могут быть стоп-кодоны в фенотипических генах (например, многие глянцевые гены, золотые гены и так далее).

Дальнейшие мишени для селекции на основе устойчивости к гербицидам также включают другие делеции аминокислот, введение ранних стоп-кодонов или изменения аминокислот в генах PPO, ALS и EPSPS, как описано выше. Предложены последовательности протоспейсера gPHK, подходящие для редактирования основания в гене PPO (см. SEQ ID NO:7-13).

Далее, предложены последовательность для комплекса редактирования основания, сцепленного с CasX (SEQ ID NO:14), последовательность для комплекса редактирования основания, сцепленного с AsCpf1 (SEQ ID NO:15), и последовательность для включения цитидиндезаминазы PmCDA1 в комплекс редактирования основания, сцепленный с Cas9 (SEQ ID NO:16).

Для оптимизации и, в частности, для конструирования *de novo* комплексов редактирования основания, сцепленных с нуклеазой CRISPR, можно использовать любой порядок и комбинацию следующих компонентов: niCas9 (D10A; SEQ ID NO:17), CasX (SEQ ID NO:18), niAsCpf1 (R1226A; SEQ ID NO:19), APOBEC1 (SEQ ID NO:20), UGI (SEQ ID NO:21), PmCDA1 (SEQ ID NO:22), а также линкеры, включая линкеры XTEN, и сигналы ядерной локализации или другие сигналы нацеливания на органеллу, в зависимости от интересующего геномного сайта или любой комбинации вышеупомянутых компонентов.

Пример 7: Скрининг мутантных растений риса

В соответствии с работой Юань Цзун и др. (Цзун, Ю. и др. Точное редактирование основания в рисе, пшенице и кукурузе посредством слияния Cas9 и цитидиндезаминазы. Nat. Biotechnol. 2017, doi: 10.1038/nbt.3811), вектор pH-nCas9-PBE-OsALS-S1/S2, который одновременно нацелен на два разных сайта (S1 и S2) гена OsALS (GenBank №: AY885674.1), был сконструирован на основе pH-nCas9-PBE. Сайт S1 гена OsALS используется в качестве сайта для селекции гербицидов. Если локус S1 является мутированным, то растения приобретут устойчивость к гербицидам, таким как, никосульфурон (Транел и Райт, 2002). Последовательность-мишень sgPHK в эксперименте показана в Таблице 1.

Таблица 1. Последовательность-мишень sgPHK риса

sgPHK	Целенаправленная последовательность
sgPHK-OsALS-S1	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u>
sgPHK-OsALS-S2	<u>CCT</u> ACCCGGGCGGCGCGTCCATG

РАМ подчеркнут.

Бинарный вектор pH-nCas9-PBE-OsALS-S1/S2 был трансформирован в штамм *Agrobacterium* AGL1 посредством электропорации. Трансформация, опосредованная *Agrobacterium*, культивирование ткани и регенерация сорта риса Zhonghua 11 были выполнены в соответствии с работой Шань и др. (Шань, К. и др. Целенаправленная модификация генома сельскохозяйственных растений с использованием системы CRISPR-Cas. *Nat. Biotechnol.* 31, 686-688 (2013)). При культивировании ткани использовали селекцию гигромицина (50 мкг/мл). (Этот эксперимент является доказательством концепции, поэтому растения были селектированы сначала посредством гигромицина, а затем никосульфурона. Цель состояла в том, чтобы сначала получить трансгенные растения, а затем провести скрининг на устойчивость к гербицидам). После регенерации растений риса, 10 регенерированных проростков выращивали на селекционной среде, содержащей 0,0065 частей на миллион никосульфурона, при которой растения дикого типа не могут выжить. Четыре проростка выжили через 14 дней. Экстрагировали ДНК из четырех проростков. Ген ALS амплифицировали посредством PCR и секвенировали для определения мутантного генотипа. Результаты показали, что все четыре проростка имели мутации оснований в локусе S2, и устойчивые к гербицидам растения имели скорость мутации 100% (4/4) в сайте S2. Паттерн мутации показан на Фигуре 2А.

Пример 8: Скрининг мутантных растений пшеницы

В соответствии с работой Юань Цзун и др. (Цзун, Ю. и др. Точное редактирование основания в рисе, пшенице и кукурузе посредством слияния Cas9 и цитидиндезаминазы. *Nat. Biotechnol.* 2017, doi: 10.1038/nbt.3811), следующие конструкции были получены на основе pTaU6:

- 1) нацеливание pTaU6-TaALS-S2 на сайт S2 гена TaALS генома В (GenBank №: AY210406),
- 2) нацеливание pTaU6-TaACCcase на сайт в гене TaACCcase генома В и генома D (GenBank № EU660901 и EU660902),
- 3) pTaU6-TaALS-S1/S2, который нацелен на два сайта гена TaALS параллельно, и
- 4) pTaU6-TaALS-S1/TaACCcase, который нацелен на гены TaALS и TaACCcase параллельно.

Сайт S1 TaALS использовали в качестве сайта селекции. Если сайт является мутированным, то растения приобретут устойчивость к гербицидам (таким как никосульфурон), в то время как мутация только в сайте S2 гена TaALS не придаст такой устойчивости (Транел и Райт, 2002). Последовательность-мишень sgPHK в эксперименте показана в Таблице 2.

Таблица 2. Последовательность-мишень sgРНК пшеницы

sgРНК	Последовательность-мишень
sgРНК-TaALS-S1	CAGGTCCCCCGCCGCATGAT <u>CGG</u>
sgРНК-TaALS-S2	<u>CCT</u> ACCCTGGCGGCGCGTCCATG
sgРНК-TaACCCase	TTCAGCTACTAAGACAGCGC <u>AGG</u>

РАМ подчеркнут.

Плазмидная ДНК (смесь равных пропорций векторных рядов pncas9-PBE и pTaU6) использовалась для бомбардировки незрелых зародышей Konun 199, как было описано ранее для трансформации (Чжан, К., Лю, Дж., Чжан, Ю., Ян, Ж. и Гао, Ц. Биоликтическая генетическая трансформация широкой линейки сортов китайской элитной пшеницы (*Triticum aestivum* L.). J. Genet. Genomics. 42, 39-42 (2015). После бомбардировки, зародыши обрабатывали в соответствии с данными, имеющимися в литературе, но во время культивирования ткани не использовали селективные агенты.

Для растений пшеницы, полученных исключительно посредством нацеливания на сайт S2 гена TaALS генома В, каждые 3-4 растения объединяли в один образец для определения мутаций посредством PCR/RE. Определяли мутации посредством PCR/RE в 258 образцах (приблизительно 1000 отдельных растений), и мутации не были определены.

Для растений пшеницы, полученных исключительно нацеливанием на сайт гена TaACCCase, каждые 3-4 растения объединяли в один образец и подвергали секвенированию по Сэнгеру. Секвенировали 64 образца (около 256 отдельных растений), и мутации не были определены.

Растения пшеницы (приблизительно 800 растений), полученные путем параллельного нацеливания на сайты S1 и S2 гена TaALS, сначала выращивали на селекционной среде, содержащей 0,13 частей на миллион никосульфурона (на которой растения дикого типа не могли выжить). Через 30 дней, выжили двенадцать проростков, а 9 из них имели мутации оснований в сайте S2 гена TaALS. Эффективность селекции мутантных растений сайта S2 ALS с использованием селекционной среды с никосульфуроном составила 75% (9/12). Типы мутаций пяти мутантов показаны на Фигуре 2В.

Растения пшеницы (около 800 растений), полученные путем параллельного нацеливания на гены TaALS и TaACCCase, выращивали на селекционной среде, содержащей 0,13 частей на миллион никосульфурона. Через 30 дней, выжили 9 проростков, а 2 растения имели мутации оснований в сайте TaACCCase. Эффективность селекции мутантных растений сайта TaACCCase с использованием селекционной среды с никосульфуроном составила 22% (2/9). Паттерн мутации сайта TaACCCase показан на Фигуре 2С.

Экспериментальные результаты показывают, что для гена-мишени, скорость мутации которого очень низка (например, ген-мишень имеет скорость мутации 0,5%), способ по

настоящему изобретению может увеличить вероятность получения целенаправленной мутации в 10-100 раз.

Пример 9: Разработка системы совместного редактирования основания в пшенице на основе TaALS-P173

В данном исследовании, сайт sgPHK, соответствующий TaALS-P173, был использован для создания системы селекции гербицидов при трансформации пшеницы. Конструкции PnCas9-PBE и TaALS-P173-sgPHK были доставлены в 640 незрелых зародышевых клеток сорта пшеницы мягкой Kenong 199 посредством бомбардировки частицами. После того, как проростки (высотой 2-3 см) были регенерированы, для анализа частоты мутаций использовали анализ расщепления рестрикционных ферментов PCR (анализ PCR-RE). Одновременно, эти проростки переносили на среду, содержащую 0,27 частей на миллион никосульфурона (Фигура 3). Десять (1,56%) из четырнадцати (2,1%) мутантных проростков, идентифицированных с использованием анализа PCR-RE, показали устойчивость после 3-недельного роста на средах, содержащих гербициды, а три чувствительных мутанта не содержали какого-либо замещения аминокислот (Таблица 3).

Таблица 3

Устойчивость		Замещение генома A	Замещение генома B	Замещение генома D
R	T0-1	F/S	F/S	F/S
R	T0-2	F(гетеро)	F(гомо)	S(гомо)
R	T0-3	S(гетеро)	F/S	S(гетеро)
S	T0-4	WT	WT	SM
R	T0-5	S(гомо)	S(гетеро)	F/S
R	T0-6	S(гомо)	F,C(гетеро)	WT
S	T0-7	S(гомо)	F,C(гетеро)	WT
R	T0-8	WT	WT	F(гетеро)
R	T0-9	F(гомо)	F/S	S(гетеро)
R	T0-10	F(гомо)	F/S	S(гетеро)
R	T0-11	S(гетеро)	F(гетеро)	F/S
R	T0-12	S(гетеро)	F(гетеро)	F/S
S	T0-13	WT	SM	WT
S	T0-14	WT	SM	WT

SM: Молчащая мутация; S: Чувствителен; R: Устойчив; Гомо: гомозиготный; Гетеро: гетерозиготный

Полученные результаты подтвердили, что замещение TaALS-P173 можно распознать по средам, содержащим гербициды. Затем авторы изобретения проверили с помощью тестов, можно ли также использовать этот сайт для селекции для других событий редактирования генома. Таким

образом, другие три сайта (TaALS-A98, TaALS-A181, а также TaACCCase-A2004) комбинировали с TaALS-P173 по отдельности. Для оценки эффективности селекции, регенерированные проростки, подвергнутые совместной бомбардировке посредством систем нацеливания на сайт TaALS-P173, помещали на среды, содержащие никосульфурон, и выжившие проростки подвергали генотипированию. Мутанты-мишени определяли во всех трех сайтах (Таблица 4) при эффективности отбора до 78%. В сайтах TaALS-A181 и TaACCCase-A2004, эффективность селекции была относительно низкой (~25%), что, возможно, было вызвано низкой способностью к преобразованию дезаминазы APOBEC1 в контексте GC.

Для повышения эффективности селекции на сайтах с контекстом GC, APOBEC1 был заменен другой дезаминазой-PmCDA1, которая имеет предпочтение к другой последовательности, по сравнению с APOBEC1. Вновь сгенерированные конструкции редактора основания pPmCDA1-PBE, TaACCCase-A2004-sgPНК и TaALS-P173-sgPНК были доставлены в 640 незрелых зародышевых клеток посредством бомбардировки частицами. Из 2 выживших проростков, оба (100%) содержали мутантные аллели в сайте-мишени TaACCCase-A2004 (Таблица 4).

Таблица 4

	Дезаминаза	Количество выживших растений	Количество мутантов во втором сайте	Эффективность селекции (%)
TaALS-P173+A98	APOBEC1	18	14	78
TaALS-P173+A181	APOBEC1	8	2	25
TaALS-P173	APOBEC1	9	2	22
+TaACCCase A2004	PmCDA1	2	2	100

Пример 10: Разработка системы совместного редактирования основания в кукурузе на основе ZmALS-P165

Чтобы установить систему совместного редактирования в кукурузе, сайт ацетолактатсинтазы, соответствующий TaALS-P173, был нацелен на тестирование устойчивости к гербицидам. Сообщалось, что один отредактированный аллель на ZmALS2 может придавать растениям устойчивость к гербицидам (Свиташев и др., 2016). Таким образом, бинарный вектор, нацеленный на ZmALS-P165, был трансформирован в незрелые зародыши (сайт ZmALS-P165 является консервативным как в ZmALS1, так и в ZmALS2). Среди регенерированных растений были получены три независимых мутанта, и у них присутствуют одинаковые генотипы. Два аллеля ZmALS1 и один аллель ZmALS2, содержащие замещения С на Т, привели к изменению остатка одноцепочечной аминокислоты: пролина на лейцин в положении 165. Одно мутантное растение с замещением гетерозиготного P165L на ZmALS2 показало устойчивость к мезосульфурон-метилу, классу гербицидов – сульфонилмочевины (Фигура 4).

После подтверждения того факта, что сайт ZmALS-P165 мог бы хорошо работать в качестве селективируемого маркера, два других сайта - ZmAccase A2004 и ZmSbe2 Stop комбинированы с этим селективируемым сайтом по отдельности. Как биолистическая, так и Agrobacterium-опосредованная доставка были использованы для трансформации. Поскольку сайт ZmAccase A2004 находился в контексте GC, то PmCDA1 использовали для замены APOBEC1.

Для оценки эффективности селекции с использованием биолистической доставки, каллусы, подвергнутые бомбардировке, а также трансформированные посредством Agrobacterium незрелые зародыши помещали на среду, содержащую мезосульфурон-метил. Выживший проросток показал мутацию сайта-мишени.

Пример 11: Разработка системы совместного редактирования основания в рисе на основе OsALS-P171

Чтобы установить систему совместного редактирования в рисе, сайт ацетолактатсинтазы, соответствующий TaALS-P173, нацеливали на тестирование устойчивости к гербицидам. Сообщалось, что один отредактированный аллель может придавать растениям устойчивость к гербицидам (Каваи, К., Каку, К., Идзава, Н., Симидзу, М., Кобаяси, Х., и Симидзу, Т. (2008). Чувствительность к гербицидам мутированных ферментов, экспрессированных из искусственно генерируемых генов ацетолактатсинтазы. *Journal of pesticide science*, 33(2), 128-137.). Таким образом, бинарный вектор, нацеленный на OsALS-P171, был трансформирован в незрелые зародыши. Мутанты были получены из регенерированных растений.

После подтверждения того факта, что сайт OsALS-P171 будет хорошо работать в качестве селективируемого маркера, другие три сайта – OsAccase W2125, OsBDAN2 Stop и OsSbe2 Stop комбинировали с этим селективируемым сайтом по отдельности. Как биолистическая, так и Agrobacterium-опосредованная доставка были использованы для трансформации. Выживший проросток показал мутацию сайта-мишени.

Пример 12: Разработка системы совместного редактирования основания в кукурузе на основе ZmALS-P197 или ZmALS-G654

1. Генерация преобразований аминокислот, которые придают устойчивость к гербицидам, осуществляемых посредством редакторов основания

Аминокислоты-мишени *Zea mays* были выбраны для преобразования в аминокислоты, которые были замечены в сорняках, устойчивых к группам гербицидов, таким как, имидазолины и сульфонилмочевины. Зеленые стрелки на Фигуре 5 представляют направляющие последовательности для кодирующей или не кодирующей цепи для получения желаемого преобразования. Примечание: координаты аминокислотных остатков, пронумерованных в этом Примере, стандартизированы для архетипического гена ALS из *Arabidopsis thaliana*. Положения этих остатков в пептидных последовательностях кукурузы и пшеницы будут несколько отличаться.

2. Чувствительный к гербициду кодон P197 в кукурузе также может быть эффективно отредактирован редакторами основания

Все эксперименты проводились в Системе Протопласта Кукурузы. Промотор Pol III для sgРНК: - Были заданы направления для модификации генов ALS1 и ALS2 в локусе P197 (Фигура 6, левый график, сверху) и в локусе G654 (Фигура 6, правый график, сверху). Система редактора основания представляет собой одновекторную систему, в данном случае с редактором основания, управляемым pUbi1, и направляющей РНК, управляемой ZmU3. Результаты, показанные выше, представляют собой % частоты преобразования С в Т, рассчитанный для каждого С в направляющей РНК и минус фон из отрицательных значений контроля как для ALS1, так и для ALS2. Частота, показанная в настоящем документе, не указывает на тот факт, изменился ли один, или оба С в кодоне P197 в одной и той же клетке. В локусе G654 изменения также были очевидны, но в меньшей степени.

3. Чувствительный к гербицидам остаток преобразован в устойчивый к гербицидам с частотой до 6% обработанных клеток (Фигура 7)

Другой способ анализа данных, показанный на Фигуре 6, представляет собой подсчет количества прочтений, показывающий желаемое преобразование кодона аминокислоты. Конечные данные процентного содержания нормализованы по отношению к эффективности трансформации протопласта.

Верхняя панель: - Показывает % прочтений, где пролин197 был преобразован в лейцин или серин в обоих локусах ALS1 и ALS2. Данные взяты из эксперимента, в котором использовался промотор Pol III.

Средняя панель: - Показывает % прочтений, где пролин197 был преобразован в лейцин или серин в обоих локусах ALS1 и ALS2. Данные взяты из эксперимента, в котором использовался промотор Pol II и стратегия доставки рибозима для sgРНК.

Нижняя панель: - Показывает % прочтений, где глицин654 был преобразован в аспарагиновую кислоту в обоих локусах ALS1 и ALS2. Данные взяты из эксперимента, в котором использовался промотор Pol III и стратегия доставки рибозима для sgРНК.

Формула изобретения

1. Способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащей, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции трансгенной селективируемой маркерной последовательности, содержащий:

a. введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация основания вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака;

b. введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится с использованием, по меньшей мере, одного сайт-специфичного эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится одновременно или последовательно с введением, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или, по меньшей мере, в одну, принадлежащую потомству, клетку, ткань, орган или растение потомства, содержащее, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию, для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и

c. выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной, принадлежащей потомству, клетки, ткани, органа или растения потомства посредством селекции

i. по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией основания в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, посредством дальнейшей селекции

ii. по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором растительном сайте-мишени в геноме растения.

2. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что этап (b) дополнительно содержит введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, втором сайте-мишени в геноме растения.

3. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что содержит дальнейший этап

d. скрещивания, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученного потомства растений или растительного материала для

достижения интересующего генотипа, при необходимости, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

4. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор временно или постоянно сцеплен с, по меньшей мере, одним комплексом редактирования основания, при этом, комплекс редактирования основания опосредует, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию основания этапа а.

5. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза, содержащая нуклеазу CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные нуклеазы, или редактор основания, или любой вариант или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

6. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, направляющий, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей

- a. Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9,
- b. Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1,
- c. CasX или
- d. CasY,

или любой вариант или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, предпочтительно, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в нуклеазу специфичной одноцепочечной ДНК или ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

7. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания осуществляется, по меньшей мере, посредством одного комплекса редактирования основания, содержащего, по меньшей мере, один редактор основания в качестве компонента.

8. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что комплекс редактирования основания содержит, по меньшей мере, одну цитидиндеаминазу или ее каталитически активный фрагмент.

9. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания представляет собой преобразование любого нуклеотида C, A, T или G в любой другой нуклеотид.

10. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, комплекс редактирования основания содержит компонент APOBEC1.

11. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что комплекс редактирования основания содержит компонент UGI, и/или комплекс редактирования основания содержит компонент XTEN.
12. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, комплекс редактирования основания содержит компонент PmCDA1.
13. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, и, при этом, по меньшей мере, два компонента физически сцеплены.
14. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один комплекс редактирования основания содержит более одного компонента, и, при этом, по меньшей мере, два компонента предложены в виде отдельных компонентов.
15. Способ по пункту 7, отличающийся тем, что, один компонент, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания содержит, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу.
16. Способ по пункту 15, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS).
17. Способ по пункту 15, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид хлоропласта.
18. Способ по пункту 15, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид митохондрии.
19. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак преимущества роста, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста к соединению или триггеру, подлежащему добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.
20. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, предпочтительно к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при

этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

21. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербицидам, при этом, устойчивость/толерантность к гербицидам выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат, устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам PPO и устойчивости/толерантности к синтетическим ауксинам, включая дикамбу (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота).

22. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, предпочтительно признак устойчивости/толерантности к гербицидам, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придает устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, предпочтительно к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

23. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой ALS.

24. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой PPO.

25. Способ по пункту 19, отличающийся тем, что, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой EPSPS, ALS или PPO, и, при этом, EPSPS, ALS и PPO содержит, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты, приводящее к, по меньшей мере, одному преобразованию соответствующей аминокислоты, при этом, по меньшей мере, одно преобразование нуклеиновой кислоты осуществляется, по меньшей мере, одним редактором основания.

26. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A122, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

27. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей P197, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

28. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A205, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

29. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей D376, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

30. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей R377, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

31. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей W574, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

32. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей S653, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

33. Способ по пункту 23, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G654, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью ALS, в соответствии с SEQ ID NO:25.

34. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей C215, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

35. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей A220, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

36. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G221, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

37. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей N425, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

38. Способ по пункту 24, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей Y426, или в последовательности, кодирующей I475, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью PPO, в соответствии с SEQ ID NO:26.

39. Способ по пункту 25, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G101, и в G144, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27.

40. Способ по пункту 25, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей G101, и в A192, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27.

41. Способ по пункту 25, отличающийся тем, что, целенаправленная модификация происходит в последовательности, кодирующей T102, и в P106, по сравнению со стандартной/эталонной последовательностью EPSPS, в соответствии с SEQ ID NO:27.

42. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения.

43. Способ по пункту 42, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой глянцевый фенотип.

44. Способ по пункту 42, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой золотой фенотип.

45. Способ по пункту 42, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой фенотип пигментации или фенотип преимущества роста.

46. Способ по пункту 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна растительная клетка, подлежащая модификации, предпочтительно получена из растения, выбранного из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta spp.*, включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum*

tuberosum, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Marus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine nexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum* или из любого сорта, или подвида, принадлежащего к одному из вышеупомянутых растений.

47. Способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащей, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции трансгенной селектируемой маркерной последовательности, содержащий:

а. введение, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации делеции кодона в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфичного эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна целенаправленная модификация делеции кодона вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селектируемого признака;

б. введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфичного эффектора для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится одновременно или последовательно с введением, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или в, по меньшей мере, одну, принадлежащую потомству, клетку, ткань, орган или растение потомства, содержащее, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию, для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и

с. выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной, принадлежащей потомству, клетки, ткани, органа или растения потомства посредством селекции

і. по меньшей мере, одного фенотипически селектируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификацией делеции кодона в первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, посредством дальнейшей селекции

ii. по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения,

d. дополнительно: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученного потомства растений или растительного материала для достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

48. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что предпочтительно этап b. дополнительно содержит введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, одном первом и/или втором сайте-мишени в геноме растения.

49. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные нуклеазы, или любой их вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

50. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей

- a. Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9,
- b. Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1,
- c. CasX или
- d. CasY,

или любой вариант или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, при необходимости, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в нуклеазу специфичной одноцепочечной ДНК или ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

51. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, сайт-специфичный эффектор или, по меньшей мере, один компонент комплекса, содержащего, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор, содержит, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу.

52. Способ по пункту 51, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS).

53. Способ по пункту 51, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид хлоропласта.

54. Способ по пункту 51, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид митохондрии.

55. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак преимущества роста, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста к соединению или триггеру, подлежащему добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.

56. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или, при этом, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, предпочтительно к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

57. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербициду, при этом, устойчивость/толерантность к гербициду выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат, устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая

арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам PPO и устойчивости/толерантности к синтетическим ауксинам, включая дикамбу (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота).

58. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, предпочтительно признак устойчивости/толерантности к гербициду, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация делеции кодона в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придает устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, предпочтительно к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

59. Способ по пункту 58, отличающийся тем, что первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой гомолог продукта гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus* для цели селекции.

60. Способ по пункту 59, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация делеции кодона происходит в положении, сопоставимом с остатком G210 продукта гена PPX2L из *Amaranthus tuberculatus*, в соответствии с SEQ ID NO:28.

61. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селектируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения.

62. Способ по пункту 47, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна растительная клетка, подлежащая модификации, предпочтительно получена из растения, выбранного из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosom*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarium*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta spp.*, включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Marus*

notabilis, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine nexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum* или из любого сорта, или подвида, принадлежащего к одному из вышеупомянутых растений.

63. Способ выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки или, по меньшей мере, одной модифицированной растительной ткани, органа или целого растения, содержащего, по меньшей мере, одну модифицированную растительную клетку, без стабильной интеграции трансгенной селективируемой маркерной последовательности, способ содержащий:

а. введение, по меньшей мере, одного первого целенаправленного сдвига рамки или модификации делеции в первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации с использованием, по меньшей мере, одного первого сайт-специфичного эффектора, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один целенаправленный сдвиг рамки или модификация делеции вызывает экспрессию, по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака;

б. введение, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во второй сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится с использованием, по меньшей мере, одного второго сайт-специфичного эффектора, содержащего нуклеазу, рекомбиназу или реагент модификации ДНК, для создания, по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения, при этом, по меньшей мере, одна вторая целенаправленная модификация вводится одновременно или последовательно с введением, по меньшей мере, одной первой целенаправленной модификации основания в одну и ту же, по меньшей мере, одну растительную клетку, подлежащую модификации, или, по меньшей мере, в одну, принадлежащую потомству, клетку, ткань, орган или целое растение потомства, содержащее, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию, для получения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки; и

с. выделение, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения, или выделение, по меньшей мере, одной, принадлежащей потомству, клетки, ткани, органа или растения потомства посредством селекции

і. по меньшей мере, одного фенотипически селективируемого признака, вызванного, по меньшей мере, одним первым целенаправленным сдвигом рамки или модификацией делеции в

первом сайте-мишени в геноме растения, и, при необходимости, посредством дальнейшей селекции

ii. по меньшей мере, одной второй целенаправленной модификации во втором сайте-мишени в геноме растения,

d. дополнительно: скрещивание, по меньшей мере, одного модифицированного растения или растительного материала, содержащего, по меньшей мере, одну первую и, по меньшей мере, одну вторую целенаправленную модификацию, с другим интересующим растением или растительным материалом для сегрегации полученного потомства растений или растительного материала для достижения интересующего генотипа, при необходимости, при этом, интересующий генотип не содержит, по меньшей мере, одну первую целенаправленную модификацию.

64. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что этап b. дополнительно содержит введение матрицы для репарации для осуществления целенаправленного преобразования последовательности или замены в, по меньшей мере, одном первом и/или втором сайте-мишени в геноме растения.

65. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор выбран из, по меньшей мере, одного из следующих: нуклеаза CRISPR, включая нуклеазы Cas или Cpf1, TALEN, ZFN, мегануклеаза, нуклеаза Аргонавт, рестрикционная эндонуклеаза, включая FokI или ее вариант, рекомбиназа или две сайт-специфичные нуклеазы, или любой их вариант, или каталитически активный фрагмент вышеупомянутых эффекторов.

66. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор представляет собой нуклеазу на основе CRISPR, при этом, нуклеаза на основе CRISPR содержит сайт-специфичный ДНК-связывающий домен, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательность, выбрана из группы, содержащей

- a. Cas9, включая SpCas9, SaCas9, SaKKH-Cas9, VQR-Cas9, St1Cas9,
- b. Cpf1, включая AsCpf1, LbCpf1, FnCpf1,
- c. CasX или
- d. CasY,

или любой вариант или производное вышеупомянутых нуклеаз на основе CRISPR, при необходимости, при этом, по меньшей мере, одна нуклеаза на основе CRISPR содержит мутацию, по сравнению с соответствующей последовательностью дикого типа, в результате чего полученная нуклеаза на основе CRISPR преобразуется в никазу специфичной одноцепочечной ДНК или ДНК-связывающий эффектор, не обладающий способностью расщеплять всю ДНК.

67. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор или, по меньшей мере, один компонент комплекса, содержащего, по меньшей мере, один сайт-специфичный эффектор, содержит, по меньшей мере, один сигнал

локализации органеллы для нацеливания, по меньшей мере, одного комплекса редактирования основания на субклеточную органеллу.

68. Способ по пункту 67, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой сигнал ядерной локализации (NLS).

69. Способ по пункту 67, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид хлоропласта.

70. Способ по пункту 67, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один сигнал локализации органеллы представляет собой транзитный пептид митохондрии.

71. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, первый сайт-мишень в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки представляет собой сайт-мишень в геноме, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, при этом, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак устойчивости/толерантности или признак преимущества роста, и, при этом, по меньшей мере, одна первая целенаправленная модификация основания в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки придает устойчивость/толерантность или преимущество роста к соединению или триггеру, подлежащему добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани или растению, или к его потомству.

72. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один интересующий фенотипически селективируемый признак представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген, или он кодируется им, или, при этом, по меньшей мере, один интересующий фенотипический признак представляет собой, по меньшей мере, один трансген, или он кодируется им, при этом, по меньшей мере, один эндогенный ген или, по меньшей мере, один трансген кодирует, по меньшей мере, один фенотипический признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к фитотоксину, предпочтительно к гербициду, способный ингибировать, повреждать или убивать клетки, не имеющие, по меньшей мере, одной модификации в, по меньшей мере, одном интересующем фенотипическом признаке, или, при этом, по меньшей мере, один фенотипический признак выбран из группы, состоящей из стимуляторов клеточного деления, скорости роста, эмбриогенеза или другого фенотипически селективируемого свойства, которое предлагает преимущество модифицированной клетке, ткани, органу или растению, по сравнению с немодифицированной клеткой, тканью, органом или растением.

73. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один первый сайт-мишень в геноме растения представляет собой, по меньшей мере, один эндогенный ген или трансген, кодирующий, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак, выбранный из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к гербициду, при этом, устойчивость/толерантность к гербициду выбрана из группы, состоящей из устойчивости/толерантности к ингибиторам EPSPS, включая глифосат, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза глутамина, включая глюфосинат,

устойчивости/толерантности к ингибиторам ALS или AHAS, включая имидазолин или сульфонилмочевину, устойчивости/толерантности к ингибиторам ACCase, включая арилоксифеноксипропионат (FOP), устойчивости/толерантности к ингибиторам биосинтеза каротиноидов, включая ингибиторы биосинтеза каротиноидов на этапе фитоендесатуразы, ингибиторы 4-гидроксифенил-пируват-диоксигеназы (HPPD), или ингибиторы других мишеней биосинтеза каротиноидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам целлюлозы, устойчивости/толерантности к ингибиторам синтеза липидов, устойчивости/толерантности к ингибиторам длинноцепочечной жирной кислоты, устойчивости/толерантности к ингибиторам сборки микротрубочек, устойчивости/толерантности к диверторам электронов фотосистемы I, устойчивости/толерантности к ингибиторам фотосистемы II, включая карбамат, триазины и триазины, устойчивости/толерантности к ингибиторам PPO и устойчивости/толерантности к синтетическим ауксинам, включая дикамбу (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота).

74. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой признак фитотоксической устойчивости/толерантности, предпочтительно признак устойчивости/толерантности к гербициду, и, при этом, по меньшей мере, один первый целенаправленный сдвиг рамки или модификация делеции в первом сайте-мишени в геноме растения, по меньшей мере, одной растительной клетки, подлежащей модификации, придает устойчивость/толерантность к фитотоксическому соединению, предпочтительно к гербициду, причем указанное соединение представляет собой экзогенное соединение, подлежащее добавлению к, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетке, ткани, органу или целому растению, или к его потомству.

75. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой видимый фенотип, который подходит для идентификации или выделения, по меньшей мере, одной модифицированной растительной клетки, ткани, органа или целого растения.

76. Способ по пункту 75, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой гляцевый фенотип.

77. Способ по пункту 75, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой золотой фенотип.

78. Способ по пункту 75, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой фенотип пигментации.

79. Способ по пункту 75, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один фенотипически селективируемый признак представляет собой фенотип преимущества роста.

80. Способ по пункту 63, отличающийся тем, что, по меньшей мере, одна растительная клетка, подлежащая модификации, предпочтительно получена из растения, выбранного из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium*

distachyon, *Hordeum marimum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta* spp., включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Marus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine nexuosa*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmarabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncacea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria* subsp. *sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium* sp., *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum* или из любого сорта, или подвида, принадлежащего к одному из вышеупомянутых растений.

81. Растительная клетка, ткань, орган, материал или целое растение, или их потомство, получаемое способом по пункту 1.

82. Растительная клетка, ткань, орган, материал или целое растение, или их потомство, получаемое способом по пункту 47.

83. Растительная клетка, ткань, орган, материал или целое растение, или их потомство, получаемое способом по пункту 63.

84. Способ генерирования генетически модифицированного растения путем редактирования генома, содержащий этапы:

а) предложения клеток или тканей растения, подлежащих генетической модификации;

б) предложения первой системы редактирования генома и второй системы редактирования генома, при этом, первая система редактирования генома может нацеливаться и модифицировать селективируемый маркерный ген растения, а вторая система модификации генома может нацеливаться и модифицировать интересующий ген растения;

с) совместной трансформации клеток или тканей с помощью первой и второй систем редактирования генома;

d) регенерации растений из указанных трансформированных клеток или тканей, предпочтительно без селективного давления;

е) селекции растений, в которых селектируемый маркерный ген был модифицирован из растений, регенерированных на этапе d); и

ф) идентификации растения, ген-мишень которого модифицирован из растений, выбранных на этапе е).

85. Способ по пункту 84, в котором система редактирования генома выбрана из системы точного редактора основания (PBE), системы CRISPR-Cas9, системы CRISPR-Cpf1, системы CRISPRi, системы цинк-пальцевых нуклеаз и системы TALEN.

86. Способ по пункту 84, в котором модификация селективируемого маркерного гена приводит к появлению селективируемого признака в растении, предпочтительно модификация селективируемого маркерного гена не изменяет других признаков растения.

87. Способ по пункту 86, в котором селектируемый признак представляет собой устойчивость к гербицидам.

88. Способ по пункту 87, в котором селектируемый маркерный ген выбран из группы, состоящей из sbA, ALS, EPSPS, ACCase, PPO, HPPD, PDS, GS, DOXPS и P450.

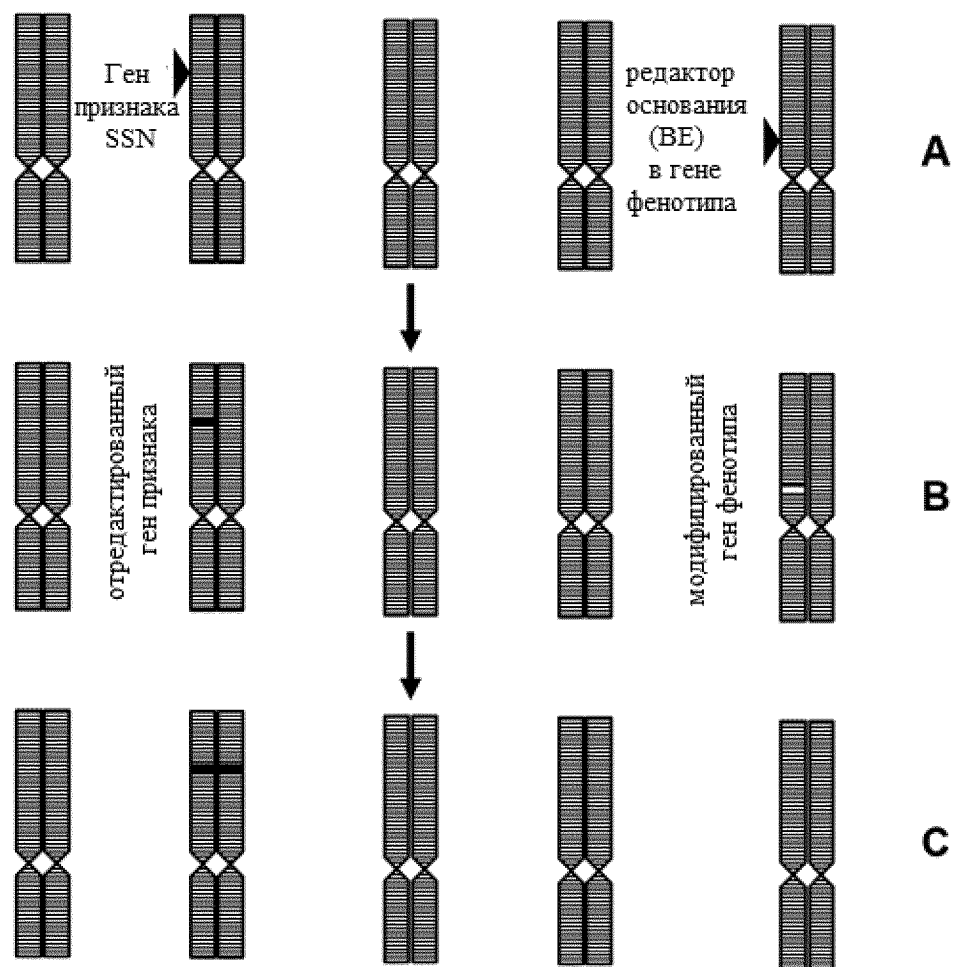
89. Способ по пункту 86, в котором селектируемый признак представляет собой визуально наблюдаемый признак, такой как, лигула, цвет листьев, воск листьев.

90. Способ по пункту 87, в котором селектируемый маркерный ген выбран из группы, состоящей из *LIG*, *PDS*, *zb7* и *GL2*.

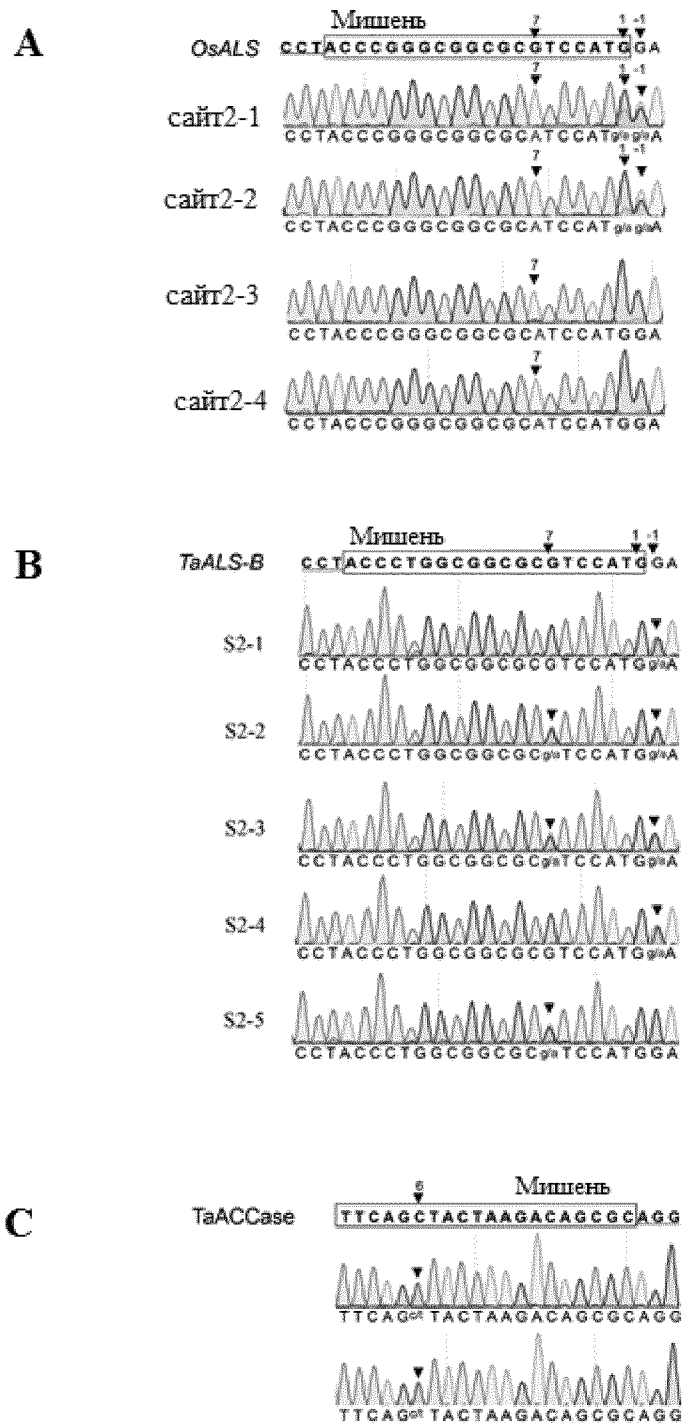
91. Способ по любому из пунктов 84-90, в котором первая и вторая системы редактирования генома представляют собой систему точного редактора основания (РВЕ).

92. Способ по любому из пунктов 84-91, в котором растение выбрано из группы, состоящей из *Hordeum vulgare*, *Hordeum bulbosum*, *Sorghum bicolor*, *Saccharum officinarum*, *Zea spp.*, включая *Zea mays*, *Setaria italica*, *Oryza minuta*, *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, *Oryza alta*, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Secale cereale*, *Triticale*, *Malus domestica*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum marinum*, *Aegilops tauschii*, *Daucus glochidiatus*, *Beta spp.*, включая *Beta vulgaris*, *Daucus pusillus*, *Daucus muricatus*, *Daucus carota*, *Eucalyptus grandis*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tomentosiformis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Coffea canephora*, *Vitis vinifera*, *Erythrante guttata*, *Genlisea aurea*, *Cucumis sativus*, *Morus notabilis*, *Arabidopsis arenosa*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Crucihimalaya himalaica*, *Crucihimalaya wallichii*, *Cardamine hirsuta*, *Lepidium virginicum*, *Capsella bursa pastoris*, *Olmabidopsis pumila*, *Arabis hirsute*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Raphanus sativus*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Eruca vesicaria subsp. sativa*, *Citrus sinensis*, *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *Cicer yamashitae*, *Cicer bijugum*, *Cicer arietinum*, *Cicer reticulatum*, *Cicer judaicum*, *Cajanus cajanifolius*, *Cajanus scarabaeoides*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Gossypium sp.*, *Astragalus sinicus*, *Lotus japonicas*, *Torenia fournieri*, *Allium cepa*, *Allium fistulosum*, *Allium sativum*, *Helianthus annuus*, *Helianthus tuberosus* и *Allium tuberosum*, или из любого сорта, или подвида, принадлежащего одному из вышеупомянутых растений.

93. Генетически модифицированное растение, получаемое способом по пункту 84, предпочтительно указанное генетически модифицированное растение не является трансгенным.

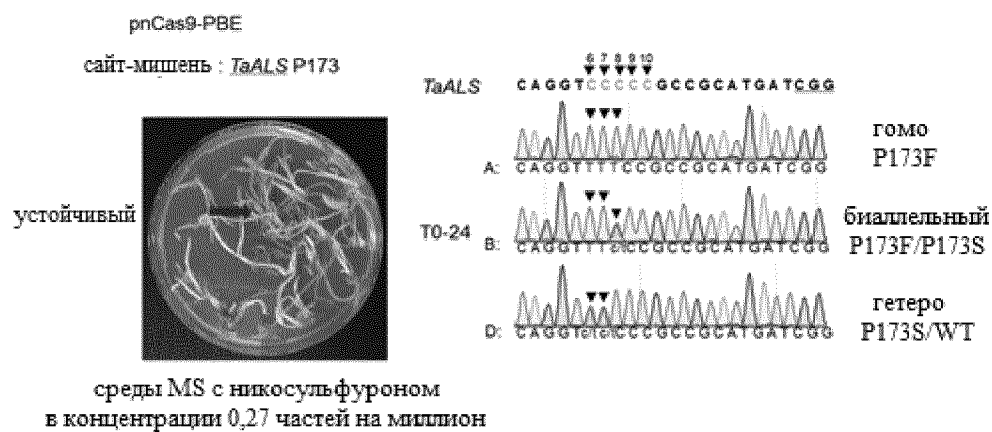


Фиг. 1



Фиг. 2

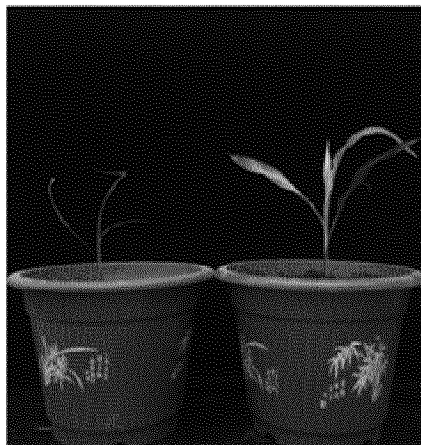
Генерирование пшеницы, устойчивой к сульфонилмочевине



Фиг. 3

Генерирование кукурузы, устойчивой к сульфонилмочевине

чувствительный устойчивый



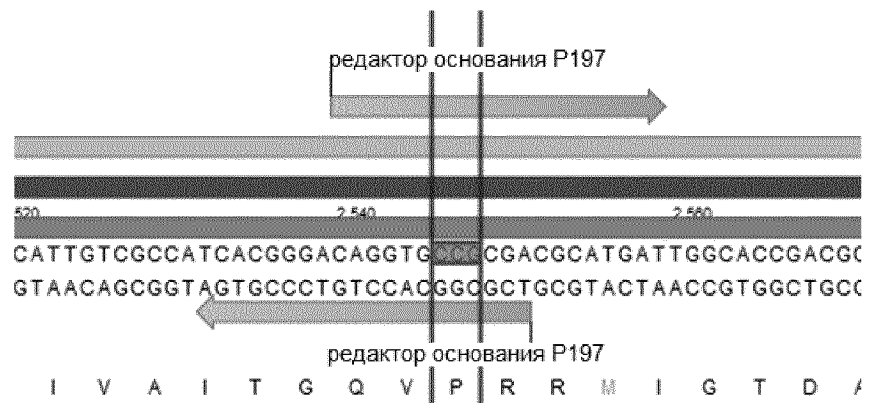
опрыскивали мезосульфурон-метилом
в концентрации 150 частей на миллион

ZmALS1	6.7	P165L	гомо
ZmALS2	7/WT	P165L/-	гетеро

Фиг. 4

A

ALS1 и 2

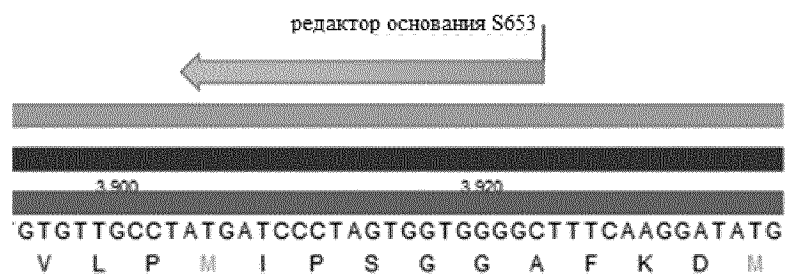


Эффективное преобразование в TCG (Ser), CTG (Leu), TTG (Leu)

Группы гербицидов: - Имидазолиноны, сульфонилмочевины и другие

B

ALS1 и 2

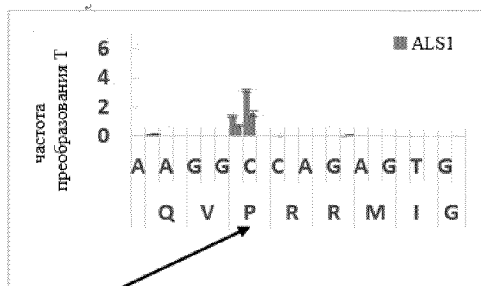


Желаемое преобразование в AAT (Asn)

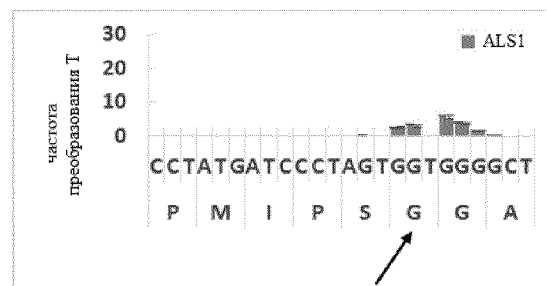
Группы гербицидов: -

Фиг. 5

Промотор Pol III для sgРНК

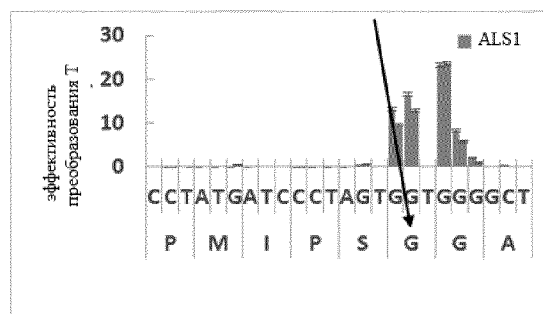
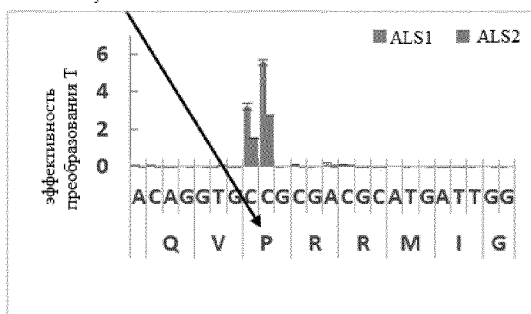


преобразование в серин или лейцин придает устойчивость



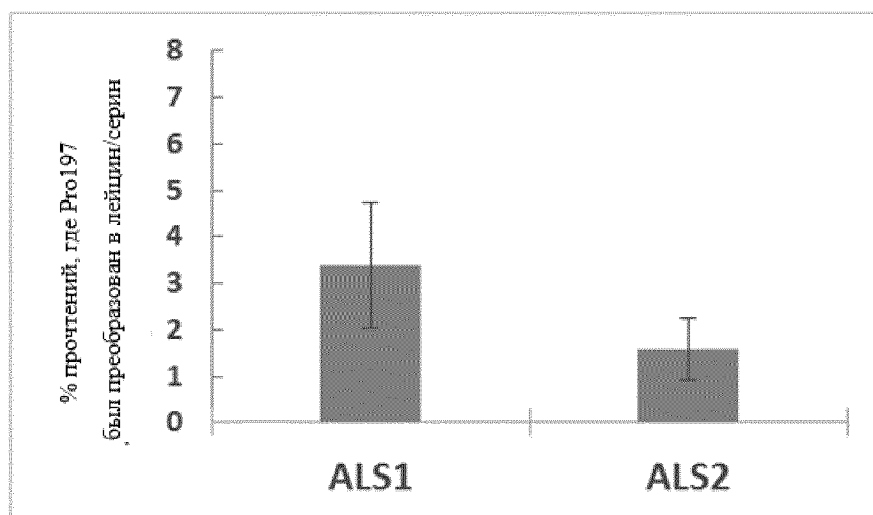
преобразование в аспарагиновую кислоту придает устойчивость

Промотор Pol II для sgРНК (с рибозимами)

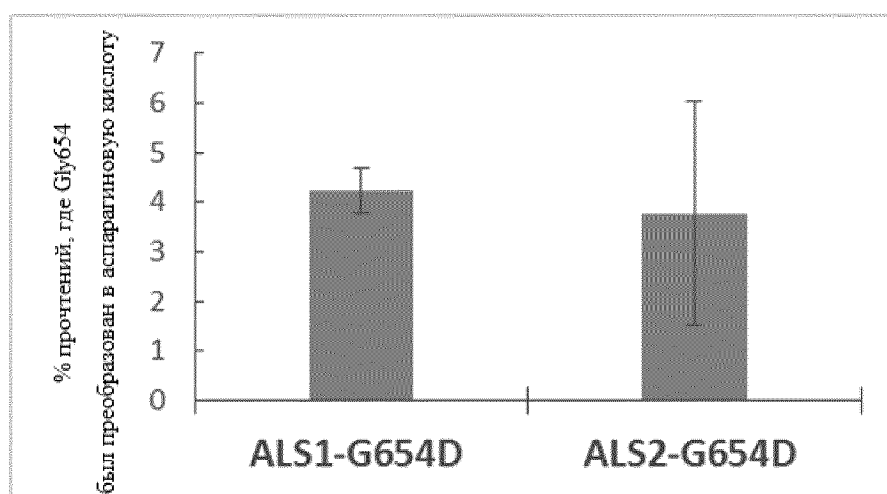
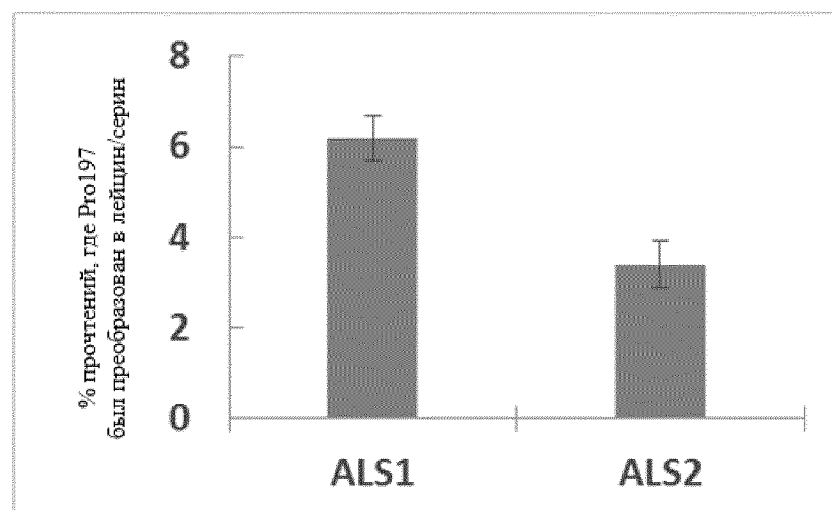


Фиг. 6

Промотор Pol III для sgРНК



Промотор Pol II для sgРНК (с рибозимами)



Фиг. 7