

ÖZET

İMİDAZOLİNON HERBİSİTLERİNE KARŞI DİRENCİ ARTTIRILMIŞ BUĞDAY BİTKİLERİ

5

Bu buluş bir imidazolinon herbisite direnci arttırılmış buğday bitkilerine ilişkindir. Daha özel olarak bu buluş Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 ve Madsen IMI kùltivar gibi bir veya daha fazla IMI nükleik asit içeren buğday bitkilerini kapsar. Bu buluş ayrıca bu buğday bitkileri tarafından üretilen tohumlarve bu buğday bitkilerinin civarındaki zararlıotlarıkontrol etmek için yöntemleri kapsar.

10

İSTEMLER

1. Bir buğday bitkisinin yetiştirilmesine yönelik yöntem olup, burada bitki, nükleotit sekanslarına sahip iki adet mutajenize Triticum AHAS nükleik asidini içermektedir, burada 5 buğday bitkisi, bitkinin bir yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artmış dirence sahiptir, burada iki adet mutajenize AHAS nükleik asitleri aşağıdakilerden seçilmektedir:

(i) SEK KİM NO:3'ü içeren bir polinükleotit ve SEK KİM NO:1'i içeren bir polinükleotitin 10 bir kombinasyonu,

(ii) SEK KİM NO:1'i içeren bir polinükleotitin bir kombinasyonu ve SEK KİM NO:5'i içeren bir polinükleotit,

(iii) SEK KİM NO:4'ü içeren bir AHAS proteinini kodlayan bir Triticum B genom polinükleotitinin bir kombinasyonu ve SEK KİM NO:2'yi içeren bir AHAS proteinini 15 kodlayan bir polinükleotit, ve

(iv) SEK KİM NO:6'yı içeren bir AHAS proteinini kodlayan bir Triticum B genom polinükleotitin bir kombinasyonu ve SEK KİM NO:2'yi içeren bir AHAS proteinini kodlayan bir polinükleotit.

20 burada yöntem ilave olarak bitki ve bunun etrafındaki otlara bir imidazolinon herbisitinin uygulanması içermektedir.

2. Bir buğday bitkisinin yetiştirilmesine yönelik yöntem olup, burada bitki, nükleotit sekanslarına sahip iki adet mutajenize Triticum B-genomu AHAS nükleik asidini içermektedir, 25 burada buğday bitkisi, bitkinin bir yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artmış dirence sahiptir, burada mutajenize Triticum B-genomu AHAS nükleik asitleri aşağıdakilerden meydana gelen grup içerisinde seçilmektedir:

a) SEK KİM NO:3'ü içeren polinükleotitler;

b) SEK KİM NO:5'i içeren polinükleotitler;

c) SEK KİM NO:4'ü içeren AHAS proteini kodlayan bir *Triticum* B-genom polinükleotit; veya

d) SEK KİM NO:6'yı içeren bir AHAS proteini kodlayan bir *Triticum* B-genom polinükleotit,

burada yöntem ilave olarak bitki ve bunun etrafındaki otlara bir imidazolinon herbisitinin uygulanması gerekmektedir.

3. (Güncel olarak değiştirilmiştir) Bir buğday bitkisinin yetiştirilmesi için bir yöntem,

burada bitki, bitkinin yabani tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine artı direnç sahiptir, ve burada bitki SEK KİM NO:4 veya SEK KİM NO:6'dan herhangi birinin tüm amino asit sekansıyla en azından %90 aynı olan bir IMI polipeptitini kodlayan bir Triticum aestivum B- genom imidazolinon toleransı allele (Imi2) nükleik asidini içermektedir; burada Imi2 nükleik asidi yabani tip AHAS proteinine kıyasla ilişkili IMI proteininde serinden asparagine ikameyle sonuçlanan Alan E'de mutasyonu içermektedir, yöntem ilave olarak bitki ve bunun etrafındaki otlara bir imidazolinon herbisitinin uygulanması gerekmektedir.

4. Imi2 nükleik asidinin SEK KİM NO:4 veya SEK KİM NO:6'dan herhangi birinin tüm amino asit sekansıyla en az %95 oranında aynı olan bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotit sekansı olduğu İstem 3'e göre yöntem.

5. Imi2 nükleik asidinin SEK KİM NO:4 veya SEK KİM NO:6'dan herhangi birinin tüm amino asit sekansıyla en az %99 oranında aynı olan bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotit sekansı olduğu İstem 3'e göre yöntem.

6. Imi2 nükleik asidinin SEK KİM NO:4 veya SEK KİM NO:6'dan herhangi birinin amino asit sekansı içeren bir polipeptiti kodlayan bir polinükleotit sekansı olduğu İstem 3'e göre yöntem.

7. Imi2 nükleik asidinin SEK KİM NO:3 veya SEK KİM NO:5'ten herhangi birinin sekansı içeren bir polinükleotiti içerdiği İstem 3'e göre yöntem.

TARİFNAME

İMİDAZOLİNON HERBİSİTLERİNE KARŞI DİRENCİ ARTTIRILMIŞ BUĞDAY BİTKİLERİ

5 İLİŞKİLİ BAŞVURULARA ÇAPRAZ REFERANS

Bu başvuru, başvurusu 9 Ağustos 2001'de yapılan US Geçici Başvurusu Seri No. 60/311,141'in rüçhan hakkını talep etmektedir.

10 TEKNİK ALAN

Bu buluş genel olarak imidazolinon herbisitlerine karşı direnci arttırılmış buğday bitkisinin büyütülmesine yönelik yöntemle ilgilidir.

15 BULUŞA DAİR BİLİNER HUSUSLAR

Asetohidroksiasit sentaz (AHAS; EC 4.1.3.18) dallanmış zincirli amino asitler valin, lösin ve izolösinin biyokimyasal sentezini katalizleyen ilk enzimdir (Singh B.K., 1999, Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, Singh B. K. (Der.) Plant amino acids içinde. Marcel Dekker Inc. New York, New York. s 227-247). AHAS sülfonilüreler (LaRossa RA ve Falco SC, 1984 Trends Biotechnol 2:158-161), imidazolinonlar (Shaner ve diğerleri, 1984 Plant Physiol 76:545-546), triazolopirimidinler (Subramanian ve Gerwick, 1989 Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines, (der) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology içinde. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. sayfa 277-288) ve pirimidiloksibenzoatlar (Subramanian ve diğerleri, 1990 Plant Physiol 94: 239-244) dahil olmak üzere yapısal olarak farklı dört herbisit familyasının etki yeridir. İmidazolinon ve sülfonilüre herbisitler modern tarımda, çok düşük uygulama oranlarında etkililikleri ve hayvanlarda nispeten toksik olmamaları nedeniyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu herbisit familyaları AHAS aktivitesini inhibe ederek, birçok zararlı ot türü de dahil olmak üzere 25 duyarlı bitkilerin daha fazla büyümesini ve gelişmesini önler. Piyasada bulunan imidazolinon herbisitlerinin bazı örnekleri PURSUIT® (imazetapir), SCEPTER® (imizakuin) ve 30

ARSENAL®'dir (imazapir). Sülfonilüre herbisitlerine örnekleri klorsulfuron, metsulfuron, metil, sulfometuron metil, klorimuron etil, tifensulfuron metil, tribenuron metil, bensulfuron metil, nikosulfuron, etametsulfuron metil, rimsulfuron, triflusulfuron metil, triasulfuron, primisulfuron metil, sinusulfuron, amidosulfuron, fluzasulfuron, imazosulfuron, pirazosulfuron etil ve halosulfuronudur.

Yüksek etkililikleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle imidazolinon herbisitleri geniş bir bitki örtüsü alanı üzerine püskürtmeyle uygulama için tercih edilir. Bir herbisit geniş bir bitki örtüsü alanı üzerine püskürtülebilmesi plantasyon kurma ve korumayla ilişkili maliyetleri azaltır ve bu kimyasalların kullanılmadan önce yerin hazırlanması ihtiyacını azaltır. İstenen bir toleranslı türün üstüne püskürtme aynı zamanda rakip türlerin yokluğuna bağlı olarak istenen türün maksimum verim potansiyeline ulaşma kabiliyetiyle sonuçlanır. Ancak bu üzerine püskürtme tekniklerinin kullanılabilmesi, püskürtme yapılan alanda istenen bitki örtüsünün imidazolinona dirençli türlerinin varlığına bağlıdır.

Başlıca tarımsal ürünler arasında, soya fasulyesi gibi bazı baklagil türleri herbisit bileşiklerini hızla metabolize etme kabiliyetlerine bağlı olarak imidazolinon herbisitlerine doğal olarak dirençlidir (Shaner ve Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471). MSU (Newhouse ve diğerleri, 1992 Plant Physiol. 100:882-886) ve pirinç (Barette ve diğerleri, 1989 Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, sayfa 195-220) gibi başka ürünler imidazolinon herbisitlerine biraz daha duyarlıdır. İmidazolinon herbisitlere karşı duyarlılığın farklı olması, spesifik herbisit kimyasal yapısına ve her bitkide bileşiğin toksik bir formdan toksik olmayan bir forma metabolizmasının farklı olmasıyla bağlıdır (Shaner ve diğerleri, 1984, Plant Physiol. 76:545-546; Brown ve diğerleri, 1987 Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Absorpsiyon ve translokasyon gibi başka bitki fizyolojik farkları da duyarlılıkta önemli bir rol oynar (Shaner ve Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471).

İmidazolinonlar, sülfonilüreler ve triazolopirimidinlere dirençli kültürler (zirai yöntemlerle elde edilen yeni bitki türü), *Zea mays* (MSU), *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max* ve *Nicotiana tabacum*'da tohum, mikrospor, polen ve kallus mutagenesi kullanılarak başarıyla üretilmiştir (Sebastian ve diğerleri, 1989 Crop Sci. 29:1403-1408; Swanson ve diğerleri, 1989 Theor. Appl. Genet. 78:525-530; Newhouse ve diğerleri, 1991 Theor. Appl. Genet. 83:65-70; Sathasivan ve diğerleri, 1991 Plant Physiol. 97:1044-1050, Mourand ve diğerleri,

1993 J. Heredity 84:91-96). Her durumda tek bir, kısımlen baskın nükleer gen direnç Verdi. İmidazolinona dirençli dört buğday bitkisi de daha önce *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse ve diğerleri, 1992 Plant Physiol. 100:882-886) tohum mutagenезinin ardından izole edildi. Kalın çalışmalar tek bir, kısımlen baskın genin direnç verdiğini teyit etti. Alelik çalışmalar temelinde, araştırmacılar tanımlanan dört hattaki mutasyonların aynı lokusta bulunduğu sonucuna vardılar. Fidel kültürü direnç genlerinin biri FS-4 olarak adlandırıldı (Newhouse ve diğerleri, 1992 Plant Physiol. 100:882-886).

AHAS-inhibitör kompleksinin üç boyutlu konformasyonunun bilgisayar temelli modellemesi, indüklenen mutasyonların muhtemelen imidazolinonlara yönelik seçici direnç sağlayacağı yerler olarak önerilen inhibitör bağlama cebinde çeşitli amino asitleri ön görmektedir (Ott ve diğerleri, 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368). AHAS enziminin önerilen bağlama yerlerinde rasyonel olarak tasarlanan bu mutasyonların bazılarıyla üretilen buğday bitkileri aslında herbisitlerin tek bir sınıfına yönelik spesifik direnç gösterdi (Ott ve diğerleri, 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368).

İmidazolinon herbisitlere karşı bitki direnci bir dizi patentte de bildirilmiştir. ABD Patentleri No. 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 ve 6,222,100'de genel olarak bitkilerde herbisit direncine yol açmak için değiştirilmiş bir AHAS geninin kullanılması açıklanmakta ve spesifik olarak bazı imidazolinona dirençli mışhatlar ele alınmaktadır ABD Patenti No. 5,013,659'da bir veya daha fazla korunmuş bölgede en az bir amino asitte herbisit direncine sahip mutasyonlar gösteren bitkiler açıklanmaktadır Orada açıklanan mutasyonlar ya imidazolinonlar ve sülfonilüreler için çapraz direnci veya sülfonilüreye spesifik direnci kodlamaktadır ama imidazolinona spesifik direnç açıklanmamaktadır Ayrıca ABD Patenti No. 5,731,180 ve ABD Patenti No. 5,767,361'de yabancı tip bir tek çenekli bitki AHAS amino asit dizisinde imidazolinona spesifik dirençle sonuçlanan tek bir amino asit substitüsyonuna sahip izole edilmiş bir gen ele alınmaktadır

Bugüne kadar, önceki teknikte birden fazla değiştirilmiş AHAS geni içeren imidazolinona dirençli buğday bitkileri açıklanmamıştır Önceki teknikte FS-4 geninin türediği genomdan başka genomlar üzerinde mutasyonlar içeren imidazolinona dirençli buğday bitkileri de açıklanmamaktadır Bu nedenle, bu alanda ihtiyaç duyulan şey, ek genomlardan imidazolinona dirençli genlerin saptanmasıdır Ayrıca bu alanda imidazolinon gibi herbisitlere

direnci arttırmış ve birden fazla değiştirilmiş AHAS geni içeren buğday bitkilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu buğday bitkilerinin civarında zararlı ot büyümesini kontrol etmek için yöntemlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bileşimler ve yöntemler buğday bitkileri içeren alanlara herbisitler uygulanırken üzerine püskürtme tekniklerinin kullanılması izin verecektir.

5

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş bir buğday bitkisinin yetiştirilmesine yönelik yöntemi sağlamaktadır burada bitki farklı nükleotit dizilerine sahip mutajenize Triticum AHAS nükleik asitlerini içermektedir, burada buğday bitkisi bitkinin yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine artırmış direnci içermektedir, burada iki adet mutajenize AHAS nükleik asit aşağıdakilerden seçilmektedir:

10

(i) SEK KİMLİK NUMARASI:1'i içeren bir polinükleotitin ve SEKANS KİMLİK NO:3'ü içeren bir polinükleotitin kombinasyonu,

15

(ii) SEK KİMLİK NUMARASI:1'i içeren bir polinükleotitin ve SEKANS KİMLİK NO:1'i içeren bir polinükleotitin kombinasyonu,

(iii) SEK KİMLİK NUMARASI:4'ü içeren bir AHAS proteini kodlayan Triticum B genom polinükleotitin bir kombinasyonu, ve SEK KİMLİK NUMARASI:2'yi içeren bir AHAS proteini içeren bir polinükleotit, ve

20

(iv) SEK KİMLİK NUMARASI:6'yı içeren bir AHAS proteini kodlayan bir Triticum B genom polinükleotitin kombinasyonu, ve SEKANS KİMLİK NO:2'y içeren bir AHAS proteinini kodlayan bir polinükleotit;

yöntem ilave olarak bitkiye ve bitkinin yakınındaki otlara bir imidazolinon herbisitinin uygulanmasını içermektedir.

25

İlave olarak mevcut buluş bir buğday bitkisinin yetiştirilmesi için bir yöntemi sağlamaktadır burada bitki mutajenize edilmiş bir *Triticum* B-genom AHAS nükleik asidini içermektedir, burada bitki yabancı tip bitki çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artırmış dirence sahiptir ve burada mutajenize *Triticum* B-genom AHAS nükleik asidi aşağıdakilerden meydana gelen grup içerisinde seçilmektedir:

30

a) SEKANS KİMLİK NO:3'ü içeren polynükleotitler;

b) SEKANS KİMLİK NO:5'i içeren polynükleotitler;

- c) SEK KİMLİK NUMARASI:4'ü içeren bir AHAS proteini kodlayan Triticum B genom polinükleotiti; veya
d) SEK KİMLİK NUMARASI:6'yı içeren bir AHAS proteini kodlayan Triticum B genom polinükleotiti; veya

5

yöntem buğday bitkisine ve bunun çevresindeki otalara bir imidazolinon herbisitinin uygulanması ilave olarak içermektedir.

Yine ilave olarak, buluş bir buğday bitkisinin büyütülmesi için bir yöntemi sağlamaktadır burada bitki bitkinin yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine artan direnç sahiptir ve burada bitki SEK KİM NO:4 veya SEK KİM NO:6'dan herhangi birinin tüm amino asit sekansıyla en azından %90 aynı olan bir IMI polipeptidini kodlayan bir Triticum aestivum B- genom imidazolinon toleransı Als allel (Imi2) nükleik asidini içermektedir, burada Imi2 nükleik asidi, bir yabancı tip AHAS proteini ile kıyaslandığında ilişkili IMI proteininde bir serinden asparagin ikamesi ile sonuçlanan bir Alan E'deki mutasyonu içermektedir, yöntem ilave olarak bitki ve bitkinin etrafındaki otlara bir imidazolinon herbisitinin uygulanması içermektedir.

İlave olarak burada bitkinin içindeki bir IMI nükleik asidin ekspresyonunun modifiye edilmesini içeren bir imidazolinon herbisitine bitkinin toleransı değiştirilmesine yönelik yöntemler açıklanmaktadır. Ayrıca bir imidazolinon herbisitine toleransı artırılmış transgenik bir bitki üretmek için, bir bitki hücresinin bir veya daha fazla IMI nükleik asit içeren bir ekspresyon vektörüyle dönüştürülmesini ve bitki hücrelerinden bitkinin üretilmesini içeren yöntemler açıklanmaktadır. Buluş ayrıca bir buğday bitkisinin civarındaki zararlı otları kontrol altına almak için, zararlı otlara ve buğday bitkisine bir imidazolinon herbisitinin uygulanması içeren bir yöntem açıklanmakta olup, burada buğday bitkisinin imidazolinon herbisitine karşı direnci buğday bitkisinin yabancı tip bir çeşidine kıyasla artırılmıştır ve burada bitki bir veya daha fazla IMI nükleik asit içermektedir, bu yöntemlerde, bitkiler farklı buğday genomları üzerinde bulunan birden fazla IMI nükleik asit içerebilmektedir.

30

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1A-B’de Gunner IMI1 205’in (SEKANS KİMLİK NO:1) kısmi cDNA dizisi ve bunun kısmi çıkarılmış amino asit dizisi (SEKANS KİMLİK NO:2) gösterilmektedir.

Şekil 2A-B’de Gunner IMI2 208’in (SEKANS KİMLİK NO:3) kısmi cDNA dizisi ve bunun kısmi çıkarılmış amino asit dizisi (SEKANS KİMLİK NO:4) gösterilmektedir.

- 5 Şekil 3A-B’de Madsen IMI2’nin (SEKANS KİMLİK NO:5) kısmi cDNA dizisi ve bunun kısmi çıkarılmış amino asit dizisi (SEKANS KİMLİK NO:6) gösterilmektedir.

Şekil 4 çeşitli AHAS inhibitörlerine karşı dirençte rol oynayan AHAS genlerindeki korunmuş amino asit dizilerinin şematik bir temsildir. Dirençten sorumlu spesifik amino asit yeri bir alt çizgiyle gösterilmektedir. (Devine, M. D. ve Eberlein, C. V., 1997 Physiological, biochemical
10 and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites in Herbicide Activity: Toxicity, Biochemistry, and Molecular Biology, IOS Press Amsterdam, s. 159-185’ten değiştirilmiştir).

Şekil 5A-C yabani tip buğday (Gunner çeşidi), AP205CL (Şekil 5A), AP602CL (Şekil 5B) ve Madsen1’de (Şekil 5C) imidazolinon herbisit imazamoks tarafından AHAS enzim aktivitesinin
15 inhibisyonunu gösteren tablolar yer almaktadır. Değerler inhibe olmama aktivite yüzdesi olarak ifade edilmektedir.

Şekil 6 bir Teal buğday kontrolüne kıyasla imazamoksyla Madsen1’deki azalan hasarı gösteren bir tablodur.

Şekil 7A-B yabani tip buğday (Gunner çeşidi), AP205CL (Şekil 7A) ve AP602CL’de (Şekil 7B)
20 lösin ve valinle AHAS enzim aktivitesinin geri besleme inhibisyonunu gösteren tablolardır.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Mevcut buluş istemlerde tanımlandığı şekilde buğday bitkilerinin yetiştirilmesi ve bitkinin
25 etrafındaki otların kontrol edilmesine yönelik yöntemlerle ilgilidir.

Bu tarifnamede ve istemlerde “bir”in kullanıldığı bağlama bağlanarak bir veya daha fazla anlamda gelebileceği takdir edilecektir. Dolayısıyla örneğin “bir hücre”den söz edildiğinde bu en az bir hücrenin kullanılabileceği anlamda gelebilir.

30 Burada “buğday bitkisi” terimi *Triticum* cinsinin bir üyesi olan bir bitkiyi belirtmektedir. Bu buluşun buğday bitkileri sınırlanmamak koşuluyla *T. aestivum*, *T. turgidum*, *T.*

timopheevii, *T. monococcum*, *T. zhukovskyi* ve *T. urartu* ve bunların hibritleri de dahil olmak üzere *Triticum* cinsinin üyeleri olabilir. *T. aestivum* alt türünün örnekleri arasında bu buluşta *aestivum* (ekmeklik buğday), *compactum* (topbaş buğday), *macha* (macha buğday), *vavilovi* (vavilovi buğday), *spelta* ve *sphaerococcum* (kavuzlu buğday) yer alır. *T. turgidum* alt türünün örnekleri arasında bu buluşta *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*, *durum*, *paleocolchicum*, *polonicum*, *turanicum* ve *dicoccoides* yer alır. Bu buluşa dahil edilen *T. monococcum* alt türünün örnekleri *monococcum* (einkorn) ve *aegilopoides*'tir. Bu buluşun bir düzenlemesinde, buğday bitkisi *Triticum aestivum* L türünün bir üyesidir ve daha özel olarak bir Gunner veya Madsen kültürüdür.

"Buğday bitkisi" teriminin herhangi bir olgunluk veya gelişim aşamasındaki buğday bitkilerinin herhangi bir kısmı bağlam açığa tersini işaret etmedikçe bu tür herhangi bir bitkiden alınan veya elde edilen dokular veya organlar (bitki bölümleri) kapsamını hedeflenmektedir. Bitki bölümleri arasında sınırlanmamak koşuluyla, gövdeler, kökler, çiçekler, ovüller, stamenler, yapraklar, oğlucuklar, meristematik bölgeler, kallus dokusu, başçık kültürleri, gametofitler, sporofitler, polen, mikrosporlar, protoplastlar ve benzeri yer alır.

Burada ayrıca, burada çözünen buğday bitkileri tarafından üretilen tohumlar da anlatılmaktadır. Tohumlar buğday bitkisi tohumunun yabancı tip bir çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisit direnci arttırmak için saf tür olabilmektedir.

Mevcut doküman bir ya da daha fazla IMI nükleik asit içeren bir buğday bitkisini açıklamakta olup, burada buğday bitkisinin bir imidazolinon herbisitine direnci bitkinin bir yabancı tip çeşidine kıyasla arttırılmıştır. Burada "IMI nükleik asit" terimi içinde transkripsiyona tabi tutulduğu bir bitkiye daha yüksek imidazolinon direnci veren bir yabancı tip buğday bitkisindeki bir AHAS nükleik asitten mutasyona uğramış bir nükleik asidi belirtmektedir. Buğday bitkisi birden çok IMI nükleik asidini içerebilmektedir. Burada IMI nükleik asitlere ilişkin olarak "birden fazla" terimi, farklı nükleotit dizilerine sahip IMI nükleik asitleri belirtmekte olup, sadece aynı IMI nükleik asidin sayısındaki bir artış belirtmemektedir. Örneğin IMI nükleik asitler farklı buğday genomlarından elde edilmeleri veya farklı buğday genomları üzerinde bulunmaları nedeniyle farklı olabilirler.

Buğday bitkilerinin farklı genomlardan birden fazla IMI nükleik aside sahip olmaları mümkündür, çünkü bu bitkiler birden fazla genom içerebilir. Örneğin bir *Triticum aestivum*

buğday bitkisi bazen A, B ve D genomları olarak geçen üç genom içerir. AHAS gerekli olan bir metabolik enzim olduğu için, her genomun, eşlenmiş heksaploit buğdayda başka metabolik enzimlerle birlikte yaygın olarak görülen, AHAS enzimini kodlayan en az bir gene sahip olduğu varsayılmaktadır. Her genom üzerindeki AHAS nükleik asit, nükleotit dizisiyle başka bir genom üzerindeki bir AHAS nükleik asitten farklı olabilir ve genellikle farklıdır. Bu alanda uzman olanlar, bu alanda uzman olanlar tarafından bilinen ve ayrıca aşağıda Örnek 2’de açıklanan genetik melezleme ve/veya dizileme yöntemleri veya eksonükleaz sindirim yöntemleri yoluyla her AHAS nükleik asidin kaynak genomunu belirleyebilirler. Bu dokümanın amaçları için, A, B veya D genomlarından birinden elde edilen IMI nükleik asitler Imi1, Imi2 veya Imi3 nükleik asitler olarak ayrı edilir ve adlandırılır. Burada herhangi bir spesifik Imi nükleik asit herhangi bir spesifik A, B veya D genomuyla bağlantılı olduğu söylenmiyor. Örneğin Imi1 nükleik asitlerin A genomu nükleik asitlerle bağlantılı olduğu, Imi2 nükleik asitlerin B genomu nükleik asitlerle bağlantılı olduğu ve benzeri söylenmiyor. Imi1, Imi2 ve Imi3 adlandırılmaları sadece bu tür her sınıfındaki IMI nükleik asitlerin bağimsiz bir şekilde ayrılmadığını, farklı sınıflardan iki IMI nükleik asidin ise bağimsiz bir şekilde ayrılmadığını ve dolayısıyla farklı buğday genomlarından elde edilebildiğini belirtmektedir.

Nükleik asitlerin Imi1 sınıfı Newhouse ve diğerleri (1992 Plant Physiol. 100:882-886) tarafından açıklandığı gibi FS-4 genini ve aşağıda ayrıntılı olarak açıklandığı gibi Gunner IMI1 205 genini içerir. Nükleik asitlerin Imi2 sınıfı aşağıda açıklanan Gunner IMI2 208 geni ve Madsen IMI2 genini içerir. Nükleik asitlerin Imi1 sınıfının üyeleri için gösterildiği gibi, her Imi sınıfı farklı buğday türlerinden üyeler içerebilir. Bu nedenle her Imi sınıfı nükleotit dizisi farklı olan ama yine de teknikte sınırdan vasıta sahip olanları bildiği kalitede çalışmalar kullanılarak aynı buğday genomundan kaynaklandığı veya aynı buğday genomu üzerinde bulunduğu belirlenen IMI nükleik asitler içerir.

Bu doğrultuda mevcut buluş bir veya daha fazla IMI nükleik asidini içeren istemlerde tanımlandığı şekilde bir buğday bitkisini kullanmaktadır, burada buğday bitkisi bitkinin yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artmış dirence sahiptir ve burada bir veya daha fazla IMI nükleik asidi, Imi1, Imi2 ve Imi3 nükleik asidinden meydana gelen gruptan seçilmiştir. Imi1 nükleik asidi SEK KİM NO:1’de gösterilen polinükleotit sekansı içermektedir ve Imi2 nükleik asidi SEK KİM NO:3 veya SEK KİM NO:5’te gösterilen polinükleotit sekansı içermektedir. Bir diğer yapılandırılarda bitki bir Imi3 nükleik asidini içermektedir.

Burada nükleik asitlere ilişkin olarak, “-den” terimi, belirli bir genom “üzerinde bulunan” veya belirli bir genomdan “elde edilen” bir nükleik asidi belirtmektedir. “Üzerinde bulunan” terimi o belirli genom içinde bulunan bir nükleik asidi belirtmektedir. Yine burada bir genomla ilişkili olarak “-den elde edilen” terimi o genomdan çıkarılan veya izole edilen bir nükleik asidi belirtmektedir. “İzole edilen” terimi aşağıda daha ayrıntılı olarak tanımlanmaktadır

Bir diğer yapılandırılmada buğday bitkisi bir IMI nükleik asit içerir, burada nükleik asit Imi1 olmayan bir nükleik asittir. “Imi1 olmayan” terimi, yukarıda açıklandığı gibi Imi1 sınıfına bir üyesi olmayan bir IMI nükleik asidine atıfta bulunulmaktadır. Imi1 olmayan nükleik asit örnekleri SEKANS KİMLİK NO:3 ve SEKANS KİMLİK NO:5’te gösterilen polinükleotit dizileridir. Bu doğrultuda tercih edilen bir yapılandırılmada buğday bitkisi SEKANS KİMLİK NO:3 ve SEKANS KİMLİK NO:5’te gösterilen polinükleotit dizilerini içeren IMI nükleik asidini içermektedir.

Mevcut buluş bir, iki, üç veya daha fazla IMI nükleik asidini içeren buğday bitkisini içermektedir, burada buğday bitkisi bitkinin yabani tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artmış dirence sahiptir. IMI nükleik asitleri, SEK KİM NO:1’in polinükleotitini içeren gruptan seçilen bir nükleotit sekansını içerebilmektedir; SEK KİM NO:3’ün bir polinükleotitini, SEK KİM NO:5’in polinükleotitini, SEK KİM NO:2’nin polipeptidini kodlayan bir polinükleotiti, SEK KİM NO:4’ün polipeptidini kodlayan bir polinükleotiti, SEK KİM NO:6’nın polipeptidini kodlayan bir polinükleotiti; yukarıda bahsedilen polinükleotitlerden herhangi birinin en az 60 ardışık nükleotitini içeren bir polinükleotiti ve yukarıda bahsedilen polinükleotitlerden herhangi birine tamamlayıcı olan bir polinükleotiti içerebilmektedir.

İmidazolinon herbisit sınıfına girmemek koşuluyla, PURSUIT® (imazetapir), CADRE® (imazapik), RAPTOR® (imazamoks), SCEPTER® (imazakuin), ASSERT® (imazetabenz), ARSENAL® (imazapir), yukarıda sözü edilen herbisitlerin herhangi birinin bir türevi veya yukarıda sözü edilen herbisitlerin iki veya daha fazlasının bir karışımı, örneğin imazapir/imazamoks (ODYSSEY®) arasından seçilebilir. Daha spesifik olarak, imidazolinon herbisit sınıfına girmemek koşuluyla 2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidiazolin-2-il)-nikotinik asit, 2-(4-izopropil)-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-3-kinolinkarboksilik asit, 5- etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-nikotinik asit, 2-(4-izopropil-4-metil-5- okso-2-imidazolin-2-il)-5-(metoksimetil)-nikotinik asit, 2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2- imidazolin-2-

il)-5-metilnikotinik asit ve bir metil 6-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-m-toluat ve metil 2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-p-toluat karışımı arasından seçilir. 5-etil-2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-nikotinik asit ve 2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-5-(metoksimetil)-nikotinik asidin kullanılması tercih edilir. 2-(4-izopropil-4-metil-5-okso-2-imidazolin-2-il)-5-(metoksimetil)-nikotinik asidin kullanılması özellikle tercih edilir.

Buğday bitkisi iki IMI nükleik asidini içerebilmektedir, burada nükleik asitler farklı buğday genomlarından elde edilir veya farklı buğday genomları üzerinde bulunur. Tercihen, iki nükleik asit bir Imi1 nükleik asit ve bir Imi2 nükleik asittir. Daha tercihen Imi1 nükleik asit SEKANS KİMLİK NO:1'in polinükleotit dizisini içermektedir ve Imi2 nükleik asit SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in polinükleotit dizisini içermektedir. Bir başka yapılandırılabilir buğday bitkisi bir IMI nükleik asidini içermektedir, burada nükleik asit SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in polinükleotit dizisini içermektedir.

Her bir nükleik asidin farklı bir genomdan olduğu üç ya da daha fazla IMI nükleik asitlerini de içerebileceği buğday bitkisi.

Buradaki bir veya birden fazla IMI nükleik asidi, çeşitli AHAS proteinleri arasında korunmuş olan bir alanda bir mutasyonu içeren bir amino asit dizisini kodlayabilmektedir. Bu korunmuş alanlar burada Alan A, Alan B, Alan C, Alan D ve Alan E olarak geçmektedir. Şekil 4'te bir AHAS proteindeki her alanın genel yeri gösterilmektedir. Alan A AITGQVPRRMIGT amino asit dizisini (SEKANS KİMLİK NO:7) içerir. Alan B amino asit dizisini QWED (SEKANS KİMLİK NO:8) içerir. Alan C VFAYPGGASMEIHQALTRS amino asit dizisini (SEKANS KİMLİK NO:9) içerir. Alan D AFQETP amino asit dizisini (SEKANS KİMLİK NO:10) içerir. Alan E IPSGG amino asit dizisini (SEKANS KİMLİK NO:11) içerir.

Ayrıca korunmuş alanlarda küçük değişiklikler olabileceği düşünülmektedir, örneğin serin alanı otu bitkilerinde, Alan E'deki serin kalıntısı bir alanın kalıntısıyla değiştirilir.

Bu doğrultuda, mevcut buluş Alan E'deki (SEKANS KİMLİK NO: 11) serin için asparajinin ikame edilmesi ile sonuçlanan Alan E içerisindeki mutasyona sahip bir amino asit sekansı kodlayan bir IMI nükleik asidini içeren İstem 3'e göre bir buğday bitkisini kullanmaktadır

- 5 Burada açıklanan buğday bitkileri transgenik buğday bitkileri veya transgenik olmayan buğday bitkileri olabilir. Burada "transgenik" terimi en az bir rekombinant polinükleotidin tamamı veya bir kısmı içeren herhangi bir bitki, bitki hücresi, kallus, bitki dokusu veya bitki bölümünü belirtmektedir. Birçok durumda, rekombinant polinükleotidin tamamı veya bir kısmı sonraki kuşaklara geçmesi için bir kromozom veya sabit bir kromozom dizisi içine
- 10 sabit bir şekilde katılır. Bu buluşun amaçları için "rekombinant polinükleotit" terimi genetik mühendisliğiyle değiştirilmiş, yeniden düzenlenmiş veya modifiye edilmiş bir polinükleotidi belirtir. Örnekler arasında herhangi bir klonlanmış polinükleotit veya heterolog dizilere bağlı veya birleşik polinükleotitler yer alır. "Rekombinant" terimi, polinükleotitlerin, kendiliğinden mutasyonlar gibi doğal olarak oluşan olaylardan veya seçici üretimin izlediği kendiliğinden
- 15 olmayan mutagenezden kaynaklanan değişikliklerini belirtmez. Kendiliğinden olmayan mutagenez ve seçici üretime bağlanarak ortaya çıkan mutasyonlar içeren bitkiler burada transgenik olmayan bitkiler olarak geçmektedir ve bu buluşa dahildir. Buğday bitkisinin transgenik olduğu ve birden fazla IMI nükleik asit içerdiği düzenlemelerde, nükleik asitler farklı genomlardan veya aynı genomdan elde edilebilir. Alternatif olarak, buğday bitkisinin
- 20 transgenik olmadığı ve birden fazla IMI nükleik asit içerdiği düzenlemelerde, nükleik asitler farklı genomlar üzerinde veya aynı genom üzerinde bulunur.

- Bir IMI nükleik asit içeren transgenik olmayan bir buğday bitkisi kültürü bir örneği ATCC'ye Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4213 olarak tevdi edilen ve burada Gunner IMI
- 25 205 buğday kültürü olarak adlandırılan bitki kültürü Gunner IMI 205 buğday kültürü bir Imi1 nükleik asit içerir. Gunner IMI1 205 genine karşı gelen kısmi nükleotit dizileri SEKANS KİMLİK NO:1'de gösterilmektedir.

- Bir IMI nükleik asit içeren transgenik olmayan bir buğday bitkisi kültürü başka bir örneği

30

ATCC'ye Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4214 olarak tevdi edilen ve burada Gunner IMI 208 buğday kültürü olarak adlandırılan bitki kültürü Gunner IMI 208 buğday kültürü bir

Imi2 nükleik asit içerir. Gunner IMI2 208 genine karşı gelen kısmi nükleotit dizisi SEKANS KİMLİK NO:2'de gösterilmektedir.

Bir IMI nükleik asit içeren transgenik olmayan bir buğday bitkisi kültürü yine başka bir örneği ATCC'ye Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4255 olarak tevdi edilen ve burada Madsen IMI buğday kültürü olarak adlandırılan bitki kültürü Madsen IMI buğday kültürü bir Imi2 nükleik asit içerir. Madsen IMI2 genine karşı gelen kısmi nükleotit dizisi SEKANS KİMLİK NO:5'te gösterilmektedir.

Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 ve Madsen IMI buğday kültürleri 2500 tohumu American Type Culture Collection, Manassas, Virginia'ya 9 Nisan 2002'de (Gunner IMI 205 ve Gunner IMI 208) ve 1 Mayıs 2002'de (Madsen IMI) ayrı ayrı tevdi edildi. Bu tevdiat mikroorganizmaların tevdi edilmesine ilişkin Budapeşte Anlaşması koşulları uygun olarak yapıldı. Tevdiatlar en az otuz yıl bir süre için ve ATCC tarafından alınan tevdiat bir numunesinin sunulması için en son talepten en az beş yıl sonra yapıldı. Tevdi edilen tohumlara Patent Tevdiat Tahsis Numaraları PTA-4213 (Gunner IMI 205), PTA-4214 (Gunner IMI 208) ve PTA-zzzz (Madsen IMI) verildi.

Bu buluş Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4213, PTA-4214 veya PTA-4255 olan bir buğday bitkisini; Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4213, PTA-4214 veya PTA-4255 olan bitkinin bir mutant, rekombinant veya genetik mühendisliğiyle elde edilen bir türevini; Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA-4213, PTA-4214 veya PTA-4255 olan bitkinin herhangi bir dölünü; ve bu bitkilerin herhangi birinin dölü olan bir bitkiyi içermektedir. Buğday bitkisi ayrıca Patent Tevdiat Tahsis Numarası PTA- 4213, PTA-4214 veya PTA-4255 olan bitkinin herbisit direnci özelliklerine sahip olabilmektedir.

Ayrıca burada açıklanan Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 veya Madsen IMI buğday kültürleri ve başka bir buğday kültürü hibritleri de dahildir. Diğer buğday kültürü sınırlanmamak koşuluyla *T. aestivum* L. cv Fidel ve bir mutant gen FS-1, FS-2, FS-3 veya FS-4 barındıran herhangi bir buğday kültürü olabilir. (US Patenti No. 6,339,184 ve US Patent Başvurusu No. 08/474,832'ye bakınız). Tercih edilen hibritler Imi1, Imi2 ve/veya Imi3 nükleik asitlerin bir kombinasyonunu içerir. Tercih edilen hibritlerin örnekleri Gunner IMI

205/Gunner IMI 208 hibritleridir. Gunner IMI 205/Gunner IMI 208 hibritleri bir Imi1 nükleik asit ve bir Imi2 nükleik asit içerir.

“Kültivar” ve “çeşit” terimleri bir tür içindeki, bu alanda uzman olanlar tarafından bir kültivar veya çeşidi başka bir kültivar veya çeşitten ayrılmak için yeterli olduğu kabul edilen bir ortak özellikler veya nitelikler kümesini paylaşmakla tanımlanan bir grup bitkiyi belirtmektedir. Terimlerin ikisinde de herhangi bir belirli kültivar veya çeşide dahil bütün bitkilerin tam gen veya molekül seviyesinde genetik olarak ayrılabileceği veya herhangi bir belirli bitkinin bütün lokuslarda homozigöz olabileceği dair bir ima yoktur. Bir kültivar veya çeşit, saf tür kültivar veya çeşit kendine kendine polinasyon yapıldığında, bütün döl belirli bir özelliği içeriyorsa, o özellik için “saf tür” kabul edilir. Mevcut dokümanda özellik, buğday bitkisinin veya tohumunun bir AHAS genindeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır.

Burada açıklanan buğday bitkisinin bir IMI gene ek olarak bir yabancı tip veya mutasyona uğramamış AHAS gen içerebileceği anlaşılmaktadır. Örnek 1 ve 2’de açıklandığı gibi, Gunner IMI 205, Gunner IMI 208 ve Madsen IMI buğday kültivarları birden fazla AHAS izoenzimin sadece birinde bir mutasyon içermesi düşünülmektedir. Bu nedenle, mevcut doküman bir veya birden daha fazla yabancı tip veya mutasyona uğramamış AHAS nükleik asidi ek olarak bir veya birden fazla IMI nükleik asit içeren bir buğday bitkisini kapsamaktadır.

Buğday bitkilerinin yanı sıra, mevcut doküman izole edilmiş IMI proteinleri ve nükleik asitleri kapsamaktadır. Nükleik asitler SEKANS KİMLİK NO:1’den meydana gelen gruptan seçilen bir polinükleotidi; SEKANS KİMLİK NO:3’ün bir polinükleotidi, SEKANS KİMLİK NO:5’in bir polinükleotidi; SEKANS KİMLİK NO:2’nin bir polipeptidini kodlayan bir polinükleotit; SEKANS KİMLİK NO:4’ün bir polipeptidini kodlayan bir polinükleotit; SEKANS KİMLİK NO:6’nın bir polipeptidini kodlayan bir polinükleotit; ve yukarıda sözü edilen polinükleotitlerin herhangi birinin en az 60 ardışık nükleotitini içeren ve yukarıda bahsedilen polinükleotitlerin herhangi birine tamamlayıcı olan bir polinükleotiti içermektedir.

IMI nükleik asidi SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO: 3 veya SEKANS KİMLİK NO:5’in bir polinükleotit dizisini içerebilmektedir.

“AHAS protein” terimi bir asetohidroksiasit sentaz proteini belirtir ve “IMI protein” terimi bir yabancı tip AHAS proteinden mutasyona uğramış ve eksprese olduğunda bir bitkiye, bitki hücresine, bitki bölümüne, bitki tohumuna veya bitki dokusuna daha fazla imidazolinon direnci veren herhangi bir AHAS proteini belirtmektedir. IMI protein SEKANS KİMLİK NO:1, 5 SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5’i içeren bir polinükleotit dizisi tarafından kodlanan bir polipeptit içerebilir. Burada “nükleik asit” ve “polinükleotit” terimleri doğrusal veya dallanmış tek veya çift iplikli olan RNA veya DNA’yı veya bunların bir hibridini belirtmektedir. Terim ayrıca RNA/DNA hibritlerini kapsamaktadır. Bu terimler genin kodlama bölgesinin hem 3’ hem de 5’ uçlarında bulunan translasyona tabi tutulmamış diziyi de kapsar: 10 kodlama bölgesinin 5’ ucundan itibaren yukarı dizinin en az yaklaşık 1000 nükleotidi ve genin kodlama bölgesinin 3’ ucundan itibaren aşağı dizinin en az yaklaşık 200 nükleotidi. İnöz, 5-metilsitozin, 6- metiladenin, hipoksantin ve diğerleri gibi daha az yaygın bazlar da antisens, dsRNA ve ribozim eşleşmesi için kullanılabilir. Örneğin üridin ve sitidinin C-5 propin analogları içeren polinükleotitlerin, RNA’ya yüksek afiniteyle bağlandığı ve gen 15 ekspresyonunun güçlü antisens inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. Fosfodiester omurgasındaki modifikasyon veya RNA’nın riboz şeker grubundaki 2’-hidroksi gibi başka modifikasyonlar da yapılabilir. Antisense polinükleotitler ve ribozimler tamamen ribonükleotitlerden oluşabilir veya karma ribonükleotitler ve deoksiribonükleotitler içerebilir. Burada açılan polinükleotitler genomik terkipler, cDNA terkipleri, *in vitro* sentez, RT-PCR ve *in vitro* veya *in vivo* transkripsiyon da dahil olmak üzere herhangi bir yolla üretilebilir. 20

“İzole edilmiş” bir nükleik asit molekülü, nükleik asidin doğal kaynağında bulunan başka nükleik asit moleküllerinden (yani başka polipeptitleri kodlayan diziler) esas itibarıyla ayrılmış bir nükleik asit molekölüdür. Tercihen “izole edilmiş” bir nükleik asit doğal olarak oluşan replikonunda nükleik asidi doğal olarak yandan kuşatan bazı dizileri (yani nükleik asidin 5’ ve 25 3’ uçlarında bulunan dizileri) içermeyiz. Örneğin klonlanmış bir nükleik asit izole edilmiş olarak kabul edilir. İzole edilmiş IMI nükleik asit molekülü nükleik asidin elde edildiği hücrenin (örneğin bir *Triticum aestivum* hücresi) genomic DNA’sında nükleik asit molekölünü doğal olarak yandan kuşatan nükleotit dizilerini yaklaşık 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb veya 30 0.1 kb’den az içerebilir. Bir nükleik asit molekülü, insan müdahalesiyle değiştirilir veya doğal yeri olmayan bir lokusa veya yere yerleştirilirse veya agroenfeksiyon veya biyolistikle bir hücre içine dahil edilirse de izole edilmiş kabul edilir. Ayrıca bir cDNA molekülü gibi “izole edilmiş” bir nükleik asit molekülü, doğal olarak birlikte olduğu başka hücresel malzemenin bir

kısmından veya rekombinant tekniklerle üretildiğinde kültür ortamından veya kimyasal olarak sentezlendiğinde kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan arı olabilir.

Aşağıdakiler "izole edilmiş nükleik asitler" tanımıyla spesifik olarak dâhil tutulmaktadır

- 5 Doğal olarak oluşan kromozomlar (kromozom yayımları gibi), yapay kromozom kitaplıkları, genomik kitaplıkları ve bir *in vitro* nükleik asit terkihi olarak veya transfekte edilmiş/dönüştürülmüş bir konak hücre terkihi olarak var olan cDNA kitaplıkları burada konak hücreler *in vitro* heterojen bir terkiptir veya tek tek kolonilerin heterojen bir popülasyonu olarak kaplanır. Belirtilen bir nükleik asidin vektör moleküllerindeki nükleik asit eklentileri
- 10 sayısının %5'inden azını oluşturduğu yukarıdaki kitaplıkları da spesifik olarak dışarıda tutulmaktadır. Tam hücre genomik DNA veya tam hücre RNA terkipleri de (mekanik olarak kesilen veya enzimatik olarak sindirilen tam hücre terkipleri de dahil) spesifik olarak dışarıda tutulmaktadır. Bir *in vitro* terkip olarak veya buluşun nükleik asidinin elektroforez ortamında heterolog nükleik asitlerden daha fazla ayrılması (örneğin bir agaroz jel veya naylon blotta
- 15 bir heterojen bant popülasyonundan tek bir bantı kesilerek ayrılması) elektroforezle ayrılmış heterojen bir karışım olarak bulunan tam hücre terkipleri de spesifik olarak dışarıda tutulmaktadır

- Bir nükleik asit molekülü, örneğin SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3, SEKANS
- 20 KİMLİK NO:5 veya bunların bir bölümünün bir nükleotit dizisini içeren bir nükleik asit molekülü burada sunulan standart moleküler biyoloji teknikleri ve dizi bilgisi kullanılarak izole edilebilir. Örneğin bir *T. aestivum* IMI cDNA bir *T. aestivum* kitaplığından SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in dizisinin tamamı veya bir bölümü kullanılarak izole edilebilir. Ayrıca SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS
- 25 KİMLİK NO:5'in tamamı veya bir bölümünü içeren bir nükleik asit molekülü bu dizi temelinde tasarlanmış oligonükleotit primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla izole edilebilir. Örneğin mRNA bitki hücrelerinden (örneğin Chirgwin ve diğerleri, 1979 Biochemistry 18:5294-5299'un guanidinyum-tiosiyanat ekstraksiyon prosedürüyle) izole edilebilir ve cDNA ters transkriptaz kullanılarak hazırlanabilir (örneğin Gibco/BRL, Bethesda,
- 30 MD'den elde edilebilen Moloney MLV ters transkriptaz; veya Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL'den elde edilebilen AMV ters transkriptaz). Polimeraz zincir reaksiyona amplifikasyonu için sentetik oligonükleotit primerleri SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'te gösterilen nükleotit dizisi temelinde tasarlanabilir. Bir nükleik asit molekülü bir şablon olarak cDNA veya alternatif olarak genomik DNA ve uygun

oligonükleotit primerleri kullanılarak standart PCR amplifikasyon tekniklerine göre amplifiye edilebilir. Bu şekilde amplifiye edilen nükleik asit molekülü uygun bir vektör içine klonlanabilir ve DNA dizi analiziyle karakterize edilebilir. Ayrıca bir IMI nükleotit dizisine karşı gelen oligonükleotitler standart sentetik tekniklerle, örneğin bir otomatik DNA sentezleyici kullanılarak hazırlanabilir.

Burada açıklanan IMI nükleik asitleri bir IMI proteini kodlayan dizilerin (yani "kodlama bölgeleri") yanısıra 5' translas-yona tabi tutulmamış dizileri ve 3' translas-yona tabi tutulmamış dizileri içerebilir. Alternatif olarak bu nükleik asit molekülleri bir IMI genin sadece kodlama bölgelerini içerebilir veya genomik DNA'dan izole edilen tam genomik fragmanları içerebilir. Bu dizilerin bir kodlama bölgesi bir "ORF pozisyonu" olarak belirtilir. Ayrıca buluşun nükleik asit molekülü bir IMI genin bir kodlama bölgesinin bir bölümünü, örneğin bir prob veya primer olarak kullanılabilen bir fragman içerebilir. *T. aestivum*dan IMI genlerin klonlanmasından belirlenen nükleotit dizileri, başka hücre tipleri ve organizmalardaki IMI homologları yanısıra başka buğday bitkilerinden ve ilişkili türlerden IMI homologları belirlenmesi ve/veya klonlanmasında kullanılmak için tasarlanan problemler ve primerlerin üretimine imkân verir. Kodlama bölgesi bölümü bir IMI proteinin biyolojik olarak aktif bir fragmanında kodlayabilir.

Burada bir IMI proteinin "biyolojik olarak aktif bölümü" terimi, bir IMI proteinin, bir bitkide üretildiğinde bitkinin bir imidazolinon herbisite direncini bitkinin bir yabancı tip çeşidine kıyasla arttıran bir bölümünü, örneğin bir alan motifini kapsamayabilmektedir. İmidazolinon herbisitlere direnç artışının niceliğini belirlemek için yöntemler aşağıdaki örneklerde verilmektedir. Bir IMI proteinin biyolojik olarak aktif bölümleri arasında, tam uzunlukta bir IMI proteinden daha az sayıda amino asit içeren ve bir bitkide ekspresyon üzerine bir imidazolinon herbisite direnci arttıran SEKANS KİMLİK NO:2, SEKANS KİMLİK NO:4 veya SEKANS KİMLİK NO:6'yı içeren peptitler yer alır. Tipik olarak biyolojik olarak aktif bölümler (örneğin 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 veya daha fazla amino asit uzunluğundaki peptitler) bir IMI proteinin en az bir aktivitesine sahip bir alan veya motif içerir. Ayrıca polipeptidin başka bölgelerinin silindiği başka biyolojik olarak aktif bölümler rekombinant tekniklerle hazırlanabilir ve burada açıklanan aktivitelerin biri veya daha fazlası açısından değerlendirilebilir. Tercihen bir IMI proteinin biyolojik olarak aktif bölümleri bir Alan A, bir Alan B, bir Alan C, bir Alan D ve bir Alan E'den oluşan gruptan seçilen bir veya daha fazla korunmuş alan içerir, burada korunmuş alan bir mutasyon içerir.

Mevcut buluş ayrıca IMI kimerik veya füzyon polipeptitlerini açıklamaktadır Burada bir IMI "kimerik polipeptidi" veya "füzyon polipeptidi" IMI olmayan bir polipeptide işlevsel olarak bağlı bir IMI polipeptidi içerir. "IMI olmayan polipeptit", bir IMI polipeptide esas itibarıyla özdeş olmayan bir amino asit dizisine sahip bir polipeptidi, örneğin bir IMI İzoenzimi olmayan bir polipeptidi belirtir, bu peptit bir IMI polipeptidinden farklı bir işlevi yerine getirir. Füzyon polipeptidi içinde, "işlevsel olarak bağlı" terimi, her iki dizinin kullanılan diziye atfedilen önerilen işlevi yerine getirmesi için IMI polipeptidin ve IMI olmayan polipeptidin birbirine kaynaştırılmalarını belirtmeye yöneliktir. IMI olmayan polipeptit IMI polipeptidin N-terminusu veya C-terminusuna kaynaşabilir. Örneğin füzyon polipeptidi, IMI dizisinin GST dizisinin C-terminusuna kaynaştırılmış bir GST-IMI füzyon polipeptidi olabilir. Bu füzyon polipeptitleri rekombinant IMI polipeptitlerin saflaştırılmasını kolaylaştırabilir. Başka bir örnekte, füzyon polipeptidi N-terminusunda heterolog bir sinyal içeren bir IMI polipeptittir. Bazı konak hücrelerde (örneğin memeli konak hücreleri), bir IMI polipeptidin ekspresyonu ve/veya sekresyonu heterolog bir sinyal dizisi kullanılarak artırılabilir.

SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in bir polinükleotit dizisiyle kodlanan bir polipeptide dizi özdeşliğine sahip bir IMI polipeptidi kodlayan izole edilmiş bir nükleik asit molekülü, bir veya daha fazla amino asit süstitüsüyonu, ilavesi veya silinmesi kodlanmış polipeptit içine dahil edilecek şekilde SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in bir nükleotit dizisi içine bir veya daha fazla nükleotit süstitüsüyonu, ilavesi veya silinmesinin dahil edilmesiyle yaratılabilir. Mutasyonlar SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in bir dizisi içine yer yönelimli mutagenез ve PCR dolaylı mutagenез gibi standart tekniklerle dahil edilebilir. Koruyucu amino asit süstitüsüyonları bir veya daha fazla, ön görülen esansiyel olmayan amino asit kalıtımında yapılır.

Bir "koruyucu amino asit süstitüsüyonu" amino asit kalıtımında benzer bir yan zincire sahip bir amino asit kalıtımıyla değiştirildiği bir süstitüsüyondur. Benzer yan zincirlere sahip amino asit kalıtları familyalar bu alanda tanımlanmıştır. Bu familyalar arasında bazik yan zincirleri olan amino asitler (örneğin lizin, arjinin, histidin), asidik yan zincirleri olanlar (örneğin aspartik asit, glutamik asit), yüksüz polar yan zincirleri olanlar (örneğin glisin, asparajin, glutamin, serin, treonin, tirozin, sistein), polar olmayan yan zincirlere sahip olanlar (örneğin alanin,

valin, lösin, izolösin, prolin, fenilalanin, metionin, triptofan), beta-dallanmış yan zincirleri olanlar (örneğin treonin, valin, izolösin) ve aromatik yan zincirleri olanlar (örneğin tirozin, fenilalanin, triptofan, histidin) yer alır. Dolayısıyla bir IMI polipeptitteki ön görülen bir esansiyel olmayan amino asit kalıntısıyla tercihen aynı yan zincir familyasından başka bir amino asit kalıntısıyla değiştirilir. Alternatif olarak, mutasyonlar bir IMI kodlama dizisinin tamamı veya bir kısım boyunca rastgele, örneğin doyma mutagenesiyle dahil edilebilir ve elde edilen mutantlar IMI aktivitesini koruyan mutantları belirlemek için burada açılan bir IMI aktivitesi açısından taranabilir. SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in dizisinin mutagenезinin ardından, kodlanmış polipeptit rekombinant yolla eksprese edilebilir ve polipeptidin aktivitesi aşağıdaki Örneklerde açıklandığı gibi polipeptidi eksprese eden bir bitkinin imidazolinon direnci analiz edilerek belirlenebilir.

İki amino asit dizisinin dizi özdeşliği yüzdesini belirlemek için, diziler optimal karşılaştırma amaçlarına hizalanabilir (örneğin bir polipeptidin dizisinde diğer polipeptitle optimal hizalama için aralıklar oluşturulabilir). Daha sonra karşılaşılan amino asit pozisyonlarındaki amino asit kalıntıları karşılaştırılır. Bir dizideki bir pozisyon diğer dizideki karşılaşılan pozisyonla aynı amino asit kalıntısı tarafından işgal edildiğinde, moleküller o pozisyonda özdeştir. İki nükleik asit dizisi arasında aynı tip karşılaştırma yapılabilir. İki dizi arasındaki dizi özdeşliği yüzdesi, diziler tarafından paylaşılan özdeş pozisyonların sayısının bir fonksiyonudur (yani dizi özdeşliği yüzdesi = özdeş pozisyonların sayısı / toplam pozisyon sayısı x 100). Buluşun amaçları için, iki nükleik asit veya polipeptit dizisi arasındaki dizi özdeşliği yüzdesi Vector NTI 6.0 (PC) yazılım paketi (InforMax, 7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814) kullanılarak belirlenir. İki nükleik asidin özdeşlik yüzdesini belirlemek için 15 olan bir aralık açılımı ve 6.66 olan bir aralık uzatma cezası kullanılır. İki polipeptidin özdeşlik yüzdesini belirlemek için 10 olan bir aralık açılımı ve 0.1 olan bir aralık uzatma cezası kullanılır. Bütün diğer parametreler varsayılan ayarlara getirilir.

Dizi özdeşliğini belirlemek için, bir DNA dizisi bir RNA dizisiyle karşılaştırılırken, bir timidin nükleotidin bir urasil nükleotide denk olduğu takdir edilecektir. Tercihen burada açılan izole edilmiş IMI polipeptitler SEKANS KİMLİK NO:2, SEKANS KİMLİK NO:4 veya SEKANS KİMLİK NO:6'da gösterilen tam bir amino asit dizisine en az yaklaşık %50-60, tercihen en az yaklaşık %60-70 ve daha tercihen en az yaklaşık %70-75, %75-80, %80-85, %85-90 veya %90-95 ve en çok tercih edilen durumda en az yaklaşık %96, %97, %98, %99 veya daha fazla özdeştir. İzole edilmiş IMI polipeptitleri SEKANS KİMLİK NO:2, SEKANS KİMLİK NO:4

veya SEKANS KİMLİK NO:6'da gösterilen tam bir amino asit dizisine en az yaklaşık %50-60, tercihen en az yaklaşık %60-70 ve daha tercihen en az yaklaşık %70-75, %75-80, %80-85, %85-90 veya %90-95 ve en çok tercih edilen durumda en az yaklaşık %96, %97, %98, %99 veya daha fazla özdeş olabilmektedir. Ayrıca optimize edilmiş IMI nükleik asitler yaratılabilir.

- 5 Tercihen optimize edilmiş bir IMI nükleik asit bitkide aşırı ekspresyonu üzerine bir bitkinin imidazolinon herbisitlerine toleransını değiştiren ve daha tercihen bir bitkinin bir imidazolinon herbisite toleransını arttıran bir IMI polipeptidi kodlar. Burada "optimize edilmiş" terimi, belirli bir bitki veya hayvanda ekspresyonunu arttırmak için genetik olarak değiştirilmiş bir nükleik asidi belirtir. Optimize edilmiş bitki IMI nükleik asitleri temin etmek için, genin DNA dizisi 1) çok eksprese edilen bitki genleri tarafından tercih edilen kodonları içermek; 2) esas itibarıyla bitkilerde bulunan nükleotit baz bileşiminde bir A+T içeriğine sahip olmak; 3) bir bitki başlatma dizisi oluşturmak; 4) destabilizasyona, uygun olmayan poliadenilasyona, bozunmaya ve RNA'nın sonlanması neden olan veya ikincil yapılar veya RNA uç birleşme yerleri oluşturan dizileri elimine etmek için değiştirilebilir. Bitkilerde IMI nükleik asitlerin ekspresyonunun artması genel olarak bitkilerde veya özel bir bitkide kodon kullanımıyla dağılım sıklığı kullanılarak sağlanabilir. Bitkilerde nükleik asit ekspresyonunu optimize etmek için yöntemler EPA 0359472; EPA 0385962; PCT Başvurusu No. WO91/16432; ABD Patenti No. 5,380,831; ABD Patenti No. 5,436,391; Perlack ve diğerleri, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. ABD 88:3324-3328; ve Murray ve diğerleri, 1989 Nucleic Acids Res. 17:477-498'de bulunabilir.

- Burada kullanılan şekli ile "tercih edilen kodon kullanımı sıklığı" spesifik bir konak hücrenin belirli bir amino asidi belirlemek için nükleotit kodonlarının kullanımında gösterdiği tercihi belirtmektedir. Bir gende spesifik bir kodonun kullanımı sıklığını belirlemek için, o kodonun gendeki oluşum sayısı gende aynı amino asidi belirleyen bütün kodonların toplam oluşum sayısına bölünür. Benzer bir şekilde, bir konak hücrenin gösterdiği tercih edilen kodon kullanımı sıklığı, konak hücre tarafından eksprese edilen çok sayıda gende tercih edilen kodon kullanımı sıklığının ortalaması olarak hesaplanabilir. Bu analizin konak hücre tarafından çok eksprese edilen genlerle sonuçlanması tercih edilir. Sentetik bir gen için tercih edilen kodon kullanımı sıklığının bir konak hücre tarafından kullanıldan sapma yüzdesi, ilk olarak tek bir kodonun kullanımı sıklığının konak hücreninkinden sapma yüzdesi belirlendikten sonra bütün kodonlarda ortalama sapma elde edilerek hesaplanır. Burada tanımlandığı gibi, bu hesaplama benzersiz kodonlar (yani ATG ve TGG) içerir. Genel hatlarıyla, optimize edilmiş bir genin kodon kullanımı bir konak hücreninkinden genel ortalama sapması $A = n = 1 \sum X_n - Y_n$

$X_n \times 100 / Z$ denklemi kullanılarak hesaplanır, burada X_n = konak hücrede kodon n için kullanılan sıklık, Y_n = sentetik gende kodon n için kullanılan sıklık, n bir amino asidi belirten tek bir kodonu temsil eder ve kodonların toplam sayısı Z'dir. Kodon kullanım sıklığının genel sapması bütün amino asitler için tercihen yaklaşık %25'in altında ve daha tercihen yaklaşık %10'un altında olmalıdır.

Dolayısıyla, bir IMI nükleik asit, kodon kullanım dağılımı sıklığının çok eksprese olan bitki genlerindeki en fazla %25 ve daha tercihen en fazla yaklaşık %10 sapacağı şekilde optimize edilebilir. Ayrıca dejenere üçüncü bazın G+C içeriği yüzdesine dikkat edilir (tek çenekliler bu pozisyonda G+C'yi destekliyor gibi, çift çenekliler ise desteklemiyor gibi görünmektedir). Öte yandan XCG (X A, T, C veya G'dir) nükleotidin çift çeneklilerde en az tercih edilen kodon olduğu, XTA kodonundan ise hem tek çeneklilerde hem de çift çeneklilerde kaçınılması kabul edilmektedir. Bu buluşun optimize edilmiş IMI nükleik asitleri ayrıca tercihen seçilmiş konak bitkininkine (yani *Triticum aestivum*) çok yaklaşan CG ve TA çift kaçınma indekslerine sahiptir. Daha tercihen bu indeksler konağın kilerden en fazla yaklaşık %10-15'ten sapar.

Yukarıda açıklanan IMI polipeptitleri kodlayan nükleik asit moleküllerinin yanı sıra mevcut dokümanın başka bir yönü bunlara antisens olan izole edilmiş nükleik asit moleküllerine ilişkindir. Antisens polinükleotitlerin bir hedef polinükleotidin gen ekspresyonunu, hedef polinükleotidi spesifik olarak bağlayarak ve hedef polinükleotidin transkripsiyonuna, uç birleşmesine, nakline, translasyonuna ve/veya stabilitesine müdahale ederek inhibe ettiği düşünülmektedir. Önceki teknikte antisens polinükleotidi kromozomal DNA'ya, bir birincil RNA transkriptine veya işlenmiş bir mRNA'ya hedeflemek için yöntemler açıklanmaktadır. Tercihen hedef bölgeler arasında uç birleşme yerleri, translasyon başlatma kodonları, translasyon sonlandırma kodonları ve açık okuma çerçevesi içindeki başka diziler yer alır.

Bu dokümanın amaçları doğrultusunda "antisens" terimi endojen genin ekspresyonuna müdahale etmek üzere, bir genin, birincil transkriptin veya işlenmiş mRNA'nın tamamı veya bir bölümünü yeterince tamamlayıcı olan bir polinükleotit içeren bir nükleik asidi belirtmektedir. "Tamamlayıcı" polinükleotitler standart Watson-Crick tamamlayıcı kurallarına göre baz eşleşmesine muktedir olanlardır. Spesifik olarak pürinler pirimidinlerle baz eşleşmesiyle DNA söz konusuysa sitozinle eşleşmiş bir guanin (G:C) ve timinle eşleşmiş

adenin (A:T) veya RNA söz konusuyla urasille eşleşmiş adenin (A:U) kombinasyonu oluşturacaktır. İki polinükleotidin, her biri diğerine esas itibarıyla tamamlayıcı olan en az bir bölgeye sahip olmak koşuluyla, birbirlerini tamamen tamamlayıcı olmasalar bile birbirlerine hibridize olabilecekleri takdir edilecektir. "Antisens nükleik asit" terimi, bir antisens RNA üretmek üzere transkripsiyona tabi tutulabilen tek iplikli RNA'nın yanısıra çift iplikli DNA ekspresyon kasetlerini kapsamaktadır. "Aktif" antisens nükleik asitler, SEKANS KİMLİK NO:2, SEKANS KİMLİK NO:4 veya SEKANS KİMLİK NO:6'nın polipeptit dizisiyle en az %80 dizi özdeşliğine sahip bir polipeptidi kodlayan bir primer transkript veya mRNA'yla seçici bir şekilde hibridize olabilen antisens RNA molekülleridir.

10

Yukarıda açıklanan IMI nükleik asitlere ve polipeptitlere ek olarak, bu belgede bir gruba bağlı bu nükleik asitler ve polipeptitler açıklanmaktadır. Bu gruplar arasında sınırlanmamak koşuluyla saptama grupları, hibridizasyon grupları, saflaştırma grupları, tatbik grupları, reaksiyon grupları, bağlama grupları ve benzeri yer alır. Bağlanmış gruplara sahip nükleik asitlerin tipik bir grubu problar ve primerlerdir. Problar ve primerler tipik olarak esas itibarıyla izole edilmiş bir oligonükleotit içerir. Oligonükleotit tipik olarak titiz koşullar altında SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'te açıklanan dizinin bir sens ipliğinin, SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'te açıklanan bir antisens dizinin veya bunların doğal olarak oluşan mutantları en az yaklaşık 12, tercihen yaklaşık 25, daha tercihen yaklaşık 40, 50 veya 75 ardışık nükleotidine hibridize olan bir nükleotit dizisi bölgesi içerir. SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'in bir nükleotit dizisine dayanan primerler PCR reaksiyonlarında IMI homologları klonlamak için kullanılabilir. IMI nükleotit dizilerine dayanan problar aynı veya homolog polipeptitleri kodlayan transkriptleri veya genomik dizileri saptamak için kullanılabilir. Tercih edilen yönlerde, prob ayrıca bir işaretleme grubu içerir, örneğin işaretleme grubu bir radyoizotop, floresan bir bileşik, bir enzim veya bir enzim kofaktörü olabilir. Bu problar bir IMI polipeptidi eksprese eden hücreleri saptamak için bir genomik markör test setinin bir parçası olarak, örneğin bir hücreler numunesinde IMI kodlayan bir nükleik asit seviyesi ölçülerek, örneğin IMI mRNA seviyeleri saptanarak veya bir genomik IMI geninin mutasyona uğrayıp uğramadığı veya silinip silinmediği belirlenerek kullanılabilir.

30

Mevcut doküman ayrıca yukarıda açıklanmış gibi bir IMI nükleik asit içeren izole edilmiş bir rekombinant ekspresyon vektörü açıklanmakta olup, burada vektörün bir konak hücrede ekspresyonu konak hücrenin yabancı tip bir çeşidine karşı bir imidazolinon herbisite direncin

artmasıyla sonuçlanır. Burada "vektör" terimi bağlandığı başka bir nükleik asidi taşıyabilen bir nükleik asit molekülünü belirtmektedir. Bir vektör tipi ek DNA segmentlerinin bağlanabildiği dairesel bir çift iplikli DNA ilmesini belirten bir "plazmit"tir. Başka tip bir vektör ek DNA segmentlerinin viral genom içine bağlanabildiği bir viral vektördür. Belirli vektörler dahil edildikleri bir konak hücrede otonom replikasyona muktedirdir (örneğin bakteriyel bir replikasyon kaynağına sahip bakteriyel vektörler ve epizomal memeli vektörleri). Diğer vektörler (örneğin epizomal olmayan memeli vektörleri) konak hücre içine dahil edilince bir konak hücrenin genomu içine katılır ve böylece konak genomuyla birlikte replikasyona tabi olur. Ayrıca bazı vektörler işlevsel olarak bağlandıkları genlerin ekspresyonunu yönetebilirler. Bu vektörler burada "ekspresyon vektörleri" olarak geçmektedir. Genel olarak, rekombinant DNA tekniklerinde yararlı olan ekspresyon vektörleri çoğunlukla plazmitler formundadır. Bu tarifnamede "plazmit" ve "vektör" birbirinin yerine kullanılabilmektedir, çünkü plazmit vektörün en yaygın kullanılan formudur. Ancak buluş eşdeğer işlevleri yerine getiren, viral vektörler (örneğin replikasyon kusurlu retrovirüsler, adenovirüsler ve adenovirüsle ilişkili virüsler) gibi başka ekspresyon vektörü formlarını kapsamayabilmektedir.

Burada açıklanan rekombinant ekspresyon vektörleri bir nükleik asidini bir konak hücrede nükleik asidin ekspresyonu için uygun bir formda içerir, bu rekombinant ekspresyon vektörlerinin, eksprese edilecek nükleik asit dizisine işlevsel olarak bağlanan, ekspresyon için kullanılacak konak hücreler temelinde seçilen, bir veya daha fazla düzenleyici dizi içerdiği anlamına gelir. Bir rekombinant ekspresyon vektörü içinde, "işlevsel olarak bağlan" terimi, ilgilenilen nükleotit dizisinin düzenleyici diziye/dizilere nükleotit dizisinin ekspresyonuna izin veren bir şekilde (örneğin bir *in vitro* transkripsiyon/translasyon sisteminde veya vektör konak hücre içine dahil edildiğinde bir konak hücrede) bağlandığı anlamına gelmektedir. "Düzenleyici dizi" teriminin promotörler, enhansörler ve diğer ekspresyon kontrolü öğelerini (örneğin poliadenilasyon sinyalleri) kapsamayabilmektedir. Bu düzenleyici diziler örneğin Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)'da açıklanmaktadır veya Gruber ve Crosby, Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, derleyenler Glick ve Thompson, Bölüm 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida'ya ve oradaki referanslara bakılır. Düzenleyici diziler arasında birçok konak hücre tipinde bir nükleotit dizisinin yapılabildiği ekspresyonunu yönetenler ve sadece bazı konak hücrelerde veya bazı koşullar altında nükleotit dizisinin ekspresyonunu yönetenler yer alır. Bu alanda uzman olanlar ekspresyon vektörünün tasarımı dönüştürülecek konak hücre seçimi, istenen polipeptit ekspresyon seviyesi ve bunun gibi faktörlere bağlıdır.

olabileceğini takdir edeceklerdir. Ekspresyon vektörleri konak hücreler içine dahil edilerek böylece burada açıldığında gibi nükleik asitler tarafından kodlanan füzyon polipeptitleri veya peptitleri de dahil olmak üzere polipeptitler veya peptitler (örneğin IMI polipeptitler, füzyon polipeptitleri ve benzeri) üretilebilir.

5

IMI polipeptitler bitkilerde ve bitki hücrelerinde, örneğin tek hücreli bitki hücreleri (algılar gibi) (Falciatore ve diğerleri, 1999 Marine Biotechnology 1(3):239-251 ve oradaki referanslara bakınız) ve daha yüksek bitkilerden bitki hücrelerinde (örneğin kültür bitkileri gibi spermatofitler) eksprese edilebilir. Bir IMI polinükleotit bir bitki hücresine transfeksiyon, dönüştürme veya transdüksiyon, elektroporasyon, parçacık bombardıman, agroenfeksiyon, biyolistik ve benzeri de dahil olmak üzere herhangi bir yolla "dahil edilebilir".

10

Bitki hücreleri de dahil olmak üzere konak hücreleri dönüştürmek veya transfekte etmek için uygun yöntemler Sambrook ve diğerlerinde (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. basım, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) ve Methods in Molecular Biology, 1995, Cilt 44, Agrobacterium protocols, derleyenler: Gartland ve Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey gibi başka laboratuvar el kitaplarında bulunabilir. İmidazolinon herbisitlere daha yüksek direnç, mısır, buğday, çavdar, yulaf, tritikale, pirinç, arpa, soya fasulyesi, fındık, pamuk, kolza ve kanola, manihot, biber, ayçiçeği ve kadiye, patates, tütün, patlıcan ve domates gibi solanaceae bitkileri, Vicia türleri, bezelye, yonca, çalılık bitkiler (kahve, kakao, çay), Salix türleri, ağaçlar (palmye, Hindistan cevizi), çok yıllık otlar ve yem bitkileri gibi çok çeşitli bitkilere kalıtım yoluyla alınması istenen genel bir özelliktir, bu kültür bitkileri aynı zamanda bu buluşun başka bir düzenlemesi olarak genetik olarak değiştirilmek için tercihen hedeflenen bitkilerdir.

15

20

25

Yem bitkileri arasında sınırlanmamak koşuluyla Buğday çimi, Kanarya otu, Erişte otu, Arpa, Mavi ot, Ayrık otu, Yonca, Salfoyn, Gazal boynuzu, Melez Tıbbi Kızı Yonca ve Sarı Yonca yer alır

30

IMI polinükleotidin bir bitki içine transfeksiyonu Agrobakteri dolaylı gen transferiyle sağlanabilmektedir. Bu alanda uzman olanlar tarafından bilinen bir dönüştürme yöntemi çiçekli bir bitkinin bir Agrobakteri çözeltisine içine daldırılması (burada Agrobakteri IMI nükleik asit içerir), ardından dönüştürülmüş gametlerin üretimidir. Agrobakteri dolaylı bitki dönüştürme örneğin GV3101 (pMP90) (Koncz ve Schell, 1986 Mol. Gen. Genet. 204:383-396)

veya LBA4404 (Clontech) *Agrobacterium tumefaciens* suşu kullanılarak yapılabilir. Dönüştürme standart dönüştürme ve rejenerasyon teknikleriyle yapılabilir (Deblaere ve diğerleri, 1994 Nucl. Acids. Res. 13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. ve Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2. Basım - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. ve Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Örneğin kolza çenek veya hipokotil dönüştürme yoluyla dönüştürülebilir (Moloney ve diğerleri, 1989 Plant cell Report 8:238-242; De Block ve diğerleri, 1989 Plant Physiol. 91:694-701). Agrobakteri için antibiyotik kullanımı ve bitki seçimi dönüştürme için kullanılan ikili vektöre ve Agrobakteri suşuna bağlıdır. Kolza seçimi normal olarak seçilebilir bitki markörü olarak kanamisin kullanılarak yapılır. Ketene Agrobakteri dolaylı gen transferi örneğin Mlynarova ve diğerleri, 1994 Plant Cell Report 13:282-285'te açıklanan bir teknik kullanılarak yapılabilir. Ayrıca soya fasulyesinin dönüştürülmesi, örneğin Avrupa Patenti No. 0424 047, ABD Patenti No. 5,322,783, Avrupa Patenti No. 0397 687, ABD Patenti No. 5,376,543 veya ABD Patenti No. 5,169,770'te açıklanan bir teknik kullanılarak yapılabilir. Mısır dönüştürülmesi parçacık bombardımanı polietilen glikol dolaylı DNA alımı veya silikon karbür lif tekniği vasıtasıyla yapılabilir. (Örneğin Freeling ve Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7'ye bakınız). Mısır dönüştürülmesinin spesifik bir örneği ABD Patenti No. 5,990,387'de bulunabilir ve buğday dönüştürülmesinin spesifik bir örneği PCT Başvurusu No. WO 93/07256'da bulunabilir.

Bu buluşa göre dahil edilen IMI polinükleotit, kromozomal olmayan otonom bir replikon içine dahil edilir veya bitki kromozomlarına katılarak bitki hücrelerinde kalıcı bir şekilde korunabilir. Alternatif olarak, dahil edilen IMI polinükleotit kromozom dışı replikasyona uğramayan bir ektör üzerinde bulunabilir ve geçici olarak eksprese edilebilir veya geçici olarak aktif olabilir. Bir düzenlemede IMI polinükleotidin bir kromozom içine katıldığı homolog bir rekombinant mikroorganizma yaratılabilir, endojen AHAS geni değiştirmek, örneğin işlevsel olarak bozmak ve bir IMI gen yaratmak için bir silinme, ilave veya süstitüsyonun dahil edildiği bir AHAS genin en azından bir bölümünü içeren bir vektör hazırlanır. Homolog rekombinasyonla bir nokta mutasyonu yaratmak için, kimeroplasti olarak bilinen bir teknikte DNA-RNA hibritleri kullanılabilir (Cole-Strauss ve diğerleri, 1999 Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 ve Kmiec, 1999 Gene therapy American Scientist 87(3):240-247). *Triticum* türlerindeki başka

homolog rekombinasyon prosedürleri de bu alanda iyi bilinmekte ve burada kullanılmak için düşünülmektedir.

Homolog rekombinasyon vektöründe, bir mikroorganizma veya bitkide vektör tarafından taşınan eksojen IMI gen ile endojen bir AHAS gen arasında homolog rekombinasyonun oluşmasına imkân vermek için, IMI gen 5' ve 3' uçlarında AHAS genin ek bir nükleik asit molekülüyle yandan kuşatılabilir. Ek yan AHAS nükleik asit molekülü endojen genle başarılı homolog rekombinasyon için yeterli uzunlukta değildir. Tipik olarak vektöre birkaç yüz baz çifti ile kilobazlarca yan DNA (hem 5' hem de 3' uçlarda) dahil edilir (homolog rekombinasyon vektörlerinin bir açılımı için örneğin Thomas, K. R. ve Capecchi, M. R., 1987 Cell 51:503'e ve *Physcomitrella patens* cDNA bazlı rekombinasyon için Strepp ve diğerleri, 1998 PNAS, 95(8):4368-4373'e bakınız). Ancak IMI gen normal olarak çok az sayıda amino asitte AHAS genden farklı olduğu için, bir yan dizi her zaman gerekli değildir. Homolog rekombinasyon vektörü bir mikroorganizmaya veya bitki hücrelerine (örneğin polietilen glikol dolaylı DNA yoluyla) dahil edilir ve dahil edilen IMI genin endojen AHAS genle homolog olarak rekombine olduğu hücreler teknikle bilinen teknikler kullanılarak seçilir.

Alternatif olarak dahil edilen genin düzenlenmiş ekspresyonuna izin veren seçilmiş sistemler içeren rekombinant mikroorganizmalar üretilebilir. Örneğin lac operonun kontrolü altına yerleştirilerek bir vektöre bir IMI genin dahil edilmesi, IMI genin sadece IPTG'nin varlığında ekspresyonuna izin verir. Bu düzenleyici sistemler bu alanda iyi bilinmektedir.

İster kromozom dışı replikasyona uğramayan bir vektörde isterse bir kromozom içine katılmış bir vektörde bulunsun, IMI polinükleotit tercihen bir bitki ekspresyon kasetinde bulunur. Bir bitki ekspresyon kaseti tercihen her dizinin kendi işlevini, örneğin poliadenilasyon sinyalleriyle transkripsiyonun sonlandırılmasına yerine getirebilmesi için işlevsel bir şekilde bağlanmış bitki hücrelerindeki gen ekspresyonunu tahrik edebilen düzenleyici diziler içerir. Tercih edilen poliadenilasyon sinyalleri, Ti-plazmit pTiACH5'in oktopin sentaz olarak bilinen gen 3 gibi *Agrobacterium tumefaciens* t-DNA'dan kaynaklananlar (Gielen ve diğerleri, 1984 EMBO J. 3:835) veya bunların işlevsel eşdeğerleridir, ama bitkilerde işlevsel olarak aktif olan bütün diğer sonlandırıcılar da uygundur. Bitki gen ekspresyonu çok sıkı olarak transkripsiyon seviyeleri açısından sınırlanmadığı için, bir bitki ekspresyon kaseti tercihen RNA oranı için polipeptidi arttıran bütün mozaik virüsünden 5' translasyona tabi tutulmamış lider dizisi içeren

aşırı diziler türünden transkripsiyonel hırlar gibi işlevsel olarak bağlanabilir diziler içerir (Gallie ve diğerleri, 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Bitki ekspresyon vektörlerinin örnekleri arasında Becker, D. ve diğerleri, 1992 New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border, Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; Bevan, M.W., 1984 Binary Agrobacterium vectors for plant transformation, Nucl. Acid. Res. 12:8711-8721; ve Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; Transgenic Plants, Cilt 1, Engineering and Utilization içinde, derleyenler: Kung ve R. Wu, Academic Press, 1993, S.15-38'de ayrıntı olarak açıklananlar yer alır

Bitki gen ekspresyonunun zamanında, hücreye veya dokuya spesifik bir şekilde uygun bir promotör verici gen ekspresyonuna işlevsel olarak bağlanması gerekir. Burada açıklanan ekspresyon kasetlerinde yararlı olan promotörler arasında, bir bitki hücresinde transkripsiyonu başlatabilen herhangi bir promotör yer alır. Bu promotörler arasında sınırlanmamak koşuluyla *Agrobacterium* ve *Rhizobium* gibi bitkilerde eksprese olan genler içeren bitkilerden, bitki virüslerinden ve bakterilerinden elde edilebilenler yer alır

Promotör yapılabılır, gelişim aşaması tercihli, hücre tipi tercihli, doku tercihli veya organ tercihli olabilir. Yapılabılır promotörler koşulların çoğunda aktiftir. Yapılabılır promotörlerin örnekleri arasında CaMV 19S ve 35S promotörleri (Odell ve diğerleri 1985 Nature 313:810-812), sX CaMV 35S promotörü (Kay ve diğerleri 1987 Science 236:1299-1302), Sep1 promotörü, piriç aktin promotörü (McElroy ve diğerleri 1990 Plant Cell 2:163-171), *Arabidopsis* aktin promotörü, ubikuitan promotörü (Christensen ve diğerleri 1989 Plant Molec Biol. 18:675-689); pEmu (Last ve diğerleri 1991 Theor Appl Genet. 81:581-588), sica otu mozaik virüsü 35S promotörü, Smas promotörü (Velten ve diğerleri 1984 EMBO J. 3:2723-2730), GRP1-8 promotörü, sinamil alkol dehidrojenaz promotörü (ABD Patenti No. 5,683,439), manopin sentaz, nopalin sentaz ve oktopin sentaz gibi Agrobakteri T-DNA'sından promotörler, ribuloz bifosfat karboksilaz (ssuRUBISCO) promotörünün küçük alt birimi ve benzeri yer alır

Uyarlabılır promotörler bir besin veya metabolitin varlığıyla sıcak veya soğuk, ışık, patojen saldırısı, anaerobik koşullar ve bunun gibi bazı çevre koşullarında aktiftir. Örneğin *Brassica*'dan hsp80 promotörü ısı şokuyla uyarılır, PPK promotörü ışıkla uyarılır, tütün, *Arabidopsis* ve mısır'dan PR-1 promotörü bir patojenle enfeksiyonla uyarılabilir ve Adh1 promotörü hipoksi ve soğuk stresle uyarılır. Bitki gen ekspresyonu uyarılabilir bir promotör

vasıtasıyla kolaylaştırılabilir (bir inceleme için Gatz, 1997 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108'e bakınız). Kimyasal olarak uyarılabilir promotörler zamana spesifik gen ekspresyonu isteniyorsa özellikle uygundur. Bu tür promotörlerin örnekleri salisilik asitle uyarılabilir bir promotör (PCT Başvurusu No. WO 95/19443), tetrasiklinle uyarılabilir bir promotör (Gatz ve diğerleri, 1992 Plant J. 2:397-404) ve etanolle uyarılabilir bir promotördür (PCT Başvurusu No. WO 93/21334).

Gelişme aşaması tercihli promotörler tercihli olarak gelişimin bazı aşamalarında eksprese olur. Doku ve organ tercihli promotörler arasında tercihli olarak yapraklar, kökler, tohumlar veya ksilem (odunsu doku) gibi bazı dokularda veya organlarda eksprese olanlar yer alır. Doku tercihli ve organ tercihli promotörlerin örnekleri arasında selüloz sentetilememek koşuluyla meyve tercihli, ovül tercihli, eril doku tercihli, tohum tercihli, kabuk tercihli, yumru kök tercihli, sap tercihli, perikarp tercihli ve yaprak tercihli, tepecik tercihli, polen tercihli, başçık tercihli, taç yaprağı tercihli, çanak yaprak tercihli, sapçık tercihli, hardalsı yemiş tercihli, gövde tercihli, kök tercihli promotörler ve benzeri yer alır. Tohum tercihli promotörler tercihen tohum gelişimi ve/veya çimlenme sırasında eksprese olur. Örneğin tohum tercihli promotörler oğulcuk tercihli, endosperm tercihli ve tohum zarfı tercihli olabilir. Thompson ve diğerleri, 1989 BioEssays 10:108'e bakınız. Tohum tercihli promotörlerin örnekleri arasında selüloz sentetilememek koşuluyla selüloz sentaz (celA), Cim1, gama-zein, globülin-1, mısır 19 kD zein (cZ19B1) ve benzeri yer alır.

Diğer uygun doku tercihli veya organ tercihli promotörler arasında kolzadan napin-gen promotörü (ABD Patenti No. 5,608,152), *Vicia faba* dan USP- promotör (Baeumlein ve diğerleri, 1991 Mol Gen Genet. 225(3):459-67), *Arabidopsis* den oleozin-promotör (PCT Başvurusu No. WO 98/45461), *Phaseolus vulgaris* den fazeolin- promotör (ABD Patenti No.5,504,200), Brassica'dan Bce4- promotör (PCT Başvurusu No. WO 91/13980) veya legumin B4 promotörünün (LeB4; Baeumlein ve diğerleri, 1992 Plant Journal, 2(2):233-9) yanı sıra mısır arpa, buğday, çavdar, pirinç ve bunun gibi tek çenekli bitkilerde tohuma spesifik ekspresyon sağlayan promotörler yer alır. Sözü edilebilecek uygun promotörler arpadan lpt2 veya lpt1-gen promotörü (PCT Başvurusu No. WO 95/15389 ve PCT Başvurusu No. WO95/23230) veya PCT Başvurusu No. WO 99/16890'da açılananlarda (arpa hordein geni, pirinç glutelin geni, pirinç orizin geni, pirinç prolamin geni, buğday gliadin geni, buğday glutelin geni, yulaf glutelin geni, Süpürge darı kasirin geni ve çavdar sekalin geninden promotörler).

Mevcut dokümanın ekspresyon kasetlerinde yararlı olan diğer promotörler arasında sınırlanmamak koşuluyla ana klorofil a/b bağlayıcı protein promotörü, histon promotörleri, Ap3 promotörü, konglisin promotörü, napin promotörü, soya fasulyesi lektin promotörü, m¹⁵ 15 kD zein promotörü, 22kD zein promotörü, 27kD zein promotörü, g-zein promotörü, mumsu, shrunken (çekmiş) 1, shrunken 2 ve bronz promotörler, Zm13 promotörü (ABD Patenti No. 5,086,169), m¹⁵ poligalakturonaz promotörleri (PG) (ABD Patentleri No. 5,412,085 ve 5,545,546) ve SGB6 promotörünün (ABD Patenti No. 5,470,359) yanı sıra sentetik veya doğal başka promotörler yer alı

10

Bitkilerde heterolog gen ekspresyonunun kontrol edilmesinde ek esneklik, heterolog kaynaklardan DNA bağlanma alanları ve yan ürünleri (yani bitki olmayan kaynaklardan DNA bağlanma alanları) kullanılarak elde edilebilir. Böyle bir heterolog DNA bağlanma alanının bir örneği LexA DNA bağlanma alanıdır (Brent ve Ptashne, 1985 Cell 43:729-736).

15

Mevcut dokümanın başka bir yönü bir rekombinant ekspresyon vektörünün dahil edildiği konak hücrelere ilişkindir. "Konak hücre" ve "rekombinant konak hücre" terimleri burada birbirinin yerine kullanılmaktadır. Bu tür terimlerin sadece spesifik hücreyi değil aynı zamanda böyle bir hücrenin dölünü veya potansiyel dölünü de belirttiği takdir edilecektir. Sonraki kuşaklarda mutasyona veya çevresel etkilere bağlı olarak bazı modifikasyonlar olabildiği için, bu döl aslında ana hücreyle aynı olmayabilir, ama yine de burada kullanılan terimin çerçevesi içine girmektedir. Bir konak hücre herhangi bir prokaryotik veya ökaryotik hücre olabilir. Örneğin bir IMI polinükleotit *C. glutamicum* gibi bakteriyel hücrelerde, böcek hücrelerinde, mantar hücrelerinde veya memeli hücrelerinde (örneğin Çin hamsteri yumurtalı hücreleri (CHO) veya COS hücreleri), alglar, siliyatlar, bitki hücreleri, mantarlar veya *C. glutamicum* gibi başka mikroorganizmalarda eksprese olabilir. Başka uygun konak hücreler bu alanda uzman olanlarca bilinmektedir.

30

Kültürdeki bir prokaryotik veya ökaryotik konak hücre gibi bir konak hücre bir IMI polinükleotit üretmek (veya eksprese etmek) için kullanılabilir. Dolayısıyla mevcut doküman ayrıca buluşun konak hücrelerini kullanarak IMI polipeptitleri üretmek için yöntemleri açıklamaktadır. Yöntem (bir IMI polipeptidi kodlayan bir rekombinant ekspresyon vektörünün dahil edildiği veya genomuna yabancı tip veya IMI polipeptidi kodlayan bir genin dahil edildiği)

konak hücrenin uygun bir ortamda IMI polipeptit üretilene kadar kültürlenmesini içerebilmektedir. Yöntem ayrıca ortamdaki veya konak hücreden IMI polipeptitlerin izole edilmesini içerebilmektedir. Başka bir yön izole edilmiş IMI polipeptitlere ve bunların biyolojik olarak aktif bölümlerine ilişkindir. "İzole edilmiş" veya "saflaştırılmış" polipeptit veya bunun biyolojik olarak aktif bölümü, rekombinant DNA teknikleriyle üretildiğinde hücre malzemesinin bir kısmından veya kimyasal olarak sentezlendiğinde başka kimyasallardan aridir. "Hücre malzemesinden esas itibarıyla arı" ifadesi, polipeptidin, doğal olarak veya rekombinant yolla içinde üretildiği hücrelerin hücre malzemesinin bir kısmından ayrıldığı IMI polipeptit terkiplerini kapsamaktadır. Bir yönde "hücre malzemesinden esas itibarıyla arı" cümlesi yaklaşık %30'dan az (kuru ağırlık olarak) IMI olmayan malzeme (burada "kontamine edici polipeptit" olarak da geçmektedir), daha tercihen yaklaşık %20'den az IMI olmayan malzeme, daha da tercihen yaklaşık %10'dan az IMI olmayan malzeme ve en çok tercih edilen durumda yaklaşık %5'ten az IMI olmayan malzemeyi haiz bir IMI polipeptidin terkiplerini kapsamaktadır.

IMI polipeptit veya bunun biyolojik olarak aktif bölümü rekombinant yolla üretildiğinde, tercihen kültür ortamından da esas itibarıyla aridir, yani kültür ortamı polipeptit terkiplerinin hacminin yaklaşık %20'sinden azını, daha tercihen yaklaşık %10'undan azını ve en çok tercih edilen durumda yaklaşık %5'inden azını temsil eder. "Kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan esas itibarıyla arı" cümlesi, polipeptidin, polipeptidin sentezinde rol oynayan kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan ayrıldığı IMI polipeptit terkipleri kapsar. Bir yönde, "kimyasal öncülerden veya başka kimyasallardan esas itibarıyla arı" ifadesi yaklaşık %30'dan az (kuru ağırlık olarak) kimyasal öncüler veya IMI olmayan kimyasallar, daha tercihen yaklaşık %20'den az kimyasal öncüler veya IMI olmayan kimyasallar, daha da tercihen yaklaşık %10'dan az kimyasal öncüler veya IMI olmayan kimyasallar ve en çok tercih edilen durumda yaklaşık %5'ten az kimyasal öncüler veya IMI olmayan kimyasallar haiz bir IMI polipeptidin terkiplerini kapsar. Tercih edilen yönlerde, izole edilen polipeptitler veya bunların biyolojik olarak aktif bölümleri, IMI polipeptidin elde edildiği aynı organizmadan kontamine edici polipeptitler içermez. Tipik olarak bu polipeptitler *Triticum aestivum* dışındaki bitkilerde veya *C. glutamicum*, siliyatlar, alglar veya mantarlar gibi mikroorganizmalarda örneğin bir *Triticum aestivum* IMI Polipeptidin rekombinant ekspresyonu ile üretilir.

Burada açıklanan IMI polinükleotid ve polipeptit dizilerinin çeşitli kullanımları vardır. Nükleik asit ve amino asit dizileri bitkileri dönüştürmek, böylece bitkinin imidazolinon herbisitlerine

direncini modüle etmek için kullanılabilir. Dolayısıyla mevcut doküman bir imidazolinon herbisite toleransını arttıran transgenik bir bitki üretmek için (a) bir bitki hücresinin bir veya daha fazla IMI nükleik asit içeren bir veya daha fazla ekspresyon vektörüyle dönüştürülmesini ve (b) bitki hücrelerinden bir imidazolinon herbisite direnci bitkinin yabancı tip çeşidine kıyasla daha yüksek olan transgenik bir bitkinin üretilmesini içeren bir yöntemi açıklamaktadır. Birden fazla IMI nükleik asit farklı genomlardan elde edilebilmektedir.

Burada ayrıca (a) bir IMI nükleik asidini içeren bir ekspresyon vektörüyle bir bitki hücresinin dönüştürülmesini içeren bir imidazolinon herbisitine karşı artmış toleransa sahip bir transgenik bitkinin üretilmesine yönelik yöntemler açıklanmakta olup, burada nükleik asit Imi1 olmayan bir nükleik asittir ve (b) burada bitkinin yabancı tip çeşidine kıyasla bir imidazolinon herbisitine karşı artmış dirence sahip bir transgenik bitkiden bir bitki hücresinin üretilmesi de açıklanmaktadır.

Mevcut doküman bir bitkinin bir imidazolinon herbisite toleransını modifiye etmek için, bir veya daha fazla IMI nükleik asidin ekspresyonunun modifiye edilmesini içeren yöntemleri açıklamaktadır. Tercihen nükleik asitler farklı genomlar üzerinde bulunur veya farklı genomlardan elde edilir. Bir IMI polinükleotidin ekspresyonu artırılarak veya azaltılarak sonuçla bitkinin imidazolinon herbisite direnci artırılabilir veya azaltılabilir. Tercihen bitkinin imidazolinon herbisite direnci, bir IMI polinükleotit ekspresyonu artırılarak artırılır. Bir IMI polinükleotidin ekspresyonu bu alanda uzman olanlar tarafından bildirilen herhangi bir yöntemle modifiye edilebilir. IMI polinükleotitlerin ekspresyonunu arttıran yöntemleri, bitkinin transgenik olduğu veya olmadığı durumda kullanılabilir. Bitkinin transgenik olduğu durumlarda, bitki yukarıda açıklanan IMI kodlayan nükleik asitlerin herhangi birini içeren bir vektörle dönüştürülebilir veya bitki, örneğin bitkideki endojen IMI polinükleotitlerin ekspresyonunu yöneten bir promotörle dönüştürülebilir.

Böyle bir promotör dokuya spesifik olabilmekte veya gelişimsel olarak düzenlenebilmektedir. Alternatif olarak, transgenik olmayan bitkiler bir doğal promotör uyarılarak modifiye edilen endojen IMI polinükleotit ekspresyonuna sahip olabilir. Hedef bitkilerde SEKANS KİMLİK NO:1, SEKANS KİMLİK NO:3 veya SEKANS KİMLİK NO:5'i içeren polinükleotitlerin ekspresyonu sınırlandırılmamak üzere aşağıdaki örneklerden biriyle sağlanabilir: (a) yapısal promotör, (b) kimyasalla uyarılan promotör ve (c) örneğin çinko parmak türevli

transkripsiyon faktörleriyle tasarlanmış promotör aşırı ekspresyonu (Greisman ve Pabo, 1997 Science 275:657).

IMI polinükleotidin transkripsiyonu Greisman ve Pabo, 1997 Science 275:657 tarafından
5 açılan ve Sangamo Biosciences, Inc. tarafından imal edilen çinko parmak türevli
transkripsiyon faktörleri (ZFP'ler) kullanılarak modüle edilebilmektedir. Bu ZFP'ler hem bir
DNA tanıma alanı hem de bir IMI nükleik asit gibi bir hedef nükleik asidin aktivasyonuna veya
baskılanmasına neden olan işlevsel bir alan içerir. Bu nedenle, yukarıda açılan IMI
10 polinükleotit promotörlerini spesifik olarak tanıyan ve bir bitkide IMI polinükleotit
ekspresyonunu azaltmak veya arttırmak için kullanılabilen, böylece bitkinin herbisit direncini
modüle eden aktive edici ve baskılayıcı ZFP'ler yaratılabilir.

Yukarıda daha ayrıntılı olarak açıklandığı gibi, mevcut doküman yöntemleriyle üretilen
bitkiler tek çenekli veya çift çenekli olabilir. Bitkiler örneğin mısır, buğday, çavdar, yulaf,
15 tritikale, pirinç, arpa, soya fasulyesi, fıstık, pamuk, kolza, kanola, manihot, biber, ayçiçeği,
kadife, solanaceae bitkileri, patates, tütün, patlıcan, domates, Vicia türleri, bezelye, yonca,
kahve, kakao, çay, Salix türleri, palmiye ağacı, Hindistan cevizi, çok yıllık otlar ve yem bitkileri
arasından seçilebilir. Tercih edilen bir düzenlemede bitki bir buğday bitkisidir. Yem bitkileri
arasında sınırlanmamak koşuluyla Buğday çimi, Kanarya otu, Erişte otu, Arpa, Mavi ot,
20 Ayrık otu, Yonca, Salfoyn, Gazal boynuzu, Melez Tıbbi Kızılcık Yonca ve Sarı Yonca yer alır

Tercihen, bitki bir buğday bitkisidir. Yukarıda açılan yöntemlerin her birinde, bitki
hücreleri arasında sınırlanmamak koşuluyla bir protoplast, gamet üretici hücre,
yeniden bir tam bitki üreten bir hücre yer alır. Tercihen, bitki bir buğday bitkisidir. Burada
25 "transgenik" terimi en az bir rekombinant polinükleotidin tamamı veya bir kısmı içeren
herhangi bir bitki, bitki hücresi, kallus, bitki dokusu veya bitki bölümünü belirtmektedir.
Birçok durumda rekombinant polinükleotidin tamamı veya bir kısmı sonraki kuşaklara
iletilmek üzere kalıcı bir şekilde bir kromozom içine veya kalıcı bir kromozom dışı bölgeye
katılır.

Yukarıda açıklandığı gibi mevcut doküman, bir buğday bitkisinin veya tohumunun
imidazolinon direncini bitkinin veya tohumun yabancı tip bir çeşidine kıyasla arttırmak için
bileşimleri ve yöntemleri açıklamaktadır. Tercih edilen bir düzenlemede, bir buğday bitkisinin

veya tohumunun imidazolinon direnci, bitkinin veya tohumun tercihen yaklaşık olarak 10-400 g ai ha⁻¹, daha tercihen 20-160 g ai ha⁻¹ ve en çok tercih edilen durumda 40-80 g ai ha⁻¹ imidazolinon herbisit uygulamasına dayanabileceği şekilde arttırılabilmektedir. Burada bir imidazolinon herbisit uygulamasına "dayanmak", bitkinin böyle bir uygulamayla ölmeyeceği veya zarar görmeyeceği anlamında kullanılmaktadır

Ayrıca burada bir buğday bitkisinin civarındaki zararlı otları kontrol etmek için, zararlı otlara ve buğday bitkisine bir imidazolinon herbisit uygulanması içeren bir yöntem açıklanmaktadır, burada buğday bitkisinin imidazolinon herbisite direnci buğday bitkisinin yabancı tip bir çeşidine kıyasla artar ve burada bitki bir veya daha fazla IMI nükleik asit içerir. Bitki farklı genomlar üzerinde bulunan veya farklı genomlardan elde edilen birden fazla IMI nükleik asit içerebilmektedir. Bitki Imi1 olmayan bir nükleik asit içermektedir. İmidazolinona direnci arttırılmış buğday bitkileri temin edilerek, bitki büyümesini arttırmak ve besinler için rekabeti azaltmak üzere buğday bitkilerini zararlı otlardan korumak için çok çeşitli formülasyonlar kullanılabilir. Bir imidazolinon herbisit kendi başına burada açıklanan buğday bitkilerini çevreleyen alanlardaki zararlı otların kontrolü için çiçeklenme öncesinde, çiçeklenme sonrasında, ekim öncesinde ve ekim sırasında kullanılabilir veya başka katkı maddeleri içeren bir imidazolinon herbisit formülasyonu kullanılabilir. İmidazolinon herbisit bir tohum işlemi olarak da kullanılabilir. Bir imidazolinon herbisit formülasyonunda bulunan katkı maddeleri arasında başka herbisitler, deterjanlar, adjuvantlar, yayma maddeleri, yapıştırıcı maddeler, stabilize edici maddeler veya benzeri yer alır. İmidazolinon herbisit formülasyonu sıvı veya kuru bir terkip olabilir ve bunlar arasında sıvı ve katı olmak koşuluyla akabilen tozlar, emülsifiye edilebilir konsantreler ve sıvı konsantreler yer alır. İmidazolinon herbisit ve herbisit formülasyonları geleneksel yöntemlere göre, örneğin, püskürtme, sulama, tozlama veya benzeriyle uygulanabilir.

Buluş ayrıca kapsamı herhangi bir şekilde sınırlandırılmamış olarak yorumlanmaması gereken aşağıdaki örneklerle açıklanmaktadır

ÖRNEKLER ÖRNEK 1

Dirençli Gunner Buğday Hatlarının Mutagenesi ve Seçimi

İmidazolinona dirençli buğday mutasyon ve geleneksel seçim ve üretimle elde edildi. Başlangıç tohum mutagenezi aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Sert kış yaz buğday çeşidi Gunner tohumları önceden musluk suyuna daldırıldı.

5 2. Musluk suyu boşaltıldıktan sonra, tohum kabına %0.03 Etilmetan sülfonat (EMS) ve %0.02 Dietil Sülfat (DES) çözeltisi döküldü. Kap iki saatlik işlem boyunca her 10-15 dakikada bir çalkalandı.

3. EMS ve DES çözeltisi boşaltıldı ve 0.001M fosfat tampon içinde %0.02 sodyum azit çözeltisi ilave edildi.

10 4. Üçüncü aşama tekrarlandı.

5. Daha sonra tohumlar musluk suyuyla durulandı ve kurutuldu. Kurutulduktan sonra tohumlar ekildi.

6. Ekilen tohumlar M1 kuşağı temsil ediyordu. M1 bitkilerinden toplanan tohumlar M2 kuşağı temsil ediyordu.

15

M2 tohumu ekildi ve çıkan bitkiler duyarlı buğday öldürecek oranlarda imazamoks herbisitle yaklaşık olarak 2-3 yaprak aşamasında işleminden geçirildi. Toplam dokuz herbisite toleranslı bitki seçildi ve yeniden bir serada ekildi. Dokuz bitkinin her birinden döl tohumu toplandı. Bu tohum bir serada ekildi. Bitkilere imazamoks herbisit 80 g. a.i./ha + %1.0 Sun-It adjuvant (hacim/hacim) seviyesinde püskürtüldü ve tolerans açısından değerlendirildi. HRS 198205 ve HRS198208 olarak adlandırılan iki hattın toplam on iki bitki en toleranslı olarak belirlendi. Her hatta herbisit toleransı için ayrı ayrı, tek bir yarım baskın genle tutarlı ve 24 bitkinin döl tohumu toplandı ve değerlendirme ve seçim için yine bir serada ekildi. Bitkilere imazamoks herbisit 80 g. a.i./ha. + %1.0 Sun-It adjuvant (hacim/hacim) seviyesinde püskürtülerek en yüksek tolerans seviyesini gösteren alt hatlar belirlendi. Ayrıca alt hatların Gunner'in fenotipik özelliklerine sahip olduğu belirlendi.

25

HRS198205 ve HRS198208'in döl tohumu toplandı ve tarlaya ekildi. Tarla parsellerine imazamoks herbisit 80 g. a.i./ha. + %1.0 Sun-It adjuvant (hacim/hacim) seviyesinde püskürtüldü. Her hattaki bütün bitkiler imazamoks herbisite aynı kabul edilebilir tolerans seviyesini gösterdi. Bu sonuçlar temelinde, beş HRS198205 alt hattının parsellerinden toplanan tohumlar AP205CL (yukarıda Gunner IMI 205 olarak geçmektedir) olarak

30

adlandırılan tek bir parti halinde birleştirildi. Ayrıca beş HRS198208 alt hattındaki parsellerinden toplanan tohumlar AP602CL (yukarıda Gunner IMI 208 olarak geçmektedir) olarak adlandırılan tek bir parti halinde birleştirildi. Tohum arttırmalar birkaç yerde yapıldı. Bütün tohum arttırmalarına imazamoks herbisit 40 g. a.i./ha + %0.25 (hacim/hacim) noniyonik yüzey aktif madde seviyesinde püskürtüldü. Hiç herbisite duyarlı bitki gözlemlenmedi. Ayrıca bütün bitkiler Gunner çeşidi bitkilerle karşılaştırılabilirdi.

ÖRNEK 2

10 ***Dirençli Madsen Buğday Hatlarındaki Mutagenез ve Seçilmesi***

Yumuşak beyaz kış buğdayı çeşidi Madsen tohumları önceden musluk suyuna daldırıldı. Musluk suyu boşaltıldıktan sonra tohum kabına %0.03 EMS ve %0.02 DES çözeltisi döküldü. Kap iki saatlik işlem boyunca her 10-15 dakikada bir çalkalandı. EMS ve DES çözeltisi boşaltıldı ve 0.001M fosfat tampon içinde %0.02 sodyum azit çözeltisi ilave edildi. Kap iki saatlik işlem boyunca her 10-15 dakikada bir yeniden çalkalandı. Tohumlar musluk suyunda durulandı ve kurutuldu. Kurutulduktan sonra tohumlar ekildi. Ekilen tohumlar M1 kuşağına temsil ediyordu. M1 bitkilerinin kendi kendine tozlanmasına izin verildi ve M2 tohumları bir yıl olarak toplandı. Yaklaşık 0.2 hektar M2 tohumu tarlaya ekildi ve elde edilen bitkiler 40g. a.i./ha imazamoks oranıyla işleminden geçirildi. On iki M2 bitkisinin toleransı olduğu saptandı. Bu bitkiler kazılarak çıkarıldı ve vernalizasyon ve M3 tohum üretimi için Pullman, WA'ya gönderildi. Her M2 bitkisinden M3 tohumları serada ekildi ve elde edilen bitkiler 8 hafta vernalize edildikten sonra 80 g. a.i./ha İmazamoksla işleminden geçirildi. Bitkiler gözlemlenen tolerans seviyeleri temelinde seçildi ve tohum üretimi için başka bir yere taşındı. Bir M2 olarak 40 g/ha imazamoksa toleransı olarak seçilen Madsen1 adlı verilen M2:3 hattında, M3 dölüne uygulanan 80 g/ha oranında imazamoksa toleransı olduğu teyit edildi. Sonraki moleküler karakterizasyon Madsen1'in imidazolinon herbisitlerine tolerans verdiği bilinen A/s2 AHAS gende bir mutasyona sahip olduğunu ortaya koydu.

30 **ÖRNEK 3**

AP205CL ve AP602CL Buğday Bitkilerinin İmidazolinon Herbisitlere Toleransı

Hem AP205CL hem de AP602CL buğday bitkileri imidazolinon herbisitlere, bu herbisitler tarafından *in vitro* inhibisyona dirençli olan AHAS enzimin bir mutasyonuna bağlı olarak toleranslıdır. Bu, yabancı tip buğdaydan ekstrakte edilen AHAS enzimin aktivitesinin herbisite toleranslı AP205CL bitkilerinden (Şekil 5A) ve AP602CL bitkilerinden (Şekil 5B) ekstrakte edilen AHAS aktivitesiyle karşılaştırılabilir. Şekil 4'teki veriler inhibe edilmemiş aktivitenin bir yüzdesi olarak ifade edilir. Yabancı tip Gunner buğdaydan AHAS enzimi imidazolinon herbisit imazamoksun düşük bir konsantrasyonunun (1 M) varlığında aktivitede yüzde 1 ila 35 azalma gösterir. Bu aktivite daha yüksek herbisit konsantrasyonlarında (100 M) enzimin hemen hemen yüzde 100 inhibisyona kadar düşmeye devam eder. Buna karşılık herbisite toleranslı AP205CL bitkilerinden ekstrakte edilen AHAS enzimi 1 M imazamoks konsantrasyonunda aktivitesinin hemen hemen yüzde 90'ini korur ve daha yüksek (50 M ila 100 M) konsantrasyonlarda aktivitesinin yaklaşık olarak üçte birini korur. Herbisite toleranslı AP602CL bitkilerinden ekstrakte edilen AHAS enzim 1 M imazamoks konsantrasyonunda aktivitesinin hemen hemen yüzde 80-100'ünü ve daha yüksek (50 M ila 100 M) konsantrasyonlarda aktivitesinin hemen hemen yarısını korur. Bu aktivite seviyeleri, toleranslı buğday bitkilerinin, seçim işlemi sırasında (Örnek 1) gözlemlendiği gibi imazamoks uygulamasına rağmen hayatta kalmasını sağlamak için yeterlidir.

ÖRNEK 4

Madsen Buğday Bitkilerinin İmidazolinon Herbisitlere Toleransı

Madsen1 bir sera çalışmasında 40 ve 80 g/ha imidazolinon herbisit imazamoksa tolerans açısından değerlendirildi. Duyarlı buğday kültivarı Teal kontrol olarak kullanıldı. Değerlendirme işleminden 14 gün sonra yapıldı. Hasar 0-9 ölçeğinde değerlendirildi, 0 hiç hasar yok anlamına ve 9 bitki ölümü anlamına geliyordu. Şekil 6A'da sunulan veriler Madsen1'in imazamoksa tolerans olduğunu göstermektedir.

Madsen1'deki tolerans AHAS enzimdeki onu imidazolinon herbisitlerle inhibisyona dirençli kılan bir mutasyona bağlı olduğu için, yabancı tip bitkilerden (tolerans için mutasyonu olmayan) ekstrakte edilen AHAS'ın *in vitro* aktivitesi değişen konsantrasyonlarda bir imidazolinon (IMI) herbisit varlığında toleranslı bitkilerden ekstrakte edilen *in vitro* AHAS aktivitesiyle karşılaştırılabilir. Madsen1 yabancı tip Madsen çeşidiyle karşılaştırıldı. Sonuçlar Şekil 6B'de gösterilmektedir. Şekil 6B'de imazamoks konsantrasyonu arttıkça, inhibe edilmemiş AHAS enzim aktivitesinin yabancı tip hatlarda Madsen1'dekinden daha hızlı azaldığı

gösterilmektedir. 100 µM imazamoksta kalıtımın inhibe edilmemiş AHAS Madsen1’de herbisite toleransı bir yanıt sağlamak için yeterlidir.

ÖRNEK 4

5

AHAS Enzim Aktivitesini Lös in ve Valinle Geri Besleme İnhibisyonu

AHAS’ın dallanma zincirli amino asitler tarafından geri besleme inhibisyonuna tabi tutulduğu bilinmektedir. Valin ve lös in kombinasyon halinde özellikle etkili inhibitörlerdir. 10 İncelendiğinde, yabani tip çeşit Gunner, AP205CL ve AP602CL’den ekstrakte edilen AHAS enzimler valin ve lös in kombinasyonu ile inhibisyonun karşılaştırılabilir modellerini gösterdi (Şekil 7A ve 7B).

SEKANS LİSTESİ

15

<110> NORTHWEST PLANT BREEDING COMPANY

<120> İMİDAZOLİNON HERBİSİTLERİNE KARŞI DİRENCİ ARTTIRILMIŞ BUĞDAY BİTKİLERİ

20

<130> 32383PEPWO1

<140> EP13151840.9

<141> 2013-01-18

25

<150> 60/311,141

<151> 2001-08-09

<160> 11

30

<170> PatentIn versiyon 3.5

<210> 1

<211> 411

<212> DNA

35

<213> Triticum aestivum

<400> 1

40

tgctgtggcc aaccaggtg ttacattgt tgacattgat ggtgatggta gtttctcat 60

gaacattcag gaggggcgt tgatccgcat tgagaacctc ccagtgaagg tgatgatatt 120

gaacaaccag catctgggaa tgggtggtgca gtgggaggat aggttttaca aggccaatcg 180

45

ggcgcacaca taccttggtgca accagaaaa tgagagtggag atatattccag attttgtgac 240

gattgctaaa ggattcaacg ttccagcagt tcgagtgacg aagaagagcg aagtcactgc 300

agcaatcaag aagatgcttg agaccccagg gccatacttg ttggatatca tagtcccgca 360

5 tcaggagcac gtgctgccta tgatcccaaa cgggtggtgct tcaaggaca t 411

<210> 2

<211> 168

10 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 2

15 Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ser

1 5 10 15

Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala

20 20 25 30

Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser
35 40 45

Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu
50 55 60

Pro Val Lys Val Met Ile Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val
65 70 75 80

Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu
85 90 95

Gly Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile
100 105 110

Ala Lys Gly Phe Asn Val Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu
115 120 125

Val Thr Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu
130 135 140

Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro
145 150 155 160

Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met
165

25 <210> 3

<211> 511

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

30 <400> 3

```

gcggctcagt attacactta caagcggcc aaggcagtggt tgtcttcac cggtttgggt      60
gcaatgggat ttgggttgcc agctgcagct ggcgtgctg tggccaaccc aggtgttaca      120
gttgttgaca ttgatgggga tggtagtttc ctcatgaaca ttcaggagtt ggcgttgatc      180
cgtattgaga acctccagc gaaggtgatg atattgaaca accagcatct gggaatgggt      240
gtgcagtggt aggataggtt ttacaaggcc aaccgggccc acacatacct tggcaaccca      300
gaaaatgaga gtgagatata tccagatttt gtgacgattg ctaaaggatt caacgttcgg      360
gcagttcgtg tgacgaagaa gagcgaagtc actgcagcaa tcaagaagat gcttgagacc      420
ccaggggccat acttgttggg tatcattgtc ccgcacatcagg agcacgtgct gcctatgatc      480
ccaaacgggtg gtgcttttaa ggacatgatc c                                     511

```

<210> 4
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 4

Ala	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser	Ser	Ser
1				5				10					15		
Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser
		35					40					45			
Phe	Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Glu	Asn	Leu
	50					55					60				
Pro	Val	Lys	Val	Met	Ile	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Val
65					70					75					80
Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Tyr	Leu
			85						90					95	
Gly	Asn	Pro	Glu	Asn	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val	Thr	Ile
		100						105					110		
Ala	Lys	Gly	Phe	Asn	Val	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Ser	Glu
		115					120					125			
Val	Thr	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu
	130					135					140				
Leu	Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met	Ile	Pro
145					150					155					160

<210> 5
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 5

```

ggctcagtat tacacttaca agcggccacg gcagtggctg tcttcacccg gtttgggtgc      60
aatgggattt gggttgccag ctgcagctgg cgctgctgtg gccaaaccag gtgttacagt      120
tgttgacatt gatggggatg gtagtttccct catqaacatt caggagttgg cgttgatccg      180
tattgagaac ctcccagtga aggtgatgat attgaacaac cagcatctgg gaatggtggt      240
gcagtgggag gataggtttt acaaggccaa ccggggcgac acataccttg gcaaccaga      300
aaatgagagt gagatatatc cagattttgt gacgattgct aaaggattca acgttcoggc      360
agttcgtgtg acqaagaaga gcgaagtcac tqcagcaatc aagaagatgc ttqagacccc      420
agggccatac ttgttgata tcattgtccc gcacagagag cacgtgctgc ctatgatccc      480

aaacggtggt gcttttaa      498

```

<210> 6

<211> 168

5 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

10 <400> 6

```

Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ser
 1              5              10              15

```

Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly Ala Ala
 20 25 30
 Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp Gly Ser
 35 40 45
 Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu Asn Leu
 50 55 60
 Pro Val Lys Val Met Ile Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met Val Val
 65 70 75 80
 Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr Tyr Leu
 85 90 95
 Gly Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val Thr Ile
 100 105 110
 Ala Lys Gly Phe Asn Val Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys Ser Glu
 115 120 125
 Val Thr Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro Tyr Leu
 130 135 140
 Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met Ile Pro
 145 150 155 160
 Asn Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met
 165

5 <210> 7
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

10 <220>
 <223> Yapay Sekans ın Aç klaması : Örnekleyici saklanm ş peptit
 <400> 7

15 Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly Thr
 1 5 10

20 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Yapay Sekans

25 <220>
 <223> Yapay Sekans ın Aç klaması : Örnekleyici saklanm ş peptit
 <400> 8

	Gln Trp Glu Asp
	1
5	
	<210> 9
	<211> 19
	<212> PRT
	<213> Yapay Sekans
10	
	<220>
	<223> Yapay Sekans ını Aç ıklamas ı : Örnekleyici saklanm ış peptit
	<400> 9
15	
	Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu
	1 5 10 15
20	Thr Arg Ser
	<210> 10
25	<211> 6
	<212> PRT
	<213> Yapay Sekans
	<220>
30	<223> Yapay Sekans ını Aç ıklamas ı : Örnekleyici saklanm ış peptit
	<400> 10
	Ala Phe Gln Glu Thr Pro
35	1 5
	<210> 11
	<211> 5
40	<212> PRT
	<213> Yapay Sekans
	<220>
	<223> Yapay Sekans ını Aç ıklamas ı : Örnekleyici saklanm ış peptit
45	
	<400> 11
	Ile Pro Ser Gly Gly
50	1 5
55	

Şekil 1A

Gunner IM11 205'in kısmi nükleotit sekans (SEK KİM NO:1)

```
(3)      TGCCTGUGGCCAACCCAGGTGTTACAGTTGTTCAATTTGATGCTGATGGT
(51)     AGTTTCCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGCAATGAGAACT
(101)    CCCAGTGAAGGTGATGATATTGAAACAACCCAGCATCTGGGAATGGTGGTGC
(151)    AGTGGGAGGATAGGTTTTACAGGCCAATCGGGGCGCACACATACTTGGC
(201)    AAGCCAGAAAAACAAGTGGAGATATATCCAGATTTTGTGACCAATGGCTAA
(251)    AGCATTC AACCTTCCAGCAGTTTCGAGTGAACGAAGAAGAGCGGAAGTCACTG
(301)    CAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGCCCATACTTGTTCGATATC
(351)    ATAGTCCCGCATCAGGAGCAAGTGCTGCCTATGATCCCAAAAGGTGGTGC
(401)    TTCCAAGGACAT (412)
```

Şekil 1B

Gunner IM11 205'in kısmi olarak belirlenen nükleotit sekans (SEK KİM NO:2)

```
(1)      AQYTTYKRPRQWLSSSGLGAMGFGLPAAAGAAVANPGVTVVDITGSGSFL
(51)     MNQGEHALIKTENLPVKVMTLNNQHIGMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNPE
(101)    NESEIYFDVFTLAKGFNVPAVRVTAKSEVTAAIKKMLETPGFYLLDILVP
(151)    HQEHVLEMIENGGAPKDM
```

Şekil 2A

Gunner IMI2 208'in kısımlı nükleotit sekansı (SEK KİM NO:3)

```
(37)      GCGGCTCAGTATTACACCTTACAAGCGGCCACGGCCAGTGGCTGTCTTCAAT
(51)      CCGGTTTGGGTTGCAATGGGATTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCT
(101)     GTGGCCAAACCCAGGTGTTACAGTTTGTGACATTTGATTCGGATGGTAGTTT
(151)     CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCAG
(201)     TGAAGGTGATGATAATTGAACAACCCAGCATCTGGGAATGCTGCTGCACTGC
(251)     GAGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCCACACATACCTTGGCAACCC
(301)     AGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTCCCTAAAGGAT
(351)     TCAACGTTCCGGCCAGTTCCGTGTGACGAAGAAGAGCGGAAGTCACTGCAGCA
(401)     ATCAAGAAGATGCTTGACAGCCCAAGGGCCATACCTTGTTGGAGATCATTGT
(451)     CCGGCATCAGGAGCCAGCTGCTGCCATGATCCCAAACGGTGGTGGCTTTTA
(501)     AGGACATGATCC (512)
```

Şekil 2B

Gunner IMI2 208'in kısımlı olarak belirlenen amino asit sekansı (SEK KİM NO:4)

```
(1)      AQYYTYKRPRQWLSSSGLGAMGFGLFAAAGAAVANPGVTWVDITGDGSEF
(50)     LMNIQELALIRIENLSPVKVMIENNQHLSGMVWQWEDRPFYKANRASTYLGNE
(100)    ENESEIYDFVTIAKGFNVPAVRVTKESEVTPAIAKKMLETPGPFYLDILIV
(150)    PQQEHVLPMPNGGAFKEM
```

Şekil 3A

Madsen IMI2'nin kısmi nükleotit sekansı (SEK KİM NO:5)

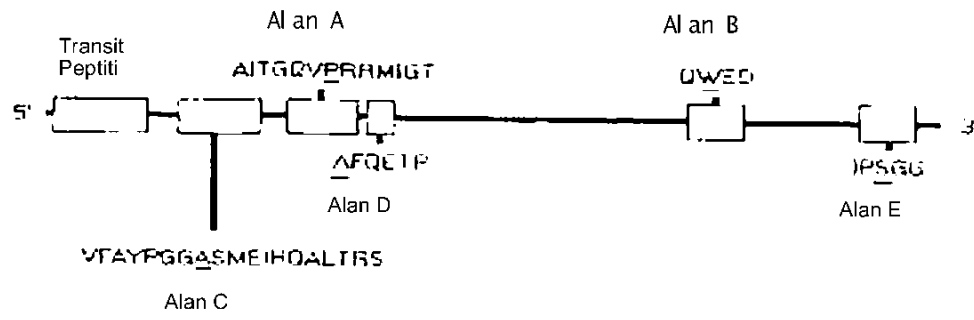
```
(3)      CGCTCAGTATTACACTTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCATC
(51)     CGGTTTGGGTGCAATGGGATTTGGGTTGCCAGCTGCAGCTGGCGCTGCCG
(101)    TGGCCAACCCAGGTTTACAGTCTGTGACATTCAATGGGGATCGTACTTTC
(151)    CTCATGAACATTCAACCACTTGGCGTGTGATCCGTATTGAGAACCTCCCACT
(201)    GAACCTGATGATATTGAACAACCAAGCATCTGGCAATCGTGGTGCACCTGGG
(251)    AGGATAGGTTTTACAAGCTCAACCGGGGGCACACATACCTTGGCAAGCCA
(301)    GAAATGACAGTGAAGATATATCCAGATTTTGUGACGATTGGTAAAGGATT
(351)    CACCTTCGGGCACTTCGTGTGACGAAGAACACCGAAGTCACTGCAGCAA
(401)    TCAAGAAGATGCTTGAGACCCCAAGGCCATACTTGTTCGATATCATTTGTC
(451)    CCGCATCAGCAGCACGTTGCTGCTATCATTCACAAACGGTGGTCTTTTAA
```

Şekil 3B

Madsen IMI2'nin kısmi olarak belirlenen amino asit sekansı (SEK KİM NO:6)

```
(1)      APTYYKYKRPQWLSSSGLCAMCFGLPAAAGAAVANFQVTVVVDIDGDSF
(51)     LMNTQELALIRLENLQVKVMLNNQHLMVVQWEDRFYKANRAHTYLGNP
(101)    ENESEIYPLFVTIAKGFNVFAVRVTEKSEVTAAIKKMLETPGPYLLDITV
(151)    PQQEHVLPMTFNCGAFKDM
```

Şekil 4



Şekil 5A
Yabani tip buğdayda (çeşitli Gunner) ve AP205CL’de ABAS Enzim Aktivitesinin in-
hibisyonu

Imazamox Kons. (µM)	Gunner Yabani tip	AP205CL
100.0	4	28
50.0	7	36
25.0	8	37
13.0	12	41
6.0	19	47
3.0	34	58
2.0	53	70
1.0	77	87

Şekil 5B
Yabani tip buğdayda (çeşitli Gunner) ve AP602CL’de ABAS Enzim Aktivitesinin in-
hibisyonu

Imazamox Kons. (µM)	Gunner Yabani tip	AP602CL
100.0	15.1	43.5
50.0	16.5	46.3
25.0	25.4	49.6
12.5	43.4	53.7
6.3	59.6	61.9
3.1	83.6	71.8
1.6	99.8	84.3

Şekil 5C
Yabani tip buğday (çeşitli Madsen) ve Madsen1’de ABAS Enzim Aktivitesinin
inhibisyonu

µM IMI Herbisit	% Engellenmemiş ABAS Aktivitesi	
	Madsen Yabani Tip	Madsen1
100.0	0.0	22.2
50.0	1.7	24.5
25.0	2.7	25.3
12.5	6.0	27.7
6.3	12.0	34.8
3.1	25.4	42.0
1.6	42.3	53.6
0.8	64.2	72.2

Şekil 6

Bir Teal buğday kontrolü olarak Imazamox ile Madsen1'in azaltılmış yaralanması

Buğday kültürü	Yaralanma puanı	
	40g/ha Imazamox	80g/ha Imazamox
Madsen1	3.3	5.1
Teal Kontrolü	8.9	9.0

Şekil 7A

Yabani tip buğday (çeşitli Gunner) ve AP205CL’de Lösin ve Valinle AHAS enzim aktivitesinin geribildirim inhibisyonu

Lösin & Valin Kons. (μM)	Gunner Yabani tip	AP205CL
1000.0	42	44
500.0	48	48
250.0	56	50
125.0	65	58
63.0	75	70
31.3	83	82
15.6	92	90
7.8	98	95

Şekil 7B

Yabani tip buğday (çeşitli Gunner) ve AP206CL’de Lösin ve Valinle AHAS enzim aktivitesinin geribildirim inhibisyonu

Lösin & Valin Kons. (μM)	Gunner Yabani tip	AP602CL
1000.0	46.9	48.7
500.0	53.6	49.4
250.0	65.9	56.7
125.0	74.5	68.2
63.0	82.4	79.5
31.3	89.3	86.6
15.6	98.6	93.1
7.8	102.8	98.7