

Ця заявка заявляє пріоритет попередньої заявки США №60/311,180, поданої 9 серпня 2001р.

Даний винахід у цілому стосується рослин, які мають підвищену резистентність до імідазолінових гербіцидів. Тобто даний винахід стосується пшеничних культур, одержаних шляхом мутагенезу та кросбридингу і перетворення, які мають підвищену резистентність до імідазолінових гербіцидів.

Синтаза ацетогідроксіоцтової кислоти (AHAS; EC 4.1.3.18) є першим ферментом, який каталізує біохімічний синтез амінокислот з розгалуженими ланцюгами валіну, лейцину та ізолейцину (Singh B. K., 1999 Biosynthesis of valine, leucine and isoleucine in: Singh B. K. (Ed) Plant amino acids. Marcel Dekker Inc. New York, New York. Pg 227-247). AHAS є місцем дії чотирьох різних за структурою груп гербіцидів, включаючи сульфонілсечовини (LaRossa RA and Falco SC, 1984 Trends Biotechnol. 2:158-161), імідазоліони (Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:545-546), триазолопіримідини (Subramanian and Gerwick, 1989 Inhibition of acetolactate synthase by triazolopyrimidines in (ed) Whitaker JR, Sonnet PE Biocatalysis in agricultural biotechnology. ACS Symposium Series, American Chemical Society. Washington, D.C. Pg 277-288) та піримідилоксibenзоати (Subramanian et al., 1990 Plant Physiol 94: 239-244.). Імідазолінові та сульфонілсечовинні гербіциди широко застосовують у сучасному сільському господарстві завдяки їхній ефективності при дуже низьких нормах внесення та відносній нетоксичності для тварин. Шляхом інгібування активності AHAS ці групи гербіцидів перешкоджають ростові та розвиткові чутливих до них рослин, включаючи багато видів бур'янів. Прикладами імідазолінових гербіцидів серійного виробництва є PURSUIT® (імазетапір), SCEPTER® (імазахін) та ARSENAL® (імазапір). Приклади сульфонілсечовинних гербіцидів є хлорсульфурон, метсульфурон-метил, сульфометурон-метил, хлоримурон-етил, трифенсульфурон-метил, трибенурон-метил, бенсульфурон-метил, нікосульфурон, етаметсульфурон-метил, римсульфурон, трифлусульфурон-метил, триасульфурон, примісульфурон-метил, циносульфурон, амідосульфурон, флузасульфурон, імазосульфурон, піразосульфурон-етил та галосульфурон.

Завдяки їх високій ефективності та низькій токсичності, імідазоліновим гербіцидам віддають перевагу, коли йдеться про нанесення шляхом розпилення над широкими площами рослинних культур. Можливість розпилення гербіциду над великими площами рослинних культур знижує витрати, пов'язані зі створенням плантацій та доглядом за ними і зменшує потребу в підготуванні місця до застосування таких хімікатів. Розпилення над потрібними толерантними видами в результаті також забезпечує можливість досягнення максимального врожаю потрібних культур завдяки відсутності конкуруючих видів. Однак можливість застосування таких способів розпилення залежить від наявності резистентних до імідазолінону видів потрібних рослин на площі розпилення.

Серед основних сільськогосподарських культур деякі види зернобобових, такі як соя, мають природну резистентність до імідазолінових гербіцидів завдяки їх здатності до швидкого засвоєння гербіцидних сполук (Shaner and Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471). Інші культури, такі як кукурудза (Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886) та рис (Barrette et al., 1989 Crop Safeners for Herbicides, Academic Press New York, pp. 195-220), певною мірою є чутливими до імідазолінових гербіцидів. Розбіжності в чутливості до імідазолінових гербіцидів залежать від хімічної природи конкретного гербіциду та характеру метаболізму сполуки від токсичної до нетоксичної форми в кожній рослині (Shaner et al., 1984 Plant Physiol. 76:545-546; Brown et al., 1987 Pestic. Biochem. Physiol. 27:24-29). Інші фізіологічні розбіжності рослин, такі як абсорбція та транслокація, також відіграють важливу роль у чутливості (Shaner and Robinson, 1985 Weed Sci. 33:469-471).

Культурні сорти, резистентні до імідазолінонів, сульфонілсечовин та триазолопіримідинів, успішно виводилися з застосуванням насіння, мікроспор, пилку та мутагенезу калюсу в *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Glycine max*, and *Nicotiana tabacum* (Sebastian et al., 1989 Crop Sci. 29:1403-1408; Swanson et al., 1989 Theor. Appl. Genet. 78:525-530; Newhouse et al., 1991 Theor. Appl. Genet. 83:65-70; Sathasivan et al., 1991 Plant Physiol. 97:1044-1050; Mourand et al., 1993 J. Heredity 84: 91-96). В усіх випадках резистентність забезпечував єдиний, частково домінуючий ядерний ген. Раніше також були виведені чотири резистентні до імідазолінону пшеничні культури після мутагенезу насіння *Triticum aestivum* L. cv Fidel (Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886). Дослідження успадкування підтвердили, що єдиний, частково домінуючий ген забезпечував резистентність. На основі алельних досліджень автори дійшли висновку, що мутації в чотирьох ідентифікованих лініях містилися в одному місці. Один з генів резистентності культури Fidel було позначено як FS-4 (Newhouse et al., 1992 Plant Physiol. 100:882-886).

Комп'ютерне моделювання тривимірної конформації комплексу AHAS-інгібітора передбачає кілька амінокислот у запропонованій кишені зв'язування інгібітора як місця, де викликані мутації можуть забезпечувати вибірку резистентності до імідазолінонів (Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368). Пшеничні культури, одержані за допомогою деяких із цих раціонально спланованих мутацій у запропонованих місцях зв'язування ферменту AHAS, фактично інгібували специфічну резистентність до єдиного класу гербіцидів (Ott et al., 1996 J. Mol. Biol. 263:359-368).

Про резистентність рослин до імідазолінових гербіцидів також повідомлялося в багатьох патентах. У патентах США №№ 4,761,373, 5,331,107, 5,304,732, 6,211,438, 6,211,439 та 6,222,100 у загальних описах описано застосування зміненого гена AHAS для викликання резистентності до гербіцидів у рослинах і докладно описано деякі резистентні до імідазолінону лінії кукурудзи. У патенті США №5,013,659 описано рослини, які виявляють резистентність до гербіцидів і мають мутації у принаймні одній амінокислоті в одній або кількох збережених ділянках. Описані в ньому мутації кодують або перевернуто резистентність до імідазолінонів та сульфонілсечовин або специфічну до сульфонілсечовини резистентність, але специфічна до імідазолінону резистентність не описується. Крім того, в патенті США №5,731,180 та патенті США №5,767,361 обговорюється виділений ген, який має єдине амінокислотне заміщення в амінокислотній послідовності AHAS однодольних дикого типу, яка в результаті забезпечує специфічну до імідазолінону резистентність.

До цього часу в роботах існуючого рівня техніки не було описано резистентних до імідазолінону пшеничних культур, які містять більше одного зміненого гена AHAS. Так само в роботах існуючого рівня техніки не було описано резистентних до імідазолінону пшеничних культур, які містять мутації в геномах, крім геному, від якого походить ген FS-4. Таким чином, дана галузь потребує ідентифікації генів резистентності до імідазолінону з додаткових геномів. Дана галузь також потребує пшеничних культур, які

мають підвищену резистентність до гербіцидів, таких як імідазолінон, і містять більше одного зміненого гена AHAS. Потрібні також способи контролю над ростом бур'янів поблизу від таких пшеничних культур. Ці композиції та способи дозволяють застосовувати технології розпилення при нанесенні гербіцидів на площі з пшеничними культурами.

Даний винахід забезпечує пшеничні культури, які включають IMI нуклеїнові кислоти, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінонового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Пшеничні культури можуть містити одну, дві, три або більше IMI нуклеїнових кислот. В одному варіанті втілення пшенична культура включає кілька IMI нуклеїнових кислот, які містяться в різних геномах. В оптимальному варіанті IMI нуклеїнові кислоти кодуєть білки, які включають мутацію в консервативній амінокислотній послідовності, вибраній з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е. У ще кращому варіанті мутація міститься в консервативному Домені Е або консервативному Домені С. Забезпечуються також частини рослин та насіння рослин, отримані від описаних авторами пшеничних культур. В іншому варіанті втілення пшенична культура включає IMI нуклеїнову кислоту, яка не є IMI нуклеїноюватою кислотою. IMI нуклеїнова кислота може бути, наприклад, Imi2 або Imi3 нуклеїноюватою кислотою.

IMI нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть включати нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з: полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:1; та полінуклеотиду, комплементарного SEQ ID NO:1.

Рослини даного винаходу можуть бути трансгенними або нетрансгенними. Прикладами нетрансгенних пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінонових гербіцидів є пшенична культура, яка має Номер патентного депонування ATCC РТА-4113; або мутантна, рекомбінантна або піддана генній інженерії похідна рослини з номером патентного депонування ATCC РТА-4113; або будь-якого потомства рослини з номером патентного депонування ATCC РТА-4113; або рослина, яка є потомством будь-якої з цих рослин.

Крім композицій даного винаходу, забезпечується кілька способів. Авторами описано способи зміни толерантності рослини до імідазолінонового гербіциду, які включають зміну експресії IMI нуклеїнової кислоти в рослині. Описано також способи одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінонового гербіциду, які включають перетворення рослинної клітини вектором експресії, що включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, та вирощування рослини з рослинної клітини. Винахід також охоплює спосіб контролю над бур'янами в оточенні пшеничної культури, який включає нанесення імідазолінонового гербіциду на бур'яни та пшеничну культуру, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінонового гербіциду порівняно з сортом пшеничної культури дикого типу, і рослина містить одну або кілька IMI нуклеїнових кислот. У деяких оптимальних варіантах втілення цих способів рослини включають множинні IMI нуклеїнові кислоти, які містяться в різних геномах пшениці.

Фігура 1 показує часткову послідовність кДНК Einkorn IMI3 (SEQ ID NO:1).

Фігура 2 показує часткову послідовність кДНК Einkorn MB порівняно з послідовністю Einkorn дикого типу (SEQ ID NO:2) та узагальнюючу типову послідовність (SEQ ID NO:3).

Фігура 3 є схематичним зображенням консервативних амінокислотних послідовностей в AHAS генах, пов'язаних з резистентністю до різних інгібіторів AHAS. Конкретну амінокислотну ділянку, яка відповідає за резистентність, позначено підкресленням. (Modified from Devine, M. D. and Eberlein, C. V., 1997 Physiological, biochemical and molecular aspects of herbicide resistance based on altered target sites in Herbicide Activity: Toxicity, Biochemistry, and Molecular Biology, IOS Press Amsterdam, p. 159-185).

Фігура 4 є таблицею, в якій показано батьківські лінії пшениці, які використовують для визначення алейного взаємозв'язку між IMI генами.

Фігура 5 є таблицею, в якій показано F2 дані сегрегації, які демонструють розміщення EM2 мутації в геномі А.

Фігура 6 є таблицею, в якій показано різні агрономічні характеристики, на які може впливати ураження гербіцидами в контрольній рослині Einkorn та EM2.

Фігура 7 є таблицею, в якій показано оцінку контрольної рослини Einkorn та EM2 на загальне ураження культури при трьох нормах імазамоксу.

Фігура 8 є таблицею, в якій показано підвищення резистентності до імідазолінонових гербіцидів у сортів пшениці після міжплощинної взаємодії IMI нуклеїнових кислот.

Даний винахід стосується пшеничних культур, частин пшеничних культур та клітин пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінонових гербіцидів. Даний винахід також охоплює насіння, вироблене описаними авторами пшеничними культурами, та способи контролю над бур'янами в оточенні описаних авторами пшеничних культур. Слід розуміти, що вжита в описі та формулі форма однини може означати як однину, так і множину, залежно від контексту, в якому її вжито. Так, наприклад, посилання на "клітину" може означати використання принаймні однієї клітини.

Вжитий авторами термін "пшенична культура" стосується рослини, яка належить до роду *Triticum*. Пшеничні культури даного винаходу можуть належати до роду *Triticum*, включаючи, крім інших, *T. aestivum*, *T. turgidum*, *T. timopheevii*, *T. monococcum*, *T. zhukovskiy* та *T. urartu* і їх гібриди. Прикладами підвиду *T. aestivum*, які охоплюються даним винаходом, є *aestivum* (пшениця звичайна), *compactum* (карликова пшениця), *macha* (пшениця маха), *vavilovi* (пшениця Вавілова), *spelta* та *sphaerococcum* (пшениця спельта). Прикладами підвиду *T. turgidum*, які охоплюються даним винаходом, є *turgidum*, *carthlicum*, *dicoccon*, *durum*, *paleocolchicum*, *polonicum*, *turanicum* та *dicoccoides*. Прикладами підвиду *T. monococcums*, які охоплюються даним винаходом, є *monococcum* (*einkorn*) та *aegilopoides*. В одному варіанті втілення даного винаходу пшенична культура належить до виду *Triticum monococcum*, точніше, партії *Einkorn*.

Термін "пшенична культура" охоплює пшеничні культури на будь-якій стадії стиглості або розвитку, а також будь-які тканини або органи (частини рослин), взяті або одержані від будь-якої подібної рослини, якщо в контексті прямо не вказано іншого. До частин рослин належать, крім інших, стебла, коріння, квітки, насінні зачатки, тичинки, листя, зародки, ділянки меристеми, тканина калюсу, культури пиляка, гаметофіти, спорофіти, пилки, мікроспори, протопласти та ін. Даний винахід також охоплює насіння, вироблене пшеничними культурами даного винаходу. В одному варіанті втілення насіння одержують шляхом

розведення гомозигот для підвищеної резистентності до імідазолінового гербіциду порівняно з насінням сорту пшеничної культури дикого типу.

У даному винаході описано пшеничну культуру, яка включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Вжитий авторами термін "IMI нуклеїнова кислота" стосується нуклеїнової кислоти, яка є мутованою від нуклеїнової кислоти AHAS у пшеничній культурі дикого типу, і яка надає підвищеної резистентності до імідазолінону рослині, в якій вона транскрибується. В одному варіанті втілення пшенична культура включає множинні IMI нуклеїнові кислоти. Вжитий в описі IMI нуклеїнових кислот термін "множинні" стосується IMI нуклеїнових кислот, які мають різні нуклеотидні послідовності і не стосуються простого збільшення кількості однієї IMI нуклеїнової кислоти. Наприклад, IMI нуклеїнові кислоти можуть бути різними через те, що вони походять із різних геномів або містяться в різних геномах пшениці.

Пшеничні культури даного винаходу можуть мати множинні IMI нуклеїнові кислоти з різних геномів, оскільки ці рослини можуть містити більше одного геному. Наприклад, пшенична культура *Triticum aestivum* містить три геноми, які іноді називають геномами A, B та D. Оскільки AHAS є потрібним метаболічним ферментом, то вважається, що геном має принаймні один ген, який кодує фермент AHAS, який зазвичай спостерігається з іншими метаболічними ферментами в гексаплоїдній пшениці, підданий картуванню. Нуклеїнова кислота AHAS у кожному геномі може відрізнитися і зазвичай відрізняється своєю нуклеотидною послідовністю від нуклеїнової кислоти AHAS в іншому геномі. Спеціаліст у даній галузі може визначити геном походження кожної нуклеїнової кислоти AHAS, застосовуючи генетичний кросинг та/або інші способи секвенування або гідролізу екзонуклеази, які відомі спеціалістам. З точки зору цього винаходу, IMI нуклеїнові кислоти, які походять із одного з геномів A, B або D, розпізнають і позначають як нуклеїнові кислоти Imi1, Imi2 або Imi3. Автори не стверджують, що будь-який конкретний клас IMI нуклеїнової кислоти співвідноситься з будь-яким конкретним геномом A, B або D. Наприклад, автори не стверджують, що Imi1 нуклеїнові кислоти співвідносяться з нуклеїновими кислотами геному A, що Imi2 нуклеїнові кислоти співвідносяться з нуклеїновими кислотами геному B і т. д. Позначення Imi1, Imi2 та Imi3 лише вказують, що IMI нуклеїнові кислоти в межах кожного такого класу не виділяються незалежно, тоді як дві IMI нуклеїнові кислоти різних класів виділяються незалежно і, таким чином, можуть походити з різних геномів пшениці.

Клас Imi1 нуклеїнових кислот включає FS-4 ген, як описано в роботі Newhouse et al. (1992 Plant Physiol. 100:882-886). Клас нуклеїнових кислот Imi3 включає описаний нижче IMI3 ген Einkorn. Кожен Imi клас може включати члени інших видів пшениці. Отже, кожен Imi клас включає IMI нуклеїнові кислоти, які відрізняються за своєю нуклеотидною послідовністю, але, незважаючи на це, позначаються як такі, що походять або містяться в одному геномі пшениці, на основі дослідження успадкування, яке відоме спеціалістам у даній галузі.

Відповідно, даний винахід охоплює пшеничну культуру, яка включає одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу, і одну або кілька IMI нуклеїнових кислот вибирають із групи, яка складається з нуклеїнової кислоти Imi1, Imi2 та Imi3. В одному варіанті втілення рослина містить Imi3 нуклеїнову кислоту. В оптимальному варіанті втілення Imi3 нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення рослина містить Imi1 або Imi2 нуклеїнову кислоту.

Вжитий авторами по відношенню до нуклеїнових кислот термін "із" стосується нуклеїнової кислоти, яка "міститься у" або "походить із" конкретного геному. Термін "міститься у" стосується нуклеїнової кислоти, яка міститься в межах конкретного геному. Також вжитий авторами по відношенню до геному термін "походить із" стосується нуклеїнової кислоти, видаленої або виділеної з цього геному. Термін "виділений" детальніше визначено нижче.

В іншому варіанті втілення пшенична культура включає IMI нуклеїнову кислоту, причому ця нуклеїнова кислота не є Imi1 нуклеїноювою кислотою. Термін "не Imi1" стосується IMI нуклеїнової кислоти, яка не належить до Imi1 класу, як описано вище. Одним прикладом не Imi1 нуклеїнової кислоти є полінуклеотидна послідовність, показана в SEQ ID NO:1. Відповідно, в оптимальному варіанті втілення пшенична культура містить IMI нуклеїнову кислоту, яка включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:1.

Даний винахід включає пшеничні культури, які містять одну, дві, три або більше IMI нуклеїнових кислот, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. IMI нуклеїнові кислоти можуть включати нуклеотидну послідовність, вибрану з групи, яка складається з полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:1; та полінуклеотиду, комплементарного SEQ ID NO:1.

Імідазоліновий гербіцид може бути вибраний, крім інших, з-поміж, PURSUIT® (імазетаніпу), CADRE® (імазапіку), RAPTOR® (імазамоксу), SCEPTER® (імазахіну), ASSERT® (імазетабензу), ARSENAL® (імазапір), похідної будь-якого з вищезгаданих гербіцидів або суміші двох або більшої кількості вищезгаданих гербіцидів, наприклад, імазапіру/імазамоксу (ODYSEY®). Точніше, імідазоліновий гербіцид може бути вибраний, крім інших, з-поміж, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-3-хінолінкарбонної кислоти, 5-етил-2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти, 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-метилнікотинової кислоти, та суміші метил 6-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-m-толуату і метил 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-p-толуату. Перевагу віддають застосуванню 5-етил-2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-нікотинової кислоти та 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти. Особливу перевагу віддають застосуванню 2-(4-ізопропіл-4-метил-5-оксо-2-імідазолін-2-іл)-5-(метоксиметил)-нікотинової кислоти.

В одному варіанті втілення пшенична культура містить дві IMI нуклеїнові кислоти, причому нуклеїнові кислоти походять із або містяться в різних геномах пшениці. В оптимальному варіанті однією з двох нуклеїнових кислот є Imi3 нуклеїнова кислота. У ще кращому варіанті Imi3 нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення пшенична культура містить одну

IMI нуклеїнову кислоту, причому нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 у ще одному варіанті втілення пшенична культура містить три або більше IMI нуклеїнових кислот, причому кожна нуклеїнова кислота походить із свого геному. В оптимальному варіанті принаймні одна з трьох IMI нуклеїнових кислот включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:1.

В оптимальному варіанті втілення даного винаходу одна або кілька IMI нуклеїнових кислот, які містяться в рослині, кодує амінокислотну послідовність, яка включає мутацію в домені, збереженому серед кількох білків AHAS. Ці консервативні домени вказуються авторами як Домен А, Домен В, Домен С, Домен D та Домен Е. Фігура 2 показує загальне розташування кожного домену в білку AHAS. Домен А містить амінокислотну послідовність AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO:4). Домен В містить амінокислотну послідовність QWED (SEQ ID NO:5). Домен С містить амінокислотну послідовність VFAYPGGASMEINQALTRS (SEQ ID NO:6). Домен D містить амінокислотну послідовність AFQETP (SEQ ID NO:7). Домен Е містить амінокислотну послідовність IPSGG (SEQ ID NO:8). Даний винахід також передбачає можливість незначних відхилень у консервативних доменах, наприклад, у куколі сериновий залишок у Домені Е заміщено аланіновим залишком.

Відповідно, даний винахід охоплює пшеничну культуру, яка включає IMI нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка має мутацію в консервативному Домені, вибраному з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е. В одному варіанті втілення пшенична культура містить IMI нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, яка має мутацію в Домені Е. В інших оптимальних варіантах втілення мутації в консервативних доменах трапляються в місцях, позначених таким підкресленням: AITGQVPRRMIGT (SEQ ID NO:4); QWED (SEQ ID NO:5); VFAYPGGASMEINQALTRS (SEQ ID NO:6); AFQETP (SEQ ID NO:7) та IPSGG (SEQ ID NO: 8). Оптимальним заміщенням є аспарагін замість серину в Домені Е (SEQ ID NO:8).

Описані авторами пшеничні культури можуть бути або трансгенними пшеничними культурами, або нетрансгенними пшеничними культурами. Вжитий авторами термін "трансгенний" стосується будь-якої рослини, рослинної клітини, калюсу, рослинної тканини або частини рослини, що містить, повністю або частково, принаймні один рекомбінантний полінуклеотид. У багатьох випадках рекомбінантний полінуклеотид, частково або повністю, є стабільно включеним у хромосому або стійкий позахромосомний елемент таким чином, що він передається наступним поколінням. З точки зору винаходу термін "рекомбінантний полінуклеотид" стосується полінуклеотиду, який було змінено, перебудовано або модифіковано шляхом генної інженерії. Прикладами є будь-який клонований полінуклеотид або полінуклеотиди, які є зв'язаними або приєднаними до гетерологічних послідовностей. Термін "рекомбінантний" не стосується змін полінуклеотидів, які є результатом природних подій, таких як спонтанні мутації, або неспонтанного мутагенезу з наступною селекцією. Рослини, які містять мутації, що виникають внаслідок неспонтанного мутагенезу та селекції, вказуються авторами як нетрансгенні рослини і охоплюються даним винаходом. У варіантах втілення, в яких пшенична культура є трансгенною і містить множинні IMI нуклеїнові кислоти, нуклеїнові кислоти можуть походити з різних геномів або з одного геному. Або ж у варіантах втілення, в яких пшенична культура є нетрансгенною і містить множинні IMI нуклеїнові кислоти, нуклеїнові кислоти містяться в різних геномах або в одному геномі.

Прикладом нетрансгенного сорту пшеничної культури, що містить одну IMI нуклеїнову кислоту, є сорт рослини, депонований в ATCC під номером патентного депонування РТА-4113 і вказаний авторами як сорт пшениці Einkorn IMI. Сорт пшениці Einkorn IMI містить Imi3 нуклеїнову кислоту. Часткову нуклеотидну послідовність, що відповідає гену Einkorn IMI, показано в SEQ ID NO:1.

Депонування 2500 зразків насіння сорту пшениці Einkorn IMI було здійснено в Американському зібранні типових культур, Манассас, Вірджинія, 4 березня 2002р. Депонування було здійснено згідно з умовами Будапештської угоди стосовно депонування мікроорганізмів. Депонування було здійснено на термін не менше тридцяти років і не менше п'яти років після отримання ATCC останнього запиту про надання депонованого зразка. Депоноване насіння отримало номер патентного депонування РТА-4113.

Даний охоплює пшеничну культуру, яка має номер патентного депонування РТА-4113; мутантну, рекомбінантну або піддану генній інженерії похідну рослини з номером патентного депонування РТА-4113; будь-яке потомство з номером патентного депонування РТА-4113; та рослину, яке є потомством будь-якої з цих рослин. В оптимальному варіанті втілення пшенична культура даного винаходу додатково має характеристики резистентності до гербіцидів, яка рослини з номером патентного депонування РТА-4113.

Даний винахід також охоплює описані авторами гібриди сорту пшениці Einkorn IMI та іншого сорту пшениці. До інших сортів пшениці належать, крім інших, T. aestivum L. cv Fidel та будь-який сорт пшениці, який містить мутантний ген FS-1, FS-2, FS-3 або FS-4, та інший сорт пшениці, включаючи, крім інших, T. aestivum L. cv Fidel, точніше, сорти Fidel, які містять мутантні гени FS1, FS2, FS3 або FS4. (див. патент США №6,339,184 та патентну заявку США №08/474,832).

Терміни "сорт" та "різновид" стосуються групи рослин у межах виду, які мають певну кількість спільних характеристик або особливостей, які спеціалістами вважаються достатніми для відрізнення одного сорту або різновиду від іншого сорту або різновиду. Жоден з термінів не передбачає, що всі рослини будь-якого даного сорту або різновиду є генетично ідентичними на рівні повного гена або на молекулярному рівні, або що будь-яка дана рослина є гомозиготною в усіх локусах. А сорт або різновид вважається "розведенням гомозигот" для конкретної особливості, якщо в разі, коли гомозиготний сорт або різновид є самозапильованим, усе потомство має цю особливість. У даному винаході особливість виникає внаслідок мутації в гені AHAS пшеничної культури або насіння.

Крім пшеничних культур, даний винахід охоплює виділені IMI білки та нуклеїнові кислоти. Нуклеїнові кислоти включають полінуклеотид, вибраний з групи, яка складається з полінуклеотиду SEQ ID NO:1; полінуклеотиду, який включає принаймні 60 послідовних нуклеотидів SEQ ID NO:1; та полінуклеотиду, комплементарного SEQ ID NO:1. В оптимальному варіанті втілення IMI нуклеїнова кислота включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1.

Термін "білок AHAS" стосується білка синтази ацетогідроксіоцтової кислоти, а термін "IMI білок" стосується будь-якого білка AHAS, який є мутованим від білка AHAS дикого типу і який надає більшої резистентності до імідазолінону рослині, рослинній клітині, частині рослини, насінню рослини або рослинній

тканині, якщо він у них експресується. В оптимальному варіанті втілення ІМІ білок включає поліпептид, який кодується полінуклеотидом SEQ ID NO:1. також вжиті авторами терміни "нуклеїнова кислота" та "полінуклеотид" стосуються РНК або ДНК, яка є лінійною або розгалуженою, одно- або дволанцюговою, або їх гібриду. Термін також охоплює гібриди РНК/ДНК. Ці терміни також охоплюють нетрансльовану послідовність, розміщену на 3' та 5' кінцях кодуєної ділянки гена: принаймні близько 1000 нуклеотидів послідовності перед 5' кінцем кодуєної ділянки, і принаймні близько 200 нуклеотидів послідовності після 3' кінця кодуєної ділянки гена. Менш поширені основи, такі як інозин, 5-метилцитозин, 6-метиладенін, гіпоксантин та інші, також можуть бути використані для антисмислового, dsРНК- та рибозимного спарювання. Наприклад, було виявлено, що полінуклеотиди, які містять С-5 пропінові аналоги уридину та цитидину, зв'язуються з РНК з високою спорідненістю і є сильними антисмисловими інгібіторами експресії генів. Також здійснюють інші модифікації, наприклад, модифікацію фосфодіестерного основного ланцюга або 2'-гідрокси у групі рибози РНК. Антисмислові полінуклеотиди та рибозими можуть складатися повністю з рибонуклеотидів, або можуть містити змішані рибонуклеотиди та деоксирибонуклеотиди. Полінуклеотиди винаходу одержують будь-якими способами, включаючи одержання геномних препаратів, кДНК-препаратів, *in vitro* синтез, RT-ПЛР та *in vitro* або *in vivo* транскрипцію.

"Виділеною" молекулою нуклеїнової кислоти є молекула, яка є практично відокремленою від інших молекул нуклеїнових кислот, присутніх у природному джерелі нуклеїнової кислоти (тобто послідовностей, які кодують інші поліпептиди). В оптимальному варіанті "виділена" нуклеїнова кислота є вільною від деяких із послідовностей, які у природі є фланкуючими на нуклеїновій кислоті (тобто послідовностей, розміщених на 5' та 3' кінцях нуклеїнової кислоти) в її природному репліконі. Наприклад, клоновану нуклеїнову кислоту вважають виділеною. У різних варіантах втілення виділена молекула ІМІ нуклеїнової кислоти може містити менше, ніж приблизно 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 1kb, 0,5kb або 0,1kb нуклеотидних послідовностей, які у природі є фланкуючими на молекулі нуклеїнової кислоти в геномній ДНК клітини, з якої походить нуклеїнова кислота (наприклад, клітини *Triticum monosocum*). Нуклеїнову кислоту також вважають виділеною, якщо її було змінено через втручання людини або поміщено в локус або місце, яке не є її природним місцем, або якщо її було введено у клітину шляхом агроінфекції або біолістики. Крім того, "виділена" молекула нуклеїнової кислоти, така як молекула кДНК, може бути вільною від деякого іншого клітинного матеріалу, з яким вона пов'язана у природі, або культурального середовища, якщо її одержують рекомбінантними способами, або хімічних попередників або інших хімічних речовин, якщо її синтезують хімічним шляхом.

Прямо виключаються з визначення "виділені нуклеїнові кислоти": природні хромосоми (такі як розтягнуті хромосоми), бібліотеки штучних хромосом, геномні бібліотеки та бібліотеки кДНК, які існують або як *in vitro* препарат нуклеїнової кислоти, або як препарат трансфікованої/трансформованої клітини-хазяїна, причому клітини-хазяї є або *in vitro* гетерогенним препаратом, або вирощеними на пластині як гетерогенна популяція окремих колоній. Також прямо виключаються вищезгадані бібліотеки, в яких зазначена нуклеїнова кислота складає менше 5% від кількості нуклеїнових кислотних вставок у векторних молекулах. Також прямо виключаються геномні ДНК цілих клітин або препарати РНК цілих клітин (включаючи препарати цілих клітин, які є механічно зрізаними або підданими ферментативному гідролізові). Крім того, прямо виключаються препарати цілих клітин, які існують або як *in vitro* препарат, або як гетерогенна суміш, відокремлена шляхом електрофорезу, в якій нуклеїнову кислоту згідно з винаходом не було піддано подальшому відокремленню від гетерологічних нуклеїнових кислот у середовищі електрофорезу (наприклад, подальшому відокремленню шляхом вирізання однієї смуги з гетерогенної сукупності смуг в агарозному гелі або шляхом блотування на нейлон).

Молекулу нуклеїнової кислоти даного винаходу, наприклад, молекулу нуклеїнової кислоти, яка містить нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 або її частину, виділяють, застосовуючи стандартні способи молекулярної біології та представлену авторами інформацію про послідовність. Наприклад, ІМІ кДНК Т. *monosocum* виділяють з бібліотеки Т. *monosocum*, застосовуючи, повністю або частково, послідовність SEQ ID NO:1. Крім того, молекула нуклеїнової кислоти, яка включає, повністю або частково, SEQ ID NO:1 може бути виділена шляхом полімеразної ланцюгової реакції з застосуванням олігонуклеотидних праймерів, побудованих на основі цієї послідовності. Наприклад, мРНК виділяють із рослинних клітин (наприклад, шляхом процедури виділення гуанідин тіоціанату, описаної в роботі Chirgwin et al., 1979 *Biochemistry* 18:5294-5299), а кДНК одержують, застосовуючи зворотну транскриптазу (наприклад, Mooney MLV зворотну транскриптазу, яку отримують від Gibco/BRL, Bethesda, MD; або AMV зворотну транскриптазу, яку отримують від Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Синтетичні олігонуклеотидні праймери для ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції можуть бути побудовані на основі нуклеотидної послідовності, показаної в SEQ ID NO:1. Молекула нуклеїнової кислоти винаходу може бути ампліфікована з застосуванням кДНК або, в альтернативному варіанті, геномної ДНК як матриці та відповідних олігонуклеотидних праймерів згідно зі стандартними способами ампліфікації ПЛР. Ампліфіковану таким чином молекулу нуклеїнової кислоти клонують у відповідний вектор і характеризують шляхом аналізу послідовності ДНК. Крім того, олігонуклеотиди, які відповідають нуклеотидній послідовності ІМІ, можуть бути одержані стандартними способами синтезу, наприклад, із застосуванням автоматизованого синтезатора ДНК.

ІМІ нуклеїнові кислоти даного винаходу можуть включати послідовності, які кодують ІМІ білок (тобто "кодуєні ділянки"), а також 5' нетрансльовані послідовності та 3' нетрансльовані послідовності. В альтернативному варіанті молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть включати лише кодуєні ділянки ІМІ гена, або можуть містити повні геномні фрагменти, виділені з геномної ДНК. Кодуючу ділянку цих послідовностей позначають як "ORF-позицію". Крім того, молекула нуклеїнової кислоти винаходу може включати частину кодуєної ділянки ІМІ гена, наприклад, фрагмент, який може бути використаний як зонд або праймер. Нуклеотидні послідовності, визначені за клонуванням ІМІ гена з Т. *monosocum*, дозволяють утворювати зонди та праймери, призначені для застосування в розпізнанні та/або клонуванні ІМІ гомологів в інших типах клітин та організмів, а також ІМІ гомологів з інших пшеничних культур та споріднених видів. Частина кодуєної ділянки також може кодувати біологічно активний фрагмент ІМІ білка.

Вжитий авторами термін "біологічно активна частина" ІМІ білка охоплює частину, наприклад, домен/мотив ІМІ білка, який у разі вироблення в рослині підвищує резистентність рослини

імідазолінового гербіциду порівняно з різновидами рослини дикого типу. Способи кількісного визначення підвищеної резистентності до імідазолінових гербіцидів представлено нижче у Прикладах. Біологічно активні частини IMI білка включають пептиди, кодовані полінуклеотидними послідовностями, які включають SEQ ID NO:1, які включають менше амінокислот, ніж IMI білок повної довжини і надають підвищеної резистентності до імідазолінового гербіциду після експресії в рослині. Як правило, біологічно активні частини (наприклад, пептиди, які мають у довжину, наприклад, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 або більше амінокислот) включають домен або мотив з принаймні однією активністю IMI білка. Крім того, інші біологічно активні частини, в яких делетовано інші ділянки поліпептиду, одержують рекомбінантними способами і оцінюють на наявність описаних авторами однієї або кількох активностей. В оптимальному варіанті біологічно активні частини IMI білка включають один або кілька консервативних доменів, вибраних з групи, яка складається з Домену А, Домену В, Домену С, Домену D та Домену Е, причому консервативний домен містить мутацію.

Винахід також забезпечує химерні або злиті IMI поліпептиди. Вжитий авторами термін IMI "химерний поліпептид" або "злитий поліпептид" охоплює IMI поліпептид, функціонально зв'язаний з не-IMI поліпептидом. Термін "не-IMI поліпептид" стосується поліпептиду, який має амінокислотну послідовність, яка не має значної ідентичності IMI поліпептидові, наприклад, поліпептиду, який не є IMI ізоформом, причому цей пептид виконує відмінну від IMI поліпептиду функцію. По відношенню до злитого поліпептиду термін "функціонально зв'язаний" означає, що IMI поліпептид та не-IMI поліпептид є злитими один з одним таким чином, що обидві послідовності виконують передбачену функцію, характерну для даної послідовності. Не-IMI поліпептид може бути злитий з N-кінцем або C-кінцем IMI поліпептиду. Наприклад, в одному варіанті втілення злитий поліпептид є GST-IMI злитим поліпептидом, у якому IMI послідовність є злиною з C-кінцем GST послідовності. Такі злиті поліпептиди можуть сприяти очищенню рекомбінантних IMI поліпептидів. В іншому варіанті втілення злитий поліпептид є IMI поліпептидом, який містить гетерологічну сигнальну послідовність на своєму N-кінці. У деяких клітинах-хазяях (наприклад, клітинах-хазяях ссавців) експресія та/або секреція IMI поліпептиду може бути посилена завдяки застосуванню гетерологічної сигнальної послідовності.

Виділена молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує IMI поліпептид, що має послідовність, ідентичну поліпептидові, який кодується полінуклеотидною послідовністю SEQ ID NO:1, може бути створена шляхом введення одного або кількох нуклеотидних заміщень, додавань або делецій у нуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1 таким чином, щоб одне або кілька амінокислотних заміщень, додавань або делецій були введені в кодований поліпептид. Мутації вводять у послідовність SEQ ID NO:1 стандартними способами, такими як сайт-специфічний мутагенез та ПЛР-опосередкований мутагенез. В оптимальному варіанті консервативні амінокислотні заміщення здійснюють в одному або кількох прогнозованих замісних амінокислотних залишках.

"Консервативне амінокислотне заміщення" є таким, при якому амінокислотний залишок заміщується амінокислотним залишком, який має подібний боковий ланцюг. Спеціалістами було визначено групи амінокислотних залишків, які мають подібні бокові ланцюги. До цих груп належать амінокислоти з основними боковими ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними боковими ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глютамінова кислота), незарядженими полярними боковими ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глютамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн), неполярними боковими ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін, триптофан), бета-розгалуженими боковими ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними боковими ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Таким чином, прогнозований замісний амінокислотний залишок в IMI поліпептиді оптимально заміщується іншим амінокислотним залишком з тієї самої групи бокових ланцюгів. В альтернативному варіанті втілення мутації вводять випадково по всій IMI кодуєчій послідовності або її частині, наприклад, шляхом насиченого мутагенезу, і одержані в результаті мутанти відбирають на наявність описаної авторами IMI активності для розпізнання мутантів, які зберігають IMI активність. Після мутагенезу послідовності SEQ ID NO:1 кодований поліпептид може бути експресований рекомбінантно, й активність поліпептиду може бути визначена шляхом аналізу резистентності до імідазолінону в рослині, яка експресує поліпептид, як описано нижче у Прикладах.

Для визначення відсотка ідентичності послідовності двох амінокислотних послідовностей послідовності сумішують для оптимального порівняння (наприклад, у послідовність одного поліпептиду вставляють розриви для оптимального суміщення з іншим поліпептидом). Після цього порівнюють амінокислотні залишки у відповідних позиціях амінокислот. Якщо позиція в одній послідовності займається тим самим амінокислотним залишком, що й відповідна позиція в іншій послідовності, то молекули в цій позиції є ідентичними. Таке саме порівняння здійснюють між двома послідовностями нуклеїнових кислот. Відсоток ідентичності послідовності між двома послідовностями залежить від кількості ідентичних позицій, спільних для цих послідовностей (тобто відсоток ідентичності послідовностей = кількість ідентичних позицій/загальна кількість позицій × 100). З точки зору винаходу відсоток ідентичності послідовностей між двома нуклеїновими кислотами або поліпептидними послідовностями визначають, застосовуючи пакет програм Vector NTI 6.0 (PC) (InforMax, -7600 Wisconsin Ave., Bethesda, MD 20814). Для визначення відсотка ідентичності двох нуклеїнових кислот виставляють показник "gap opening penalty" 15 і показник "gap extension penalty" 6,66. Для визначення відсотка ідентичності двох поліпептидів виставляють показник "gap opening penalty" 10 і показник "gap extension penalty" 0,1. Усі інші параметри встановлено за умовчанням.

Слід розуміти, що для визначення ідентичності послідовності, якщо порівнюють послідовність ДНК з послідовністю РНК, тимідиновий нуклеотид є еквівалентом урацилового нуклеотиду. В оптимальному варіанті виділені IMI поліпептиди, які охоплюються даним винаходом, є принаймні приблизно на 50-60%, краще - принаймні приблизно на 60-70%, ще краще - принаймні приблизно на 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% або 90-95%, найкраще - принаймні приблизно на 96%, 97%, 98%, 99% або більше ідентичними повній амінокислотній послідовності, кодованій нуклеїновою кислотою, яка включає полінуклеотидну послідовність, показану в SEQ ID NO:1. В іншому варіанті втілення виділені IMI поліпептиди, які охоплюються даним винаходом, є принаймні приблизно на 50-60%, краще - принаймні приблизно на 60-70%, ще краще - принаймні приблизно на 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90% або 90-95%, найкраще - принаймні приблизно на

96%, 97%, 98%, 99% або більше ідентичними повній амінокислотній послідовності, кодованій нуклеїновою кислотою, яка включає поліпептид, показаний у SEQ ID NO:1.

Крім того, можуть бути створені оптимізовані ІМІ нуклеїнові кислоти. В оптимальному варіанті оптимізована ІМІ нуклеїнова кислота кодує ІМІ поліпептид, який модулює толерантність рослини до імідазолінонових гербіцидів, ще краще - якщо підвищує толерантність рослини до імідазолінонового гербіциду після його переекспресії в рослині. Вжитий авторами термін "оптимізований" стосується нуклеїнової кислоти, підданої генній інженерії для посилення її експресії в даній рослині або тварині. Для забезпечення оптимізованих для рослини ІМІ нуклеїнових кислот послідовність ДНК гена модифікують, щоб вона 1) включала кодони, оптимальні для вискоекспресованих рослинних генів; 2) включала А+Т, який практично відповідає за складом нуклеотидної основи тому, що міститься в рослинах; 3) утворювала ініціюючу послідовність рослини, 4) не містила послідовностей, які викликають дестабілізацію, неналежне поліаденілювання, деградацію та термінацію РНК, або які утворюють шпильки вторинної структури або місця сплайсингу РНК. Посилення експресії ІМІ нуклеїнових кислот у рослинах досягають шляхом застосування частоти розподілу використання кодонів у рослинах взагалі або в конкретній рослині. Способи оптимізації експресії нуклеїнових кислот у рослинах описано в EPA 0359472; EPA 0385962; заявці PCT № WO 91/16432; патенті США №5,380,831; патенті США №5,436,391; роботах Perlack et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324-3328; i Murray et al., 1989 Nucleic Acids Res. 17:477-498.

Вжитий авторами термін "частота переважного використання кодонів" стосується переваги, яку віддає конкретна клітина-хазяїн при використанні нуклеотидних кодонів для визначення даної амінокислоти. Для визначення частоти використання конкретного кодону в гені кількість випадків цього кодону в гені ділять на загальну кількість випадків усіх кодонів, які вказують на ту саму амінокислоту в гені. Так само частота переважного використання кодонів, яку виявляє клітина-хазяїн, може бути розрахована через середнє значення частоти переважного використання кодонів у великій кількості генів, експресованих клітиною-хазяїном. В оптимальному варіанті цей аналіз обмежують генами, які сильно експресуються клітиною-хазяїном. Відсоток відхилення частоти переважного використання кодонів для синтетичного гена від частоти використання клітиною-хазяїном розраховують спочатку шляхом визначення відсотка відхилення частоти використання одного кодону від частоти використання клітиною-хазяїном з наступним одержанням середнього показника відхилення по всіх кодонах. Як визначено авторами, цей розрахунок включає унікальні кодони (тобто ATG і TGG). Тобто загальне середнє відхилення використання кодонів оптимізованого гена від показника клітина-хазяїна розраховують, користуючись рівнянням $1A = n = 1Z X_n - Y_n X_n$ разів 100 Z, де X_n = частота використання для кодону n у клітині-хазяїні; Y_n = частота використання для кодону n у синтетичному гені, n представляє окремий кодон, який визначає амінокислоту, і загальна кількість кодонів дорівнює Z. Загальне відхилення частоти використання кодонів, A, для всіх амінокислот в оптимальному варіанті становить менше, ніж приблизно 25%, краще - менше, ніж приблизно 10%.

Таким чином, ІМІ нуклеїнова кислота може бути оптимізована таким чином, щоб її частота розподілу використання кодонів відхилялася в оптимальному варіанті не більше, ніж на 25% від частоти вискоекспресованих рослинних генів, у ще кращому варіанті - не більше, ніж приблизно на 10%. Крім того, враховують відсотковий вміст G+C виродженої третьої основи (однодольні підтримують G+C у цій позиції, на відміну від дводольних). Визнано також, що XCG (де X є A, T, C, або G) нуклеотид є найменшим оптимальним кодоном у дводольних, тоді як ХТА кодону уникають як однодольні, так і дводольні. Оптимізовані ІМІ нуклеїнові кислоти цього винаходу також бажано мати індекси уникнення дублетів CG і TA, наближені до індексів вибраної рослини-хазяїна (тобто *Triticum monoccosum*). Краще, якщо ці індекси відхиляються від індексу хазяїна не більше, ніж приблизно 10-15%.

Крім молекул нуклеїнових кислот, які кодують описані вище ІМІ поліпептиди, інший аспект винаходу стосується виділених молекул нуклеїнових кислот, які є антисмисловими до них. Вважається, що антисмислові полінуклеотиди інгібують генну експресію полінуклеотиду-мішені шляхом специфічного зв'язування з полінуклеотидом-мішенню і впливу на транскрипцію, сплайсинг, перенесення, трансляцію та/або стійкість полінуклеотиду-мішені. В існуючому рівні техніки описано способи спрямування антисмислового полінуклеотиду на хромосомну ДНК, на первинний транскрипт РНК або на процесовану мРНК. В оптимальному варіанті ділянки-мішені включають місця сплайсингу, кодони ініціації трансляції, кодони термінації трансляції та інші послідовності в межах відкритої рамки зчитування.

Термін "антисмислова" з точки зору винаходу стосується нуклеїнової кислоти, яка включає полінуклеотид, який є достатньо комплементарним, повністю або частково, генові, первинному транскриптові або процесованій мРНК, щоб впливати на експресію ендегенного гена. "Комплементарними" полінуклеотидами є ті, які здатні до спарювання основ згідно зі стандартними правилами комплементарності Вотсона-Кріка. Зокрема, пурини створюють пари основ з піримідинами для утворення комбінації гуаніну, спареного з цитозином (G:C) та аденіну, спареного або з тиміном (A:T) у разі ДНК, або аденіну, спареного з урацилом (A:U) у разі РНК. Слід розуміти, що два полінуклеотиди можуть гібридизуватися один з одним, навіть якщо вони не є повністю комплементарними один одному, якщо кожен має принаймні одну ділянку, практично комплементарну іншій. Термін "антисмислова нуклеїнова кислота" охоплює експресійні касети одноланцюгової РНК, а також дволанцюгової ДНК, які можуть бути транскрибовані для утворення антисмислової РНК. "Активними" антисмисловими нуклеїновими кислотами є молекули антисмислової РНК, здатні селективно гібридизуватися з первинним транскриптом або мРНК, що кодує поліпептид, який має принаймні 80% ідентичність послідовності з поліпептидом, кодованим нуклеїновою кислотою, яка включає полінуклеотидну послідовність SEQ ID NO:1.

Крім вищеописаних ІМІ нуклеїнових кислот та поліпептидів, даний винахід охоплює ці нуклеїнові кислоти та поліпептиди, приєднані до компонента. До цих компонентів, крім інших, належать компоненти виявлення, компоненти гібридизації, компоненти очищення, компоненти доставлення, компоненти реакції, компоненти зв'язування та ін. Типовою групою нуклеїнових кислот, які мають приєднані компоненти, є зонди та праймери. Зонди та праймери, як правило, включають практично ізольований олігонуклеотид. Олігонуклеотид, як правило, включає ділянку нуклеотидної послідовності, яка гібридизується за жорстких умов з принаймні приблизно 12, краще - приблизно 25, ще краще - приблизно 40, 50 або 75 послідовними нуклеотидами смислового ланцюга послідовності, вказаної в SEQ ID NO:1, антисмисловою послідовністю

послідовності, вказаної в SEQ ID NO:1, або їх природними мутантами. Праймери на основі нуклеотидної послідовності SEQ ID NO:1 застосовують у ПЛР для клонування ІМІ гомологів. Зонди на основі ІМІ нуклеотидних послідовностей застосовують для виявлення транскриптів або геномних послідовностей, які кодують ті ж самі або гомологічні поліпептиди. В оптимальних варіантах втілення зонд також включає приєднану до нього мітку, наприклад, мітку, яка може бути радіоізотопом, флуоресцентною сполукою, ферментом або кофактором ферменту. Такі зонди застосовують як частину випробувального комплексу геномного маркера для розпізнання клітин, які експресують ІМІ поліпептид, наприклад, шляхом вимірювання рівня ІМІ-кодуючої нуклеїнової кислоти, у зразку клітин, наприклад, виявлення рівня ІМІ мРНК або визначення, чи був геномний ІМІ ген мutowаним чи видаленим.

Винахід також забезпечує виділений рекомбінантний вектор експресії, який включає ІМІ нуклеїнову кислоту, як описано вище, причому вектор експресії у клітині-хазяїні в результаті забезпечує підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з різновидом клітини-хазяїна дикого типу. Вжитий авторами термін "вектор" стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу нуклеїнову кислоту, з якою її було з'єднано. Одним типом вектора є "плазмід", яка означає кільцеву дволанцюгову петлю ДНК, у яку можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Іншим типом вектора є вірусний вектор, у якому додаткові сегменти ДНК можуть бути ліговані у вірусний геном. Деякі вектори здатні до самостійної реплікації у клітині-хазяїні, в яку вони є введеними (наприклад, бактеріальні вектори, які мають бактеріальне походження реплікації, та епісомні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, неепісомні вектори ссавців) вводять у геном клітини-хазяїна після введення у клітину-хазяїн, а отже, реплікують разом з геномом хазяїна. Крім того, деякі вектори здатні спрямовувати експресію генів, з якими вони є функціонально зв'язаними. Такі вектори названо авторами "векторами експресії". Взагалі, вектори експресії, які застосовують у технологіях рекомбінантних ДНК, часто мають форму плазмід. У даному описі терміни "плазмід" та "вектор" можуть вживатися поперемінно, оскільки плазмід є найпоширенішою формою вектора. Однак винахід охоплює й інші форми векторів експресії, такі як вірусні вектори (наприклад, ретровіруси з недостатньою реплікацією, аденовіруси та аденоасоційовані віруси), які виконують рівноцінні функції.

Рекомбінантні вектори експресії згідно з винаходом включають нуклеїнову кислоту винаходу у формі придатної для експресії нуклеїнової кислоти у клітині-хазяїні, що означає, що рекомбінантні вектори експресії включають одну або кілька регуляторних послідовностей, вибраних на основі клітин-хазяїв, які мають бути застосовані для експресії, які є функціонально зв'язаними з нуклеїновокислотною послідовністю, яка підлягає експресії. По відношенню до рекомбінантного вектора експресії "функціонально зв'язаний" означає, що дана нуклеотидна послідовність є зв'язаною з регуляторною(ими) послідовністю(ями) таким чином, що це дозволяє експресію нуклеотидної послідовності (наприклад, в *in vitro* транскрипційній/трансляційній системі або у клітині-хазяїні, коли вектор є введеним у клітину-хазяїн). Термін "регуляторна послідовність" охоплює промотори, енхансери та інші елементи контролю експресії (наприклад, сигнали поліаденілювання). Такі регуляторні послідовності описано, наприклад, у роботі Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), або в роботі Gruber and Crosby, *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, eds. Glick and Thompson, Chapter 7, 89-108, CRC Press: Boca Raton, Florida, включаючи посилання, які в них містяться. До регуляторних послідовностей належать ті, які спрямовують конститутивну експресію нуклеотидної послідовності в багатьох типах клітин-хазяїв, та ті, які спрямовують експресію нуклеотидної послідовності лише в деяких клітинах-хазяях або за певних умов. Спеціалістам стане зрозуміло, що побудова вектора експресії може залежати від таких чинників, як вибір клітини-хазяїна, яка підлягає трансформації, рівень експресії потрібного поліпептиду і т. д. Вектори експресії згідно з винаходом вводять у клітини-хазяї для утворення поліпептидів або пептидів, включаючи злиті поліпептиди або пептиди, кодовані нуклеїновими кислотами, як описано авторами (наприклад, ІМІ поліпептиди, злиті поліпептиди і т. д.).

В оптимальному варіанті втілення даного винаходу ІМІ поліпептиди експресуються в рослинах та рослинних клітинах, таких як клітини одноклітинних рослин (наприклад, водоростей) (див. Falcatore et al., 1999 *Marine Biotechnology* 1(3):239-251, та посилання, що містяться в цій роботі) та клітини вищих рослин (наприклад, сперматофітів, таких як хлібні злаки). ІМІ поліпептид може бути "введений" у рослинну клітину будь-яким способом, включаючи трансфекцію, трансформацію або трансдукцію, електропорацію, бомбардування частинками, агроінфекцію, біолістику і т. ін.

Відомості про придатні способи трансформації або трансфекції клітин-хазяїв, включаючи рослинні клітини, можна знайти у Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) та інших лабораторних посібниках, таких як *Methods in Molecular Biology*, 1995, Vol. 44, *Agrobacterium protocols*, ed: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Оскільки підвищена резистентність до імідазолінових гербіцидів є загальною особливістю, успадкування якої є бажаним для багатьох видів рослин, таких як кукурудза, пшениця, жито, овес, тритикале, рис, ячмінь, соя, арахіс, бавовна, рапс та канола, маніхот, перець, соняшник та чорнобривці, пасльонові рослини, такі як картопля, тютюн, баклажан та томати, види віки, горох, люцерна, чагарникові рослини (кава, какао, чай), види верби, дерева (олійна пальма, кокос), багаторічні трави та фуражні культури, ці хлібні злаки також є оптимальними рослинами, які можуть бути об'єктами генної інженерії як ще один варіант втілення даного винаходу. В оптимальному варіанті втілення рослиною є пшенична культура. До фуражних культур належать, крім інших, пирій, *Phalaris arundinacea*, *Bromopsis inermis*, дике жито, *Bluegrass*, *Dactylis glomerata* L., люцерна, *Salfoin*, *Lotus corniculatus* L., шведська конюшина, червона конюшина та буркун.

В одному варіанті втілення даного винаходу трансфекції ІМІ поліпептиду в рослину досягають шляхом *Agrobacterium*-опосередкованого перенесення гена. Одним з відомих спеціалістам способів трансформації є занурення рослини під час цвітіння в розчин *Agrobacteria*, в якому *Agrobacteria* містить ІМІ нуклеїнову кислоту, з наступним розведенням трансформованих гамет. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація рослин здійснюють, застосовуючи, наприклад, GV3101(pMP90) (Koncz and Schell, 1986 *Mol. Gen. Genet.* 204:383-396) або LBA4404 (Clontech) штам *Agrobacterium tumefaciens*. Трансформацію здійснюють стандартними способами трансформації та регенерації (Deblaere et al., 1994 *Nucl. Acids. Res.*

13:4777-4788; Gelvin, Stanton B. and Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2nd Ed. - Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. - in Sect., Ringbuc Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. and Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton : CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). Наприклад, рапс трансформують шляхом трансформації сім'ядолі або гіпокотилу (Moloney et al., 1989 Plant Cell Report 8:238-242; De Block et al., 1989 Plant Physiol. 91:694-701). Застосування антибіотиків для вибору *Agrobacterium* та рослини залежить від бінарного вектора та штаму *Agrobacterium*, який застосовують для трансформації. Вибір рапсу зазвичай здійснюють, застосовуючи канаміцин як маркер для селекції рослин. *Agrobacterium*-опосередковане перенесення генів у льон здійснюють, застосовуючи, наприклад, спосіб, описаний у роботі Mlynarova et al., 1994 Plant Cell Report 13:282-285. Крім того, трансформацію сої здійснюють, застосовуючи, наприклад, спосіб, описаний у європейському патенті №0424047, патенті США №5,322,783, європейському патенті №0397 687, патенті США №5,376,543 або патенті США №5,169,770. Трансформації кукурудзи досягають шляхом бомбардування частинками, опосередкованого поліетиленгліколем поглинання ДНК або за допомогою волокон карбіду кремнію. (Див., наприклад, Freeling and Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Конкретний приклад трансформації кукурудзи міститься в патенті США №5,990,387, а конкретний приклад трансформації пшениці міститься в заявці PCT № WO 93/07256.

Згідно з даним винаходом, введений ІМІ полінуклеотид може стійко утримуватись у рослинній клітині, якщо його введено в нехромосомний автономний реплікон або введено у хромосоми рослин. В альтернативному варіанті введений ІМІ полінуклеотид може бути присутній на позахромосомному невідтворюваному векторі і може бути короткочасно експресованим або короткочасно активним. В одному варіанті втілення може бути створений гомологічний рекомбінантний мікроорганізм, у якому ІМІ полінуклеотид є введеним у хромосому, створюється вектор, який містить принаймні частину гена АНАС, у який введено делецію, додавання або заміщення для того, щоб змінити, наприклад, функціонально розірвати, ендегенний ген АНАС і створити ІМІ ген. Для створення точкової мутації через гомологічну рекомбінацію, використовують ДНК-РНК гібриди, застосовуючи спосіб, відомий як химерапластія (Cole-Strauss et al., 1999 Nucleic Acids Research 27(5):1323-1330 and Kmiec, 1999 Gene Therapy American Scientist 87(3):240-247). Спеціалістам також добре відомі інші процедури гомологічної рекомбінації у виді *Triticum*, можливість застосування яких авторами передбачається.

У векторі гомологічної рекомбінації до ІМІ гена на його 5' та 3' кінцях може приєднуватися додаткова молекула нуклеїнової кислоти гена АНАС, що дозволяє здійснення гомологічної рекомбінації між екзогенним ІМІ геном, що міститься у векторі, та ендегенним геном АНАС у мікроорганізмі або рослині. Додаткова молекула фланкуючої нуклеїнової кислоти АНАС має достатню довжину для успішної гомологічної рекомбінації ендегенним геном. Як правило, вектор включає від кількох сотень пар основ до тисяч основ фланкуючих ДНК (як на 5', так і на 3' кінцях) (див., наприклад, Thomas, K. R., and Caracci, M. R., 1987 Cell 51:503, де описано вектори гомологічної рекомбінації, або Strepp et al., 1998 PNAS, 95(8):4368-4373, де описано рекомбінацію на основі кДНК у *Physcomitrella patens*). Однак, оскільки ІМІ ген зазвичай відрізняється від гена АНАС у дуже небагатьох амінокислотах, у фланкуючій послідовності не завжди є необхідність. Вектор гомологічної рекомбінації вводять у мікроорганізм або рослину клітину (наприклад, через поліетиленгліколь-опосередковану ДНК) і відбирають клітини, в яких введений ІМІ ген було гомологічно рекомбіновано ендегенним геном АНАС, застосовуючи відомі спеціалістам способи.

В іншому варіанті втілення одержують рекомбінантні мікроорганізми, які містять вибрані системи, що дозволяють здійснювати регульовану експресію введеного гена. Наприклад, включення ІМІ гена у вектор з поміщенням його під контроль Іас-операона дозволяє експресію ІМІ гена лише у присутності IPTG. Такі регуляторні системи добре відомі спеціалістам.

Чи є він присутнім у позахромосомному невідтворюваному векторі, чи у векторі, введеному у хромосому, ІМІ полінуклеотид в оптимальному варіанті містяться в експресійній касеті рослини. Експресійна касета рослини в оптимальному варіанті містить регуляторні послідовності, здатні викликати експресію гена в рослинних клітинах, які є функціонально зв'язаними таким чином, що кожна послідовність може виконувати свою функцію, наприклад, термінацію транскрипції сигналами поліаденілювання. Оптимальними сигналами поліаденілювання є ті, що походять із т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*, такі як ген 3, відомий як октопін синтаза Ті-плазмиди рTiACHS (Gielen et al., 1984 EMBO J. 3:835) або їх функціональні еквіваленти, але придатними є також усі інші термінатори, функціонально активні в рослинах. Оскільки експресія рослинних генів дуже часто не обмежується на транскрипційних рівнях, експресійна касета рослини в оптимальному варіанті містить інші функціонально зв'язані послідовності, такі як перехідні енхансери, наприклад, надлишкова послідовність (overdrive-sequence), яка містить 5'-нетрансльовану лідерну послідовність вірусу тютюнової мозаїки, що збільшує пропорцію поліпептиду в РНК (Gallie et al., 1987 Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Прикладами рослинних векторів експресії можуть бути ті, які детально описано в роботах Becker, D. et al., 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; and Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

Експресія рослинного гена має бути функціонально пов'язана з відповідним промотором, який забезпечує вчасну, клітинно- або тканинспецифічну експресію гена. До промоторів, застосовуваних у експресійних касетах згідно з винаходом, може належати будь-який промотор, здатний ініціювати транскрипцію в рослинній клітині. До таких промоторів належать, крім інших, ті, які можуть бути одержані з рослин, рослинних вірусів та бактерій, які містять гени, що експресуються в рослинах, таких як *Agrobacterium* та *Rhizobium*.

Промотор може бути конститутивним, індукцибельним, специфічним до стадії розвитку, специфічним до типу клітин, тканинспецифічним або органоспецифічним. Конститутивні промотори є активними за більшості умов. Прикладами конститутивних промоторів є CaMV 19S та 35S промотори (Odell et al. 1985 Nature 313:810-812), sX CaMV 35S промотор (Kay et al. 1987 Science 236:1299-1302), Sep1 промотор, промотор актину рису (McElroy et al. 1990 Plant Cell 2:163-171), промотор актину *Arabidopsis*, промотор убіхітану (Christensen et al. 1989 Plant Molec. Biol. 18:675-689); pEmu (Last et al. 1991 Theor. Appl. Genet.

81:581-588), 35S промотор вірусу мозаїки ранника, Smas промотор (Velten et al. 1984 EMBO J. 3:2723-2730), GRP1-8 промотор, промотор дегідрогенази цинамілового спирту (Патент США №5,683,439), промотори з T-ДНК *Agrobacterium*, такі як манопін синтаза, нопалін синтаза та октопін синтаза, промотор малої субодиниці рибулоза біфосфат карбоксилази (ssuRUBISCO) промотор та ін.

Індуцибельні промотори є активними за певних навколишніх умов, таких як наявність або відсутність поживної речовини або метаболіту, тепло або холод, світло, напад патогенів, анаеробні умови та ін. Наприклад, hsp80 промотор із *Brassica* індукуюється термічним ударом, PPDК промотор індукуюється світлом, PR-1 промотор з тютюну, *Arabidopsis* та кукурудзи індукуються інфекцією патогену, а Adh1 промотор індукуюється гіпоксією та впливом холоду. Експресія рослинного гена також може сприяти індукцибельний промотор (див. Gatz, 1997 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:89-108). Хімічно індукцибельні промотори є особливо придатними, якщо потрібна специфічна до часу експресія гена. Прикладами таких промоторів є індукований саліциловою кислотою промотор (Заявка РСТ № WO 95/19443), індукований тетрацикліном промотор (Gatz et al., 1992 Plant J. 2:397-404) та індукований етанолом промотор (Заявка РСТ № WO 93/21334).

Специфічні до стадії розвитку промотори в оптимальному варіанті експресуються на певних стадіях розвитку. До тканино- та органоспецифічних промоторів належать ті, які в оптимальному варіанті експресуються в певних тканинах або органах, таких як листя, коріння, насіння або ксилема. Прикладами тканиноспецифічних та органоспецифічних промоторів є, крім інших, специфічні до плодів, специфічні до насінних зачатків, специфічні до чоловічих тканин, специфічні до насіння, специфічні до шкірки, специфічні до бульб, специфічні до стебел, специфічні до оплодня та специфічні до листя, специфічні до приймочок, специфічні до пилку, специфічні до пиляка, специфічні до пелюсток, специфічні до чашолистка, специфічні до квітконіжки, специфічні до стручка, специфічні до суплідь, специфічні до коріння промотори та інші. Специфічні до насіння промотори в оптимальному варіанті експресуються під час розвитку насіння або проростання. Наприклад, специфічні до насіння промотори можуть бути специфічними до ембріонів, специфічними до ендосперму та специфічними до оболонки насіння. Див. Thompson et al., 1989 BioEssays 10:108. Прикладами специфічних до насіння промоторів є, крім інших, целюлоза-синтаза (celA), Cim1, гамма-зеїн, глобулін-1, зеїн кукурудзи 19kD (cZ19B1) та інші.

До інших придатних тканиноспецифічних або органоспецифічних промоторів належать промотор напін-гена з рапсу (Патент США №5,608,152), USP-промотор із *Vicia faba* (Baeumlein et al., 1991 Mol. Gen Genet. 225(3):459-67), олеозин-промотор із *Arabidopsis* (Заявка РСТ № WO 98/45461), фазеолін-промотор із *Phaseolus vulgaris* (Патент США №5,504,200), Все4-промотор із *Brassica* (Заявка РСТ № WO 91/13980) або легумін В4 промотор (LeB4; Baeumlein et al., 1992 Plant Journal, 2(2):233-9), а також промотори, які забезпечують специфічну до насіння експресію в однодольних рослинах, таких як кукурудза, ячмінь, пшениця, жито, рис і т. д. Придатними промоторами є промотор 1pt2 або 1pt1-гена з ячменю (Заявка РСХ № WO 95/15389 та Заявка РСХ № WO 95/23230) або описані в заявці РСХ № WO 99/16890 (промотори з гордеїн-гена ячменю, глютелін-гена рису, оризин-гена рису, проламін-гена рису, гліадин-гена пшениці, глютенін-гена пшениці, глютенін-гена вівса, касирин-гена сорго та секалін-гена жита).

До інших промоторів, які застосовують у експресійних касетах винаходу, належать, крім інших, головний промотор a/b-зв'язувального білка хлорофілу, промотори гістону, Ar3 промотор, промотор -конгліцину, промотор напину, промотор соєвого лектину, промотор зеїну кукурудзи 15kD, промотор зеїну 22kD, промотор зеїну 27kD, промотор g-зеїну, промотори waxu, shrunken 1, shrunken 2 та bronze, Zml3 промотор (Патент США №5,086,169), промотори полігалактуронази кукурудзи (PG) (Патенти США №№ 5,412,085 та 5,545,546) і SGB6 промотор (Патент США №5,470,359), а також синтетичні або інші природні промотори.

Додаткової гнучкості в контролюванні експресії гетерологічного гена в рослинах досягають шляхом застосування доменів зв'язування ДНК та елементів відповіді з гетерологічних джерел (тобто доменів зв'язування ДНК з нерослинних джерел). Прикладом такого гетерологічного домену зв'язування є домен зв'язування ДНК LexA (Brent and Ptashne, 1985 Cell 43:729-736).

Інший аспект винаходу стосується клітин-хазяїв, у які було введено рекомбінантний вектор експресії згідно з винаходом. Терміни "клітина-хазяїн" та "рекомбінантна клітина-хазяїн" вживаються авторами поперемінно. Слід розуміти, що такі терміни стосуються не лише конкретної клітини, але вони також стосуються потомства або можливого потомства такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть траплятися певні зміни через мутації або вплив навколишнього середовища, таке потомство фактично не може бути ідентичним батьківській клітині, але все одно охоплюється вжитим авторами терміном. Клітина-хазяїн може бути будь-якою прокариотною або еукаріотною клітиною. Наприклад, ІМІ полінуклеотид може бути експресований у бактеріальних клітинах, таких як *C. glutamicum*, клітини комах, грибові клітини або клітини ссавців (такі як клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або клітини COS), водорості, війчасті, рослинні клітини, грибки або інші мікроорганізми, такі як *C. glutamicum*. Інші придатні клітини-хазяї є відомими спеціалістам.

Клітину-хазяїн згідно з винаходом, таку як прокариотна або еукаріотна клітина-хазяїн у культурі, використовують для вироблення (тобто експресії) ІМІ полінуклеотиду. Відповідно, винахід також забезпечує способи вироблення ІМІ поліпептидів з використанням клітин-хазяїв згідно з винаходом. В одному варіанті втілення спосіб включає культивування клітини-хазяїна згідно з винаходом (у яку було введено рекомбінантний вектор експресії, який кодує ІМІ поліпептид, або в геном якої було введено ген, який кодує поліпептид дикого типу або ІМІ поліпептид) у придатному середовищі до вироблення ІМІ поліпептиду. В іншому варіанті втілення спосіб також включає виділення ІМІ поліпептидів із середовища або клітини-хазяїна. Інший аспект винаходу стосується виділення ІМІ поліпептидів та їх біологічно активних частин. "Виділений" або "очищений" поліпептид або його біологічно активна частина є вільними від деякого клітинного матеріалу, якщо одержуються способами рекомбінантних ДНК, або хімічних попередників або інших хімічних речовин, якщо хімічно синтезуються. Вираз "практично вільний від клітинного матеріалу" охоплює препарати ІМІ поліпептиду, в яких поліпептид є відокремленим від деяких із клітинних компонентів клітин, у яких він природним або рекомбінантним шляхом виробляється. В одному варіанті втілення вираз "практично вільний від клітинного матеріалу" охоплює препарати ІМІ поліпептиду, що мають менше, ніж приблизно 30% (сухої маси) відмінного від ІМІ матеріалу (який також вказується авторами як

"забруднюючий поліпептид"), краще - менше, ніж приблизно 20% відмінного від IMI матеріалу, ще краще - менше, ніж приблизно 10% відмінного від IMI матеріалу, найкраще - менше, ніж приблизно 5% відмінного від IMI матеріалу.

Якщо IMI поліпептид або його біологічно активна частина виробляється рекомбінантно, вони також в оптимальному варіанті є практично вільними від культурального середовища, тобто культуральне середовище складає менше, ніж приблизно 20%, краще - менше, ніж приблизно 10%, найкраще - менше, ніж приблизно 5% об'єму препарату поліпептиду. Вираз "практично вільний від хімічних попередників або інших хімічних речовин" охоплює препарати IMI поліпептиду, в яких поліпептид є відокремленим від хімічних попередників або інших хімічних речовин, які беруть участь у синтезі поліпептиду. В одному варіанті втілення вираз "практично вільний від хімічних попередників або інших хімічних речовин" охоплює препарати IMI поліпептиду, що мають менше, ніж приблизно 30% (сухої маси) хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, краще - менше, ніж приблизно 20% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, ще краще - менше, ніж приблизно 10% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин, найкраще - менше, ніж приблизно 5% хімічних попередників або відмінних від IMI хімічних речовин. В оптимальних варіантах втілення виділені поліпептиди або їх біологічно активні частини не містять забруднюючих поліпептидів з того організму, з якого походить IMI поліпептид. Як правило, такі поліпептиди одержують шляхом рекомбінантної експресії, наприклад, IMI поліпептиду *Triticum monosocum* у рослинах, які не є *Triticum monosocum*, або мікроорганізмах, таких як *C. glutamicum*, війчасті, водорості або грибки.

Послідовності IMI поліпептиду та поліпептиду згідно з винаходом мають різне застосування. Нуклеїновокислотні та амінокислотні послідовності даного винаходу застосовують для трансформації рослин, таким чином, модулюючи резистентність рослин до імідазолінових гербіцидів. Відповідно, винахід забезпечує спосіб одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінового гербіциду, включаючи (а) трансформацію рослинної клітини одним або кількома векторами експресії, які включають одну або кілька IMI нуклеїнових кислот, і (б) вирощування з рослинної клітини трансгенної рослини з підвищеною резистентністю до імідазолінового гербіциду порівняно з сортом рослини дикого типу. В одному варіанті втілення множинні IMI нуклеїнові кислоти походять із різних геномів. Даний винахід також охоплює способи одержання трансгенної рослини, яка має підвищену толерантність до імідазолінового гербіциду, включаючи (а) трансформацію рослинної клітини вектором експресії, який включає IMI нуклеїнову кислоту, причому нуклеїнова кислота не є Imi1 нуклеїною кислотою, і (б) вирощування з рослинної клітини трансгенної рослини з підвищеною резистентністю до імідазолінового гербіциду порівняно з сортом рослини дикого типу.

Даний винахід включає способи зміни толерантності рослини до імідазолінового гербіциду, які включають зміну експресії однієї або кількох IMI нуклеїнових кислот. В оптимальному варіанті нуклеїнові кислоти містяться в різних геномах або походять із різних геномів. Резистентність рослини до імідазолінового гербіциду може бути підвищена або знижена, що досягається посиленням або послабленням експресії IMI поліпептиду, відповідно. В оптимальному варіанті резистентність рослини до імідазолінового гербіциду підвищують шляхом посилення експресії IMI поліпептиду. Експресія IMI поліпептиду може змінюватися будь-якими відомими спеціалістам способами. Застосовують способи посилення експресії IMI поліпептидів, у яких рослина є або трансгенною, або нетрансгенною. У випадках, коли рослина є трансгенною, рослина може бути трансформована вектором, який містить будь-яку з вищеписаних IMI кодуєчих нуклеїнових кислот, або ж, рослина може бути трансформована промотором, який спрямовує експресію ендегенних IMI поліпептидів у рослині. Винахід передбачає, що такий промотор може бути тканиноспецифічним або регульованим розвитком. В альтернативному варіанті нетрансгенні рослини можуть мати експресію ендегенного IMI поліпептиду, яка змінюється включенням природного промотора. Експресія поліпептидів, які включають SEQ ID NO:1 у заданих рослинах може здійснюватися, крім іншого, за допомогою: (а) конститутивного промотора, (б) хімічно індукованого промотора та (в) переэкспресії підданого інженерії промотора, наприклад, похідними від цинкових пальців факторами транскрипції (Greisman and Pabo, 1997 Science 275:657).

В оптимальному варіанті втілення транскрипцію IMI поліпептиду модулюють, застосовуючи похідні від цинкових пальців фактори транскрипції (ZFP), які описано у Greisman and Pabo, 1997 Science 275:657, і які виробляються Sangamo Biosciences, inc. Ці ZFP включають як домен розпізнання ДНК, так і функціональний домен, який викликає активацію або пригнічення заданої нуклеїнової кислоти, такої як IMI нуклеїнова кислота. Отже, створюють активуючі і пригнічувальні ZFP, які специфічно розпізнають промотори IMI поліпептиду, які було описано вище і які застосовують для посилення або послаблення експресії IMI поліпептиду в рослині, таким чином, модулюючи резистентність рослини до гербіцидів.

Як було детальніше описано вище, рослини, які одержують способами даного винаходу, можуть бути однодольними або дводольними. Рослини вибирають, наприклад, з-поміж кукурудзи, пшениці, жита, вівса, тритикале, рису, ячменю, сої, арахісу, бавовни, рапсу, канолі, маніхоту, перцю, соняшника, чорнобривців, пасльонових рослин, картоплі, тютюну, баклажану, томатів, видів віки, люцерни, кави, какао, чаю, видів верби, олійної пальми, кокоса, багаторічних трав та фуражних культур. В оптимальному варіанті втілення рослиною є пшенична культура. До фуражних культур належать, крім інших, пирій, *Phalaris arundinacea*, *Bromopsis inermis*, ди́ке жито, *Bluegrass*, *Dactylis glomerata* L., люцерна, *Salfoin*, *Lotus corniculatus* L., шведська конюшина, червона конюшина та буркун. В оптимальному варіанті втілення рослиною є пшенична культура. У кожному з вищеписаних способів рослинна клітина включає, крім іншого, протопласт, гаметопродукуючу клітину та клітину, яка регенерується в цілу рослину. Вжитий авторами термін "трансгенний" стосується будь-якої рослини, рослинної клітини, калюсу, рослинної тканини або частини рослини, що містить, повністю або частково, принаймні один рекомбінантний поліпептид. У багатьох випадках рекомбінантний поліпептид, частково або повністю, є стабільно включеним у хромосому або стійкий позахромосомний елемент таким чином, що він передається наступним поколінням.

Як описано вище, даний винахід пропонує композиції та способи підвищення резистентності до імідазоліну у пшеничній культурі або насіння порівняно з різновидами рослини або насінням дикого типу. В оптимальному варіанті втілення резистентність до імідазоліну у пшеничній культурі або насіння

підвищується таким чином, що рослина або насіння може витримувати нанесення імідазолінового гербіциду в кількості приблизно 10-400г аі/га⁻¹, краще - 20-160г аі/га⁻¹, найкраще - 40-80г аі/га⁻¹. Вжитий авторами термін "витримувати" нанесення імідазолінового гербіциду означає, що рослина не знищується або не зазнає ураження від такого нанесення.

Крім того, авторами пропонується спосіб контролю над бур'янами в оточенні пшеничної культури, який включає нанесення імідазолінового гербіциду на бур'яни та пшеничну культуру, причому пшенична культура має підвищену резистентність до імідазолінового гербіциду порівняно з сортом пшеничної культури дикого типу, і рослина містить одну або кілька ІМІ нуклеїнових кислот. В одному варіанті втілення рослина містить множинні ІМІ нуклеїнові кислоти, які містяться в різних геномах або походять із різних геномів. В іншому варіанті втілення рослина містить відмінну від Ім1 нуклеїнову кислоту. Завдяки забезпеченню пшеничних культур з підвищеною резистентністю до імідазолінону, існує широкий вибір придатних до застосування композицій для захисту пшеничних культур від бур'янів з метою активізації росту рослин та зниження конкурентної боротьби за поживні речовини. Імідазоліновий гербіцид застосовують окремо для досходового, післясходового, передпосівного та посівного контролю над бур'янами на площах, які оточують описані авторами пшеничні культури, або ж застосовують композицію імідазолінового гербіциду, яка містить інші добавки. Імідазоліновий гербіцид також застосовують для обробки насіння. До додатків, які містяться в композиції імідазолінового гербіциду, належать інші гербіциди, детергенти, ад'юванти, засоби розсіювання, засоби прилипання, стабілізатори або інші подібні агенти. Композиція імідазолінового гербіциду може бути рідкою або сухою композицією і може включати, крім іншого, сипкі порошки, емульговані концентрати та рідкі концентрати. Імідазоліновий гербіцид та гербіцидні композиції наносять традиційними способами, наприклад, шляхом розпилення, поливання, зрошування або іншими подібними способами.

У заявці містяться посилання на різні публікації. Описи всіх цих публікацій та посилання, наведені в цих публікаціях у їх повному обсязі, включено авторами шляхом посилання в цю заявку для більш повного опису рівня техніки, якого стосується цей винахід.

Слід також розуміти, що вищенаведене стосується оптимальних варіантів втілення даного винаходу, і що існує можливість внесення численних змін без відхилення від обсягу винаходу. Винахід далі пояснюється на представлених нижче прикладах, які не повинні розглядатись як такі, що якимось чином обмежують його обсяг. Навпаки, слід чітко розуміти, що існує можливість звернення до різних інших варіантів його втілення, модифікацій та еквівалентів, які, по ознайомленню з представленим описом, стануть зрозумілими спеціалістам без відхилення від сутності даного винаходу та/або обсягу формули винаходу, що додається.

Приклади

Приклад 1

Мутагенез та відбір резистентних ліній пшениці

Приблизно 15000 зерен ярової пшениці *Triticum monosocum* з партії "ТМ23" обробляли EMS. Застосовували такі способи: (1) попереднє вимочування у воді протягом чотирьох годин, (2) обробка 0,3% EMS протягом 16 годин, (3) промивання у воді протягом 8 годин, (4) висушування на повітрі протягом чотирьох годин і (5) висівання насіння. Певну частину зібраного насіння розмножували далі без відбору на толерантність до імідазолінових гербіцидів. Зібране насіння висівали і обробляли 40г/га імазамоксу. Загалом висівали 120кг насіння, в результаті чого обробляли 2,4 мільйона рослин, припускаючи, що маса зернини становила 35мг, і схожість складала 70%. Відбирали насіння покоління від М2 до М5, причому 72% насіння належало до покоління не нижче М3. П'ять рослин визнавали толерантними, позначаючи їх від EM1 до EM5, і переносили до оранжереї для вироблення насіння. EM2 розмножували з відбором на толерантність до імідазолінового гербіциду перед початковими польовими випробуваннями (Приклад 4).

Приклад 2

Перенесення EM2 із диплоїдної *Triticum monosocum* до гексаплоїдної м'якої *T. aestivum*, а потім до тетраплоїдної твердої *T. turgidum*

ЕМІМІ є позначенням для вихідної рослини *T. monosocum* EM2. *Crocus* є позначенням для вихідної рослини м'якого сорту *T. aestivum*. 605 квіток *crocus* запилювали пилом ЕМІМІ, в результаті чого одержували насіння 84 F₁. 38 409 квіток рослин F₁ запилювали, використовуючи пилок *Crocus*, у результаті чого одержували 2 зародки, які забирали з рослин. Одержані в результаті рослини BC₁F₁ змішували з BC₁F₂ і обробляли 20г/га імазамоксу. З оброблених таким чином 24 рослин 11 були повністю резистентними, 7 мали певні ураження, і 6 були уразливими. Резистентні рослини схрещували з хлібним сортом пшениці *Teal*, який являв собою 3-ю порцію хлібної пшениці. Рослини одержаної в результаті лінії з родоводом *Crocus**2/ЕМІМІ//CDC *Teal*/3/ схрещували з AC *Elsa* або AC *Superb* і присвоювали їм коди, відповідно, 98PH8 (гібрид *Elsa*) та 98PH9 (гібрид *Superb*). 98PH8 схрещували ще шість разів з AC *Elsa*, і 98PH8 схрещували ще шість разів з AC *Superb*. Дві популяції кодували таким чином:

P00.35=98PH8/6**Elsa*=*Crocus**2/ЕМ2//CDC *Teal*/3/7*AC *Elsa*

P00.45=98PH9/6**Superb*=*Crocus**2/ЕМ2//CDC *Teal*/3/7*AC *Superb*

Сегрегація одержаних шляхом зворотного схрещування рослин в обох популяціях відповідала очікуваній 1:1 толерантний:чутливий моногенній моделі при обробці з застосуванням 20г/га імазамоксу. Як і очікувалося при цій нормі та єдиному гетерозиготному гені толерантності на основі хлібної пшениці, рослини, визначені як толерантні, витримали певне ураження. Від кожного запилення одержували здвоєні гапліоїди, застосовуючи спосіб запилення кукурудзи. Сім резистентних ДН-ліній одержували від P00.35 і 78 резистентних ДН-ліній одержували від P00.45. У тих, які використовували в подальшій роботі, виявляли розвиток зигот, толерантних до гербіциду.

T. aestivum використовували як проміжного хазяїна для перенесення EM2 гена від *T. monosocum* до *T. turgidum*. У кожному поколінні рослини обробляли імазамоksom при нормі принаймні 20г/га перед відбором рослин як батьківських. Проміжне перетворення *T. aestivum* з родоводом "*Crocus**2/ЕМ2//CDC *Teal*/3/2*AC *Superb*", толерантне до імазамоксу, схрещували з твердою лінією AC *Avonlea*. Одержані в результаті

рослини F₁ змішували для одержання популяції F₂, з якої 52/390 рослин були визнані резистентними (без уражень від нанесення гербіциду). Деякі з них використовували як жіночі рослини і схрещували з AC Avonlea. Одержані в результаті рослини BC₁F₁ знову схрещували з AC Avonlea. Для наступних двох поколінь AC Avonlea використовували як жіночу рослину. Одержану в результаті лінію позначали OODIMI#17, і вона мала такий родовід: AC Avonlea*2/3/Crocus*2/EM2/CDC Teal/3/2*AC Superb //3*AC Avonlea. Цю лінію змішували з F₂ і рослини F₂ обробляли 40г/га імазамоксу. З резистентних рослин F₂ одержували покоління F₄. Усі випробувані рослини 53 F₄ витримали нанесення 80г/га імазамоксу. По лініях F₄:5 чутливих рослин не виявляли зі 124 рослин, оброблених 80г/га імазамоксу, що вказувало на стійке включення EM2 гена у тверду основу.

Приклад 3

Результати стосовно успадкування IMI генів та аельного взаємозв'язку між IMI генами

Далі в обговоренні норма внесення імідазолінового гербіциду імазамокс, яку застосовували при дослідженні успадкування, становила 20 грамів на гектар. Ця норма була достатньою для знищення чутливих пшеничних культур. Включений батьківський матеріал показано на Фігурі 4.

Під час процесу інтрогресії EM2 ген виділяли як можливий єдиний частково домінантний ген. Рослина *Triticum monosocum*, від якої походила мутація EM2, є диплоїдною пшеницею, що містить лише A геном. Гексаплоїдна пшениця має A геном, а також B та D геном. Якщо припустити, що під час інтрогресії EM2 ген включався гомологічно в A геном гексаплоїдної пшениці, як слід було очікувати, то мутація EM2 у вищеописаних батьківських матеріалах "EM2" та "EM2FS4" має відбуватися в A геномі. Нижче в таблиці представлено дані сегрегації F₂, які допомагають пояснити аельний взаємозв'язок між різними мутантами. Жоден батьківський матеріал, за винятком чутливої лінії Teal, не мав чутливих рослин при обробці імазамоксом; отже, ці дані не показано.

Відсутність сегрегації в поколінні F₂ вказує, що батьківські лінії мають принаймні одну спільну аель у певному локусі. Показники сегрегації F₂ 3:1, 15:1 та 63:1 вказують, відповідно, на один, два та три незалежні локуси. Сегрегація 15A при схрещуванні з чутливою лінією Teal вказувала на участь двох незалежних локусів у толерантності до імазамоксу (Фігура 5, Рядок 2). EM2 міститься не в тому локусі, що FS4 (Фігура 5, Рядок 7). EM2 має спільний локус із 15A (Фігура 5, Рядок 3). FS4 має спільний локус із 15A (Фігура 5, Рядок 4). Батьківський EM2+FS4, схрещений з 15A, також не сегрегуювався у F₂ (Фігура 5, Рядок 5). FS4, очевидно, міститься в D геномі (Jim Anderson, особисте повідомлення). EM2 має бути в A геномі. Отже, два локуси, пов'язані з толерантністю до імазамоксу в 15A, мають бути в A та D геномах. Батьківський 11A при схрещуванні з чутливою лінією Teal сегрегуювався як єдиний локус (Фігура 5, Рядок 1). Він був незалежним від локусу толерантності в EM2 (Фігура 5, Рядок 6) та FS4 (Фігура 5, Рядок 9). Як слід було очікувати від відсутності сегрегації EM2 та FS4 з 15A, 11A був також незалежним від локусів у 15A (Фігура 5, Рядок 10) та батьківському EM2+FS4 (Фігура 5, Рядок 8). Якщо припустити, що гени AHAS перебувають у гомологічному наборі в гексаплоїдній пшениці, існує лише три експресовані гени AHAS, і кожен з експресованих генів перебуває у своєму геномі, то 11A має перебувати в B геномі.

Приклад 4

Толерантність до IMI гербіцидів, яка забезпечується EM2 в Einkorn, твердій та гексаплоїдній пшениці, та підвищена толерантність при комбінуванні з іншими неаельними генами толерантності

Лінію EM2, толерантну до імазамоксу (Приклад 1), оцінювали, вирощуючи на одному полі, на різні агрономічні характеристики, на які може впливати ураження гербіцидами. Дані за три роки оцінки показано на Фігурі 6. Дані за 1998р. є середніми для двох реплікацій. Дані по зрожях 1999 та 2000рр. є середніми для чотирьох реплікацій. Інші дані за 1999р. є середніми для двох реплікацій. Контроль Einkorn був чутливим до 40 грамів імазамоксу, усі рослини загинули. Мутація EM2 на основі Einkorn забезпечила відмінну толерантність при нормі 40г/га.

Лінію EM2 оцінювали на загальне ураження культури при трьох нормах імазамоксу, який наносили тричі за сезон. Ці дані представлено на Фігурі 7. У 1999р. спочатку спостерігали лише легкі ураження, і симптоми поступово зникли протягом сезону. У 2000р. ураження не спостерігали в лінії EM2, тоді як нетолерантний до гербіцидів контроль був фактично знищений.

Також було продемонстровано толерантність, яка забезпечувалася EM2 на основі твердої (тетраплоїд) та хлібної пшениці (гексаплоїд). Історію селекції досліджених ліній було попередньо описано (Приклад 2). Як показано у Прикладі 2, коли лінії F_{4:5} твердої регенерації EM2 OODIMI#17 оцінювали на толерантність до 80г/га імазамоксу, усі рослини були толерантними, тоді як усі рослини чутливої твердої лінії, яку брали за контроль, гинули, що вказувало на те, що EM2 надає толерантності до Imi класу гербіцидів для твердої пшениці. Похідна від здвоєного гаплоїда лінія P00.45, яка складалася з EM2 на гексаплоїдній основі, була толерантною до 20г/га імазамоксу як батьківський контроль у дослідженні алелізму, описаному у Прикладі 3; усі рослини чутливого гексаплоїдного контролю при цій нормі загинули.

Було продемонстровано, що комбінація більш, ніж одного генів Imi-толерантності підвищує толерантність пшениці до імідазолінових гербіцидів. Чотири генотипи було випробувано на толерантність до двох різних норм імазамоксу. До генотипів належали лише FS4 лінія, BW755; Teal 15A, описана вище як така, що має два незалежні локуси толерантності до Imi-гербіцидів; похідна від здвоєного гаплоїда лінія EM2+FS4 та лінія, що походить від схрещування 15A та 11A, одержання через традиційний масовий відбір найбільш толерантних рослин через послідовні покоління при зростаючих нормах імазамоксу. Норми імазамоксу становили 200 та 600 грамів на гектар. Ураження проростків від 18 до 25 рослин за одну обробку на генотип оцінювали на порослинній основі, застосовуючи категорії від загибелі до відсутності ураження. Дані зведено на Фігурі 8.

При будь-якій нормі жодна рослина не загинула. Моногенна лінія, BW755, яка містила FS4, зазнавала ураження при обох нормах. Попереднє дослідження показало, що 11A та FS4 забезпечують однакову толерантність для хлібної пшениці. Дві двогенні лінії, Teal 15A та EM2/FS4, реагували однаково. Ураження не спостерігали при нижчій нормі, що вказувало на підвищення толерантності порівняно з моногенною рослиною, але всі зазнавали ураження при вищій нормі. Тригенна норма продовжувала сегрегуватися, про що свідчили деякі рослини, які зазнавали ураження при обох нормах, але приблизно половина рослин не мала уражень за найвищої норми, демонструючи підвищену толерантність порівняно з будь-якою з

двогенних ліній.

Фігура 1

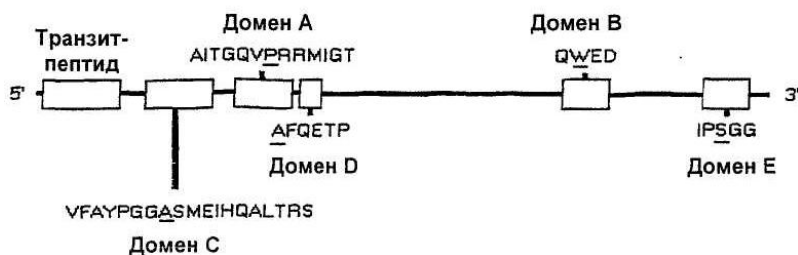
Часткова послідовність κДНК Einkorn IM13 (SEQ ID NO:1)

```
GATGGTAGTTTCCTCATGAACATTGAGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGA
TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGGTTTTACAAGGCCAACCGGGCA
CACACATACSTTGGCAACCCAGAAAATGAGAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATT
CAACGTTCCGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAGATGCTTGAGACCC
CAGGGCCATACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCAGGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAAACGGAGGT
GCTTTTAAGGACATGA
```

Фігура 2

3_end_Einkorn (SEQ ID NO:2) (381)	400	GATGGTAGTTTCCTCATGAA
EM2 (SEQ ID NO:1) (1)		GATGGTAGTTTCCTCATGAA
Узагальн. тип. (SEQ ID NO:3) (381)		GATGGTAGTTTCCTCATGAA
	401	450
3_end_Einkorn (401)		CATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGA
EM2 (31)		CATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGA
Узагальн. тип. (401)		CATTCAGGAGTTGGCGTTGATCCGTATTGAGAACCTCCCAGTGAAGGTGA
	451	500
3_end_Einkorn (451)		TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG
EM2 (81)		TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG
Узагальн. тип. (451)		TGATATTGAACAACCAGCATCTGGGAATGGTGGTGCAGTGGGAGGATAGG
	501	550
3_end_Einkorn (501)		TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA
EM2 (131)		TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA
Узагальн. тип. (501)		TTTTACAAGGCCAACCGGGCACACACATACCTTGGCAACCCAGAAAATGA
	551	600
3_end_Einkorn (551)		GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTC
EM2 (181)		GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTC
Узагальн. тип. (551)		GAGTGAGATATATCCAGATTTTGTGACGATTGCTAAAGGATTCAACGTTC
	601	650
3_end_Einkorn (601)		CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG
EM2 (231)		CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG
Узагальн. тип. (601)		CGGCAGTTCGTGTGACGAAGAAGAGCGAAGTCACTGCAGCAATCAAGAAG
	651	700
3_end_Einkorn (651)		ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCA
EM2 (281)		ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCA
Узагальн. тип. (651)		ATGCTTGAGACCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATTTGTCCCGCATCA
	701	750
3_end_Einkorn (701)		GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAACGGAGGTGCTTTTAAGGACATGA
EM2 (331)		GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAACGGAGGTGCTTTTAAGGACATGA
Узагальн. тип. (701)		GGAGCACGTGCTGCCTATGATCCCAACGGAGGTGCTTTTAAGGACATGA

Фігура 3



Фігура 4

Код	Опис
EM2	Похідна від здвоєного гаплоїда лінія з P00.45 (див. Приклад 2)
11A	Гексаплоїдна лінія пшениці, яка містить гомозиготну IMI мутацію 11A, яка є неалельною з 15A мутацією та FS4 мутацією
EM2FS4	Похідна від здвоєного гаплоїда лінія, яка містить EM2 мутацію з пшениці einkorn, інтрогредовану в гексаплоїдну пшеницю, та FS4 мутація в гексаплоїдній пшениці
15A	Гексаплоїдна лінія пшениці, яка містить гомозиготні IMI мутації 15A, які мають два незалежні IMI гени толерантності, один з яких був алельним FS4 мутації
FS4	Гексаплоїдна лінія пшениці, яка містить гомозиготну IMI мутацію FS4, єдиний локус, який міститься в D геномі (Jim Anderson, особисте повідомлення)
Teal	Гексаплоїдна пшениця, чутлива до нанесення імазамоксу

Фігура 5

Рядок таблиці #	Схрещування	Спостерігали				Очікували		
		Покол.	Толер.	Чутл.	Співв.	Толер.	Чутл.	p
1	11 A/Teal	F2	505	189	3:1	521	174	0,1742
2	15A/Teal	F2	893	74	15:1	907	60	0,0716
3	EM2/15A	F2	1940	0				
4	15A/FS4	F2	410	0				
5	EM2+FS4/15A	F2	1134	0				
6	EM2/11A	F2	1331	100	15:1	1342	89	0,2300
7	EM2/FS4	F2	1192	72	15:1	1185	79	0,4160
8	EM2+FS4/11A	F2	622	16	63:1	628	10	0,0580
9	11A/FS4	F2	688	47	15:1	689	46	0,8714
10	11A/15A	F2	600	14	63:1	604	10	0,1516

Фігура 6

	Контроль Einkorn		EM2	
	імазамокс, г/га		імазамокс, г/га	
1998	0	40	0	40
Врожай (кг/га)	3011	0	3792	3494
Колосіння (дні)	52	0	52	53
Достигання (дні)	79	0	79	79
Висота (см)	85	0	85	85
1999				
Врожай (кг/га)	2349	0	2687	3219
Колосіння (дні)	63	0	62	62
Достигання (дні)	110	0	110	110
Висота (см)	109	0	106	108
2000				
Врожай (кг/га)	2238	0	2676	2684

Фігура 7

		% ураження у три моменти часу (DAT = днів після обробки на стадії 3-4 листків)					
		EM2			Контроль Einkorn		
		16 DAT	41 DAT	78 DAT	16 DAT	41 DAT	78 DAT
1999 1 LOG	г ai/га						
	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	15	2,5	0,3	0,0	93,8	100,0	97,3
	30	2,5	1,3	0,0	96,0	99,5	99,3
	60	7,5	2,5	0,0	97,0	100,0	99,5
		EM2			Контроль Einkorn		
		18 DAT	44 DAT	73 DAT	18 DAT	44 DAT	73 DAT
2000 2 Loc Ave	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	15	0,0	0,0	0,0	93,1	96,9	98,1
	30	0,0	0,0	0,0	53,0	97,4	99,4
	60	0,0	0,0	0,0	97,5	99,5	100,0

Фігура 8

г/га імазамоксу					
		200		600	
Генотип	% ураж.	% без ураж.	% ураж.	% без ураж.	
BW755(FS4)	100	0	100	0	
TeaM5A (2 гени)	0	100	100	0	
EM2/FS4 (2 гени)	0	100	100	0	
15A/11A (3 гени)	33	67	48	52	