РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG (11) 60686 B1

5(51) C 12 N 15/82
C 12 N 15/29
A 01 N 65/00
A 01 H 5/00

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ ЗА ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 97604
(22) Заявено на 05.04.93
(24) Начало на действие на патента от: 10.09.91

Приоритетни данни
(31) 9019736 (32) 10.09.90 (33) GB
9108471 19.04.91 GB

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 3 на 31.03.94
(45) Отпечатано на 29.03.96
(46) Публикувано в бюлетин № 12 на 29.12.95
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентопритежател(и):
Advanced Technologies (Cambridge) Limited, Staines, Middlesex (GB)

(72) Изобретател(и):
Sarah Jane Gurr
Colgate Road, York
Michael John McPherson
Thornhill, Dewsbury
Howard John Atkiinson
Leeds
Dianna Joy Bowles
Upper Nidderdale, North Yorkshire (GB)

(74) Представител по индустриална собственост:
Фани Владимирова Божинова
1000 София, ул. "Кърниградска" 17

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/GB91/01540, 10.09.91
(87) № и дата на PCT публикация:
WO92/04453, 19.03.92

(54) МЕТОД ЗА БОРБА С НЕМАТОДИ ПО РАСТЕНИЯТА

(57) По метода се идентифицира генът, индуциран в растението в резултат на нематодна инфекция, който се модифицира, за да се създаде резистентност към нематоди.

16 претенции

BG 60686 B1

97604/cc

50/93-ВП

(54) МЕТОД ЗА БОРБА С НЕМАТОДИ ПО РАСТЕНИЯТА

Изобретението се отнася до борба с нематоди по растенията по-специално до метод за борба с коренови цистообразуващи нематоди. Изобретението се отнася също така до въвеждане на резистентност по отношение на нематоди в различни видове растения, чувствителни към коренови цистообразуващи нематоди, например картофи (Solanum tuberosum).

Цистообразуващите нематоди (главно Heterodera и Globodera spp) са ключови вредители за много културни растения. Те са причина за директни загуби от добиви, както и за недиректни загуби като например разходи за пестициди и неоптимално използване на земята при сеитбооборота. Картофените цистообразуващи нематоди (Globodera rostochiensis и Globodera pallida) са ключови вредители при картофите във Великобритания, в много други части на Европа и в други райони,където се отглеждат картофи. Heterodera glycines (соевицистообразуващи нематоди) има икономически ефект при соята,който само в САЩ може да надхвърли 500 милиона долара годишно. Heterodera schachtii (цвеклови цистообразуващи нематоди) представлява огромен проблем за

стопаните на захарно цвекло в Европа и САЩ. Heterodera avenae (житни цистообразуващи нематоди) имат икономическо значение по цялия свят.

Значителни икономически плътности от цистообразуващи нематоди обикновено предизвикват закърняване на културните растения. Кореновата им система е по-малка от тази на незаразени растения, което се отразява в появяване на симптоми на минерален дефицит в листата и повишен риск от засушаване и повяхване при сухи почвени условия. Загубите в добива са свързани с плътността на наличните в растенията цистообразуващи нематоди и при силна зараза могат да бъдат чувствително над 50 % при култури като картофи и соя.

Понастоящем борбата се води с химически средства, с културални техники и резистентни видове, като всички тези начини могат да се използват интегрирано. Необходими са обаче по-ефективни начини на борба Нематоцидите могат да се приемат само за ограничено приложение, не и за широка употреба. Така например алдикарб и продуктите му на разграждане са високо токсични за топлокръвни организми и замърсяват подпочвените води. В резултат на това, правителствата на няколко щата в САЩ са поставили ограничения при прилагането на този нематоцид. В Холандия се води политика за намаляване прилагането на нематоциди за период от пет години. Културалните техники също така не представляват идеалното решение на проблема тъй като мерки като сеитбооборот крият скрити загуби, които са неприемливи за селските стопани или тези, които разполагат с малко икономически изгодни алтернативни култури.

Резистентност на едно растение към нематоди може да се получи чрез невъзможността на нематода да възпроизвежда един генотип върху видовете гостоприемни растителни видове и доминантни, частично доминантни и рецесивен начин на онаследяване се появява на базата на един до няколко растителни гена. Тяхната търговска стойност е обаче ограничена за селскостопанския производител. Така например, при картофите се появяват различни източници на резистентност и създават в

Европа подраздели от популации, какъвто е случаят на единичния доминантен ген H 1, който придава резистентност срещу G. rostochiensis (Ro 1 и Ro 4), но не други форми от този вид (Ro 2, Ro 3 и Ro 5).

Култиварният сорт Марис Пайпер изразява H 1 и широко се използва във Великобритания срещу G. rostochiensis, но използването му води в определено съотношение до увеличаване превеса на G. pallida, който има възможност да се възпроизвежда в присъствие на H 1. Проблемът, поставен при нарушаващи резистентността патотипове, се появява и при други цистообразуващи нематоди и източниците на резистентност са известни. В някои случай източниците на резистентност са полигенни, като представляват повече затруднения за селскостопанския производител. В допълнение, резистентността при някои култиварни сортове е по природа по-скоро количествена отколкото качествена и така с времето, при често използване на такива култиварни сортове, може да се появи повишена мултипликатност.

Допирните точки между растението и патогена е местоположение от ключова важност при определяне на чувствителността или резистентността към инвазия. При по- ранното определяне на етапите на инвазионния процес допирните точки се ограничават до много малък брой растителни клетки на локалното местоположение на инфекция. По-късно, при ново диференциране на съществуващите растителни клетки, се образува синцитиум (многоядрена маса от протоплазма, получена в резултат на кондензиране на клетки), от който се хранят животните. Синцитиумът се индуцира от ювенилни форми във втори стадий на развитие, след като са мигрирали в корените на гостоприемника вероятно в резултат на секрецията, освободена от животното в първоначалната клетка, от която се храни. Когато растението е чувствително, синцитиумът се увеличава по обем и се поддържа през време на периода на хранене на нематода. При женски това може да продължи няколко седмици. Клетъчната биология на синцитиума е добре охарактеризирана.

Настоящето изобретение търси да открие метод за предаване на нематодна резистентност в растение, която да бъде универсална срещу цистообразуващи нематоди и има продължителна устойчивост. Изобретението се различава от другите методи, които могат да включват използването на познат резистентен ген вместо използването на гени, които са специфична част от чувствителността към нематодното нападение.

Изобретението може да е свързано с идентифицирането на преди непознати гени, експресирани специфично на местоположението на хранене на цистообразуващия нематод и като резултат на прикрепването на нематода. Идентифицирането на гените може да се постигне чрез използване на полимеразна верижна реакция (PCR). По-рано ограничените клетъчни допирни точки между растението и патогена ограничаваше разбирането на молекулярната биология на допирните точки. Освен това, изобретението се отнася до ново използване на такива гени за направляване при нападение освобождаването на вещества, специфично на мястото на хранене които са токсични както за растителните клетки, така и за нематодите. Специфичното освобождаване на такива вещества дава възможност за използване на съединения, които, ако присъстват като съставна част на растението, биха повлияли неблагоприятно на неговия растеж или биха представлявали неприемлив токсикологичен риск. Серия от такива съединения са вече известни, достъпни са и стандартни биологически техники за тяхното приложение съгласно изобретението.

Съответстващи нематодни специфични гени могат да се демонстрират при многобройни растения и е възможно да се защити всяко културно растение, което има възможност да бъде генетично манипулирано да експресира промотори на характерни гени на местоположението на хранене, които да са свързани с последователност, която има способността да нарушава репродуктивната способност на нематодите. Няколко илюстративни, но не ограничаващи примери, включват картофи, домати, захарно цвекло и тютюн.

Известно е, че проявяването на синцитиум е подобно за различни цистообразуващи нематоди. Използването на специфично подреден ген има поради това универсално приложение при всички цистообразуващи нематоди. Те са, без да се ограничава до тях: Globodera pallida и Globodera rostochiensis (картофен цистообразуващ нематод), Heterodera shachtii (цистообразуващ нематод по соя), Heterodera glycines (цвеклов цистообразуващ нематод), Heterdera avenae (цистообразуващ нематод по зърнените култури), Heterodera oryzae (оризов цистообразуващ нематод) и Globodera tabacum (тютюнев цистообразуващ нематод).

В настоящето описание терминът "ген" се отнася до ДНК последователност която включва (1) нагоре по течението (5') регулиращи сигнали включително промотора, (2) кодиращ регион, специфициращ продукта, протеин или РНК на гена и (3) надолу по течението (3') региони, включващи транскрибиращи терминационни и полиаденилационни сигнали (4) асоциирани последователности, необходими за продуктивна и специфична експресия.

Терминът "промотор" се отнася до регион в ДНК последователност, който включва необходимите сигнали за продуктивната експресия на кодиращата последователност. Това може да включва последователности, към които РНК полимераза се свързва, без да се ограничава до такива последователности, и може да включва региони, към които други регулаторни протеини се свързват, заедно с региони, включени в контрола на протеиновата транслация, и могат да включват кодиращи последователности.

Съгласно първия аспект на настоящето изобретение е сигурен метод за борба с нематоди, метод, включващ етапите на идентифициране на гена, индуциран в заразеното растение чрез нематодната инфекция на това растение, и модифициране на гена, за да предаде нематодна резистентност на растението.

Предпочитаните методи включват идентифициране на гените, индуци-

рани на местоположението на хранене от нематодната инфекция в растението, като тези гени са характерни за нематодната инфекция.

Предпочитан метод за идентифициране на гените включва следните етапи:

изграждане на сДНК библиотека при използване на полимеразна верижна реакция (PCR);

сравняване на тази библиотека със сДНК на инфектирани и неинфектирани растения и

идентифициране на сДНК клона, представляващ ген, експресиран на местоположението на хранене и използване на сДНК клона за изолиране на кореспондиращ геномен клон.

Генът или част от него може да съдържа ДНК последователност, състояща се главно от последователност, подбрана от групата, включваща:

GCCCAAACTTTCCGGTGTACTCCTTGTCCTTGTTTTTTGTAGTCTTTTACCTATCCAAC

AAAAATTTCTCGCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(формула 1)

GA

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATT

CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(формула 2)

GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG

CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT

TAAATTAAAGTTAGCAACGG (формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCGNNCGGCTGCCGGGGCTGGC

GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT

ACTTTTCGGAACTATGCACACCGGCTGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCGCTACCTTTCGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGACTCACCTACCGCT

TTGAATGAC (формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTTGCGGAC

GCAAATAAACGCGCAACAACAATCGG (формула 7)

CGTGAGTCAGTNACTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT

GGGAAACCC (формула 8),

В която: A означава аденин

C означава цитозин

T означава тимин

G означава гуанин

и N е неопределен нуклеотит.

ДНК последователността, спомената по-горе или по-нататък в описанието на изобретението, може да се състои по същество от всяка от горните последователности (формули 1 до 8) или еквивалентни нуклеотидни последователности, представляващи алели или полиморфни варианти на тези гени.

Съгласно втори аспект на настоящето изобретение, резистентно на нематоди растение, съдържа един ген или част от него, като генът включва ДНК последователност, състояща се по същество от последователност, подбрана от групата включваща:

GCCCAAACTTTCCGGTGTACTCCTTGTCCTTGTTTTTTGTAGTCTTTTACCTCTCCAAC

AAAAATTTCTCGCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG (формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATTT

CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG (формула 2)

GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG

CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT

TAAATTAAAGTTAGCAACGC (формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCGNNCGGCTGCCGGGGCTGGC

GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT

ACTTTTCGGAACTATGCACACCGGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCGCTACCTTTCGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGAGTCACCTACCGCT

TTGAATGAC (формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTTGCGGAC

GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (формула 7)

CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT

GGGAAACCC (формула 8),

в която A означава аденин

C означава цитозин

T означава тимин

G означава гуанин

и N е неопределен нуклеотид .

Съгласно трети аспект на настоящето изобретение е осигурено използването на растителен генен промоторен регион, идентифициран чрез метод от предишен аспект на това изобретение, за предаване на растението на резистентност по отношение на коренова цистообразуваща нематода.

Методът може да включва етапите на модифициране или трансформиране на растението с промоторите до гени от предишния аспект на настоящето изобретение и след това модифициране на растението чрез свързване към средство, убиващо растителна клетка, която спитва редиференциация по отношение синциално резвитие, последвано от стимулиране чрез нематод.

Промоторна последователност на един генен клон, която е експресирана в местоположението на хранене, може да се използва за да промовира следните вещества:

а) токсичен протеин, пептид или ензим като DNAза, RNAза или протеиназа ;

б) мултигенен токсичен синдром, при което например, промоторът може да експресира протеин или пептид, който е неактивен докато се ак-

тивира чрез протеин, произведен от ген, свързан с друга промоторна последователност, идентифициран като специфичен за местоположението на хранене. Продуктът на първия ген А може да е неактивен, докато не се атакува от продукта на втория ген В, за да образува един нов А°, който представлява активен токсин или протеаза. Алтернативно, А може да бъде неактивен без В, така че само А-В молекулите са активни;

в) Антисензитивна РНК, включително един или повече антисензитивни РНК гена, които могат да са еднакви като генната последователност съгласно изобретението или с други специфични гени от местоположението на хранене. По този начин промоторът може да се използва за направляване производството на неговита нова антисензитивна РНК. Това съществено намалява нивото на нормалния продукт. Алтернативно, промоторът може да се използва да направлява експерсирането на античувствителна РНК за общите клетъчни гени, като АТР синтетаза, съществена за жизнеспособността на клетките.

Резистентност по отношение на цистообразуваща нематода може да се предаде на растение, специфично на местоположението на хранене, методът включва етапите на модифициране или трансформиране на растението с промотори до гени от предишния аспект на настоящето изобретение във връзка с ген, чийто продукт има директен летален или изявен сублетален ефект върху нематода след поглъщане (т.е. антинематоден генен продукт). Примери на потенциално приложими гени, които могат да се използват във връзка с настоящето изобретение са:

а) протеинов токсин от Bacillus thuringiensis (или подобен на него организъм), притежаващ антинематодна активност;

б) ген за нематодно токсичен протеин в съответствие с патент на Великобритания № 9104617.7 ;

в) антитяло, което нарушава храненето чрез взаимодействие с поемането и храносмилането на храната, каквито са антителата, описани за цистообразуващ нематод при соята, включително това срещу дорсалната

фарингеална жлеза (Atkinson et al. 1988 Annals of Applied Biology 112, 459 - 469), при използването на метода за трансгенна експресия на антитела в растения, описан от Hiatt, A., Cafferkey,R.C. & Bowdis K. (1989 Production of Antibodies in Transgenic Plants,Nature342,76-78

г) протеин или пептид, какъвто е невропептидът, който би имал токсичен ефект при хранещи се цистообразуващи нематоди след поемането на храната.

Трябва да се разбира, че нивото на резистентност не трябва да е абсолютно. Достатъчно е то да бъде на степен на селскостопанската и икономическа целесъобразност за даден вид растение.

Изобретението осигурява средство за нематоцидна резистентност, което е локализирано на местоположението на хранене на нематода или близко до него. Преодоляна е необходимостта растението да произвежда **антинематоден** генен продукт (като например от изброените в третия аспект на изобретението). Това ограничава всякакъв вреден ефект върху растението, който би могъл да се появи от конститутионна експреси Чрез това изобретение могат да се защитят много културни растения от цистообразуващи нематоди и поради това могат да се **манипулират генетично,** за да експресират промотори на синтициум-характерни гени , свързани към последователности, които или разрушават редиференцирането на растителни клетки, за да образуват синтициум,или експресират **антинематоден** генен продукт в синтициума. Това се отнася до културни растения,към които се прикрепят нематоди като например Globodera pallida и Globodera rostochinensis(картофен цистообразуващ немат Heterodera glycines (цистообразуващ нематод при соята), Heterodera shachtii (цвеклов цистообразуващ нематод), Heterodera avenae (цистообразуващ нематод по житните култури), Heterodera cardtae (ци тообразуващи нематоди по морковите), Heterodera oryzae (оризов цистообразуващ нематод) и Globodera tabacum (тютюнев цистообразуващ нематод. Няколко илюстриращи, но не ограничиващи,примери на

културни растения, които могат да се защитят съгласно настоящето изобретение от цистообразуващи нематоди са картофи, домати, соя, захарно цвекло, маслодайна рапица, пшеница, овес, ечемик, ориз, моркови, зелеви видове и тютюн.

Изобретението е илюстрирано по-нататък с примери, без те да го ограничават.

Първият пример описва методите, които се използват за идентифициране, охарактеризиране и манипулиране на картофени гени, за да дадат резистентни трансгенни картофени растения.

ПРИМЕР 1

Този пример илюстрира използването на чувствителен култивар от картофи към Globodera rostochiensis патогенен тип Ro2, който позволява идентифициране на гените, експресирани на местоположението на хранене на нематода. Секциите 1 до 5 осигуряват елементи за производството на инфектираната коренова тъкан. Най-малкото количество от местно инфектирана тъкан осигурява количества от РНК (секция 6), най-подходяща за изграждане на сДНК библиотека чрез РСК начин на увеличаване (секции 7.1 до 7.4). Изолиране на специфични сДНК клони от клетките на хранене се постига чрез диференциално хибридизационно отсяване с сДНК проби от инфектирани и неефектирани тъкани (секция 7.5). Позитивните сДНК клони се анализират чрез ДНК последователности (секция 10) и включванията се използват като проби в следващите етапи. Изследване на преходните и спатиални експресии на гените се извършва чрез анализ на Нортер (секция 8), като се използва обхват от растителни тъкани в продължение на инфекцията. По-нататъшно локализиране на генната експресия се постига чрез in situ хибридизационни изследвания (секция 12). Геномни клони, отговарящи на специфичните сДНК клони от клетките на хранене, се изолират от геномна ДНК библиотека (секция 11). Промоторите се идентифицират чрез анализ на ДНК последователността (секция 11), за да се развият конструкции, подходя-

щи за получаване на трансгенна експресивна нематодна резистентност в картофените растения (секция 13) на мястото, на което става хранене то.

1. Растителни материали

Solanum tuberosum сорт Марис Пайпер (шотландски семенни картофи, клас А) се оставят да пуснат израстъци в продължение на 24 дни (Hammond-Kosack K.E., Atkinson H.J., Bowles D.J., 1990 Changes in abundance of translatable mRNA species in potato roots and leaves following root invasion by cyst - nematode Globodera rostochiensis pathotypes Physiol Mol Plant Pathol).

Отделните издънки се изрязват или целите грудки се използват като растежен материал в сакции.

2. Нематоди

Популация от Globodera rostochiensis патотип Ro1 и Ro2 цисти се съхраняват като сух материал при 4°C. Цистите се накисват в чешмя на вода в продължение на 7 дни при 4°C. Прибавя се дифузат от картофени корени (Shepherd A M 1986 In: Southey J. F.,(ed) Laboratory methods for work with plant and soil nematodes: MAFF reference book 402, 6th edn)

и излюпването става след 4 - 7 дни при стайна температура.

3. Инфекция

Материал от торбички: Отделни издънки се поддържат в готови торбички (Кортъп-Кинг, Минезота). Ленти с размери 1 см х 0.5 см от Вуотман GFA хартия се поставя под всяки връх на издънка. Отпипетират се 10 мкл коренов дифузат, в който се съдържат 50 червеи върху всеки връх на корен и отгоре се поставя втора хартиена лента от горния тип. След 24 часа GFA филтърната хартия се отстранява, за да се синхронизира инфекцията след инокулацията. Базата се отрязва и торбичките се промиват с чешмена вода.

Материал в сакси: прорасли грудки от картофи се засаждат в

25 см дълбоки саксии в пръс плюс значителен брой неизлюпени цисти, за да се получи популация от 50 яйца на грам почва.

Шам-инокулирани торбички и саксии се поставят при идентични условия, но без цисти.

4. Условия на растеж

Заразените картофи се поддържат при режим от 18 часа светлина при 22°С и 6 часа на тъмно при 18° С.

5. Резултати и анализиране

Тъканта, израсла в торбичките,се събира на 4, 7, 15 и 24-ия ден след заразяването. Обезцветените, локално инфектирани корени,се нарязват директно в пликчета от фолия в течен азот. Кореннитe тъкани, непосредствено до мястото на заразата,също се изрязват и се замразяват отделно.

Тъканите,израсли в сакциите,също се събират 26 дни след инвазията с Ro2. Появилите се женски цисти се отстраняват с фина четчица за рисуване и локално заразените тъкани се изрязват директно в течен азот в отделни опаковки от фолия.

6. Изолиране на обща РНК

Фолийните опаковки внимателно се стриват с пестик,за да се получи прах от тъкани,който прах се съхранява при -70° С до по-нататъшна необходимост от него. Прахообразната тъкан (12 мг) се прехвърля в предварително охладени 20 милилитрови пластмасови Сарстедт епруветки в течен азот и се прибавя 0.5 мл фенол/CH_3Cl/изоамилов алкохол (25:24:1) и 0.5 мл Gu HCl буфер (8 М гуанидин хидрохлорид, 20 мМ MES (4-морфолино-етанол-сулфонова киселина), 20 мМ Na_2ЕДТА, нагласено д pH 7 с натриева основа и 2-меркаптоетанол се прибавя до 50 нМ, непосредствено преди употреба). След размразяването на епруветките, тъканите се хомогенизират чрез 15 удара в Политрон - смесител (Кинематика, Швейцария). Водната фаза се екстрахира три пъти с фенол,преди да се остави при -20°С една нощ да се утаи. След това се прибавят 0.2

04.93

обема 1 М оцетна киселина и 0.7 обема студен 96 %-ен етанол. При центрофугиране в микроцентрофуга с приблизително 13 000 оборота в минута в продължение на 15 минути се получава РНК, промива се с 400 мкл 3 М натриев ацетатен разтвор (РН 5.5) при 4° С и след това-със студе 70 %-ен етанол и накрая се разтваря в 30 - 50 мкл обработенас DEPC вода и се съхранява при -70° С.

7. Конструкция на базирана на PCR сДНК библиотека

7.1. сДНК синтеза

1 милиграм обща РНК от картофени корени се събира 26 дни след заразяването с G. rostochiensis патотип Ro2 и се денатурира в продължение на 5 минути при 70° С на водна баня и след това бързо се охлажда върху лед. Тази проба се прибавя към реакционна смес, състояща се от 4 мкл 5 х AMVRT буфер (250 мМ трис-HCI, pH 8.3, 250 мМ KCI, 50 мМ магнезиев хлорид, 5 мМ ДДТ, 5 мМ ЕДТА, 50 мкл/мл говежди серумен албумин), 2 мкл Олиго (d T_{17}) (100 мкг/мл), 2 мкл d NTP смес (10 мМ от всяки ATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 мкл 10 мМ спермидин хидрохлори 1 мкл 80 мМ натриев пирофосфат и 125 единици човешки плацентен рибонуклеазен инхибитор (HPRNI). 10 единици птичи миобластома вирус (AM реверсивна транскриптаза се прибавят, за да се получи краен обем на реакционната смес 20 мкл, след което се инкубира 1 час при 42° С. Реакцията се прекъсва, като се прибавят 20 мкл 0.1 М натриев хлорид, 40 мМ ЕДТА. Дължината и качеството на продуктите се оценява, като се проведе паралелна реакция съдържаща 50 мкСі от ^{32}P-белязан dCTP (3000 Сі/ммола). Белязаните реакционни продукти се фракционират през алкален гел, който след това се авторадиографира. По-голямата част о белязаните продукти попада в размерите 200 до 2000 bp, като ясно се виждат и по-големи продукти.

Олиго d T-примера се отстранява чрез селективно утаяване. Към реакционната смес се прибавя 0.5 мкг поли I. поли C (Фармация) и 3

мкл 10 % (т/о) СТАВ и след това се цетрофугира на микроцентрофуга при стайна температура в продължение на 20 минути. Течността над утайката внимателно се отстранява и твърдата фаза се суспендира отново в 14 мкл 1 М натриев хлорид, към който се прибавят 25 мкл H_2O и 1 мкл 10 % СТАВ и пробата отново се центрофугира на микроцентрофуга. На края утайката се суспендира в 10 мкл 1 М натриев хлорид и се утаява в 2.7 обема етанол в продължение на една нощ при -20°С. Утайката се промива с 70 % етанол и се разтваря в 7 мкл вода. dG тайлираща реакция се провежда като към пробата се прибави: 4 мкл 5 х тайлиращ буфер (1 М калиев какодилат, 125 мМ трис ТСІ, pH 7.2), 1 мкл 2 мМ ДТТ, 2 мкл 5 мМ кобалтов хлорид, 5 мкл 20 М dGTP и 25 единици Терминална трансфераза (Бъорингер). Инкубира се 20 минути при 37° С и след това се прибавят 4 мкл 100 мМ ЕДТА и 2 мкл 1 М натриев хлорид. Излишъкът от нуклеотиди се отстраняват чрез прибавяне на 1 мкл 10 % (т/о) СТАВ и след това се центрофугира в микроцентрофуга 20 минути при 4° С. Утайката се разтваря в 10 мкл 1М натриев хлорид, преди да се прибави 0.25 мкг глюкоген и 30 мкл студен етанол. Оставя се една нощ да се утаи при -20° С. Утайката се промива в 70 % етанол и се разтваря в 20 мкл 50 мМ натриева основа, 2 мМ ЕДТА и се държи при 65° С в продължение на 60 минути, за да се хидролизира РНК. сДНК отново се утаяват с етанол, промиват се и утайката се разтваря в 20 мкл вода.

7.2. PCR разработване

PCR разработването на хомополимерно тайлиран първи отрязък сДНК при използване на амплимери:

$^{+}$A (олиго dT_{17}-Not I); GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTT

$^{+}$B (олиго dC_{14}-Eco R I); AAGGAATTCCCCCCCCCCCCCC

PCR реакцията съдържа 10 мкл 10 х PCR буфер (100 мМ трис HCI, pH 8.3, 500 мМ KCI, 40 мМ магнезиев хлорид, 0.1 % желатин), 10 мкл 10 х dNTP смес (по 5 мМ от dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 рмола амплимел А, 100 рмола амплимер В, 2 единици Taq полимераза и 1 - 1

ng олиго (d G), тайлирани сДНК в общ реакционен обем 20 мкл, и се наслоява отгоре с 20 мкл минерално масло. След това се подлага на следния термален цикличен режим: 1 цикъл 96° С, 2 минути за денатуриране на продуктите; (96°С, 2 минути, 58°С, 2 минути, 72° С 3 минути), за да се позволи синтезата на втория отрязък, 1 цикъл (96°С, 2 минути, 40° С 2 минути, 72°С, 2 минути), за да се осигури добро зареждане от олиго (d T) края; 15 цикъла (96°С, 2 минути; 58°С, 2 минути; 72°С 3 минути) за разработване на продуктите. Реакционната смес се фракционира чрез електрофореза през Nu сито GTG L.P (ГМС Биопродъктс) гел при използване на 123 bp ДНК стълба като маркировач на големината и региони на гела, отговарящи на размери от класите < 500, 500 до 1500, 1500 до 2000 и >2000 bp се изрязват и се отделят от гела чрез замразяване при -20° С, след това се центрофугира в микроцентрофуга 10 минути в Спин-Х филтри (Костар). PCR продуктите се оцветяват със Саутърн и се хибридизират до 3 клона, за които е известно, че са конститутионно експресирани в корените на картофите. сДНК проучванията на дълги и къси, високи и ниски транскрипти, хибридизирани до PCR продукти, отразяват представителството на различни транскрипти в библиотеката.

7.3. Строеж на библиотеката

Възстановената ДНК (по-голями от 200 bp) се разгражда с EcoRI и Not I и се свързва с по подобен начин разграден lambda-ZAP преди опаковане in vitro при използване на Стратаген Гига Плъс опаковки съгласно указанията на производителя. Определя се титърът на библиотеката върху E. coli щам XL 1-синьо при използване на плочки LB покрит с 1 % агар, съдържащ 12.5 мМ IPTG и 6.25 мг/мл Х-гал.

7.4. Оценяване на библиотеката

Качеството на PCR, базирано на cDNA библиотека, се оценява по два начина 1) приблизително 96 % плаки, които се доказва, че са рекомбинати, както е показано чрез вътрешната инактивация на бета-галакто

зидазна алфа-комплементация; 2) плаки, подбрани случайно, в PCR буфер и разработени при използване на комплементарни M 13 амплимери, п казват отделни вмъквания (включвания) от порядъка на 230 bp - 1000 b като средния размер на включванията е 470 bp.

7.5. Диференциално отсяване

Библиотеката дава 3.5 x 10^5 рекомбинантни фаги, от които 6 x 10^4 се отсяват с ^{32}P dCTP-белязани проби, синтезирани като първи отрязъ сДНК от 10 мкл обща РНК, получена било от инфектирани коренови тъкан 26 дни след Ro2 инвазията или от здрави корени на същата възраст (Gu S.J., McPherson M.J.1991, PCR-based cDNA library construction. In: McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. (eds) Polymerase chain reaction: A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford). Невключеният изотоп се отстранява чрез утаяване с амони ев ацетат и пробите се жустират, за да имат еквивалентно на cpm/мкг сДНК/мл хибридизационна течност, след което се преброяват течностно сцинтилационно. Разработването на плаките се извършва в повторение и те се денатурират в 0.5 M натриева основа, 1.5 M натриев хлорид и се неутрализират в 1.5, 0.5 M трис pH 7.2 и 1 mM ЕДТА и се нагряват (80^0 C, 2 часа), Филтрите се прехибридизират в отделни "здрави" и "инфектирана" прехибридизационна течност, съдържаща 5 X SSPE, 6% PEG 6000, 0.5 % Марвел (обезмаслено прахообразно мляко), 1 % SDS, 0.1 натриев пирофосфат и 250 мкг/мл, обработена с ултразвук и денатурира на херингова сперма ДНК при 65^0 C в продължение на 6 часа. Хибридизацията се извършва при 65^0 C 24 часа, след което се прибавя съответната радиобелязана проба от 1-вия отрязък. След хибридизиране филтри те се промиват последователно в 5 x SSC, 0.1 % SDS, след това в 1 SSC, 0.1 % SDS при 65^0 C, за 2 x 20 минути във всяки разтвор. Пет ната се излагат на рентгенов филм, с интензификационно отсяване при -70^{0}C. Плаките се хибридизират към Ro 2 дни 26 проба и не съвсем здр вите 26 дневна проба и се пречистват до хомогенност чрез 2 допълните

ни кръга на отсяване на плаките.

8. Нортерн и Саутерн хибридизация и получаване на пробите

РНК заредена 10 мкг на трак се разделя чрез 0.6 М формалдехиден агарозен гел при протичане с 7.5 V $см^{-1}$. Гелът се фотографира и промива 2 х 20 мин в 10 х SSC и се нанася върху Хайбонд-N мембрана (Амершам) с 10 х SSC. Филтрите се нагряват (80° С, 2 часа) и се прехибризидират в продължение на 12 часа при 42° С в 50 % формамид, 5 х SSC, 1 х Денхардс, 100 мг/мл ДНК от сперма на херинг и 250 мМ фосфатен буфер, (pH 6.5). Хибридизацията се извършва в пресен прехибридизиращ буфер, включително топлинно денатуриран ^{32}P-хексаприм-белязан pPSR 2 - 4 проба (25 нг) (Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983 Nucleic Acids Research 14, 2229) при 42°С в продължение на 24 часа. Филтрите се промиват последователно в 5 х SSC 0.1 % SDS при 42° С, след това 2 х SSC 0.1 % SDS при 42° С и накрая едно последно промиване при 65°С в 2 х SSC 0.1 % SDS. Петната се излагат на рентгенов филм с интензифициращи отсявания при 70° С. PMR 1 включване се получава, като се вземе една единствена пречистена плака в PCR буфер и се амплифицира с комплементарен M13 амплимери съгласно Gussow, D. & Clackson, T., (1989 Nucleic Acids Research 17, 4000).

Геномна ДНК се получава от ядра изолирани от млади картофени листа (сорт Марис Пайпер), както е описано от Jofuku, K. D. & Goldberg, R. B. (1989, In Plant Molecular Biology: A Practical Approach pp 37-66).

ДНК с високо молекулно тегло се фракционира по размери през 0.6 агарозен гел, след което се разгражда с рестриктиращи ензими. За анализиране на генната експресия в цялото растение, РНК се екстрахира от стеблата, от дръжките на листата, от листата, от цветовете и корените на инфектираните и от незаразените растения. За да се анализира реакцията след откъсването (нараняването), корените или листата на растението се надробяват и РНК се екстрахира от третираните тъкани в периоди от време (3, 6, 9 и 12 часа след надробяването). Проби-

се сравняват чрез Нортернова анализа с РНК, екстрахирана от корени, за разени с нематоди. Геловете се онечистват, денатурират и се нанасят върху Хайбонд-N мембрана (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989 Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbour Press). Филтърът се нагрява (80°C, 2 часа) и се прехибридизира в продължение на 6 часа при 65°C в прехибридизационна течност, както е описано при диференциалното отсяване на плаки. Описани са условията на хомогенна хибридизация и промиване за нортерно блот филтри. Хетерологусна хибридизация се извършва при 56°C и напълнителите се промиват в 5 x SSC при 56°C.

9. Изрязване на рБлустрипта от ламбда ZAP и пречистване на плазмида

рБлустрипт клона PMR1, носещ включението, чиято последователност е показана в една от формулите 1 до 8, се изрязва от позитивно хибридизиращия ламбда ZAP клон и се освобождава съгласно указанията в Стратагеновия наръчник. Плазмидът ДНК се пречиства чрез цезиевохлорид но плътностно градиентно центрофугиране (Davis L., Dibner M. D., Bate; J.F. 1986 Basic methods in molecular biology, Elsevier Science Publishers, New York).

10. Анализ на последователността

Анализът на ДНК последователността се извършва върху алкално денатуриран плазмид ДНК, съгласно методите, описани в протоколите на производителите за секвеназа (вариант 2.0) реакциите (Юнайтет Стайтс Биокемикъл Корпорейшън). Данните от ДНК последователността се сравняват с базисните данни на EMBL и Генбанката (релиз 23) при използване на QUICKN програма, която прилага алгоритмите на Lipman u Pearson (Lipman d.j.k., Pearson W.R., 1985 Rapid and sensitive protein similarity searches, Science 227: 1435 - 1441) протичащи на VAX 11/750 компютър VMS оперираща система.

11. Изолиране на геномния клон

Ламбда EMBL 3 геномна ДНК библиотека се създава, като се из-

ползва частично EcoRI, разградена с Марис Пайпер геномна ДНК, съгласно методите, описани от Sambrook et al. (1989) ibid.
Библиотеката се отсява чрез покриване, приблизително на 1.8 x 10^5 клона, като се приготвят дубликатни плочести лифт филтри. Те се прехибридизират и след това хибридизират и промиват по начина, както вече беше описан в раздел 7.5, с изключение на това, че пробата се получава чрез хекса-прим белязано ДНК включение, PCR амплифицирано (Gussow D., Clackson T., 1989 Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction, Nucleic Acids Research 17 : 10)
от сДНК клоните, pPMR1, pPMR2 или pPMR3.

Позитивни хибридизационни клона, получени след 3 рунда на хибридизационно отсяване, по-нататък се охарактеризират чрез рестрикционен анализ и ДНК последователност Sambrook et al., (1989 ibid), за да се локализират промоторните последователности.

12. Хибридизация in situ

Тъкани от заразени и незаразени корени се поставят във восъчни, секционирани, прехибридизирани и след това хибридизирани до сенз и антисенз проби от pPMR1, pPMR2 и pPMR3, както е описано от Jackson D., (In Molecular Plant Pathology: A Practical Approach (ed. S. J. Gurr, M. J. McPherson and D. J. Bowles IRL Press, Oxford, 1991)

13. Произвеждане и регенериране на трансгенни растения

Трансгенни картофи се получават съгласно методите описани от Harsh et al. (1985 Science 227,1229-1231) при използването на Agrobacterium щам GV 3101, съдържащ pGV 3850, носещ захранващи клетките специфични промотори, споени със съответния разграждащ ген, подбран от тези, споменати във въведението на настоящето описание, и малките растения се получават преди да се изследват за нематодна резистентност.

ПРИМЕР 2

Присъствие на еквивалентни гени в други растителни видове

Гени от един вид растение могат да се експресират в коректен по време и пространство начин в друг вид растение, дори когато видовете принадлежат към различни растителни семейства. Благодарение на подобното по физиология и патология установяване на синцитиум в цивките на развитие на цистообразуващите нематоди в растенията от много семейства, генът, експресиран в синтициума на едно растение, ще се експресира коректно и при въвеждането му в различни растителни видове.

Потвърждение се получава при идентифициране на еквивалентни гени в други растителни видове. Геномни ДНК разграждания при тютюн, домати и захарно цвекло се изследват чрез хибридизиране към pPMR1 (като се следва метода от раздел 8). Във всички случаи се наблюдава кръстосана хибридизация, което показва, че съществуват в тези растения еквивалентни гени. Конструкция, включваща промотора на гена, представен чрез pPMR1, е поради това способен да направлява точното локализирано експресиране на подходящ анти-нематоден ген в редица културни растения. Тези опити осигуряват пътя за изолиране на еквивалентен ген от други видове растения, за да се експресира антинематоден защитен механизъм в тях.

Патентни претенции

1. Метод за борба с нематоди, който включва етапите на идентифициране на гена, индуциран в успешно заразеното с нематодна инфекция растение, и модифициране на гена, за да предаде нематодна резистентност на растението.

2. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че включва етапа на идентифициране на гените, характерни с това, че се индуцират от нематодната зараза на местоположението на хранене в растението .

3. Метод за борба с нематоди съгласно претенции 1 или 2, характеризиращ се с това, че включва етапите:

изграждане на сДНК библиотека при използването на полимеразна верижна реакция (PCR);

сравняване на тази библиотека с сДНК от заразени и незаразени растения и

идентифициране на сДНК клона, представляващ ген, експресиран на местоположението на храненето, и използване на сДНК клона за изолиране на съответен геномен клон.

4. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че този ген или част от него включва ДНК последователност, състояща се по същество от или еквивалентна на някоя от групите, включващи:

GCCCAAACTTTCCGGTGTACTCCTTGTCCTTGTTTTTTGTAGTCTTTTACCTATCCAAC

AAAAATTTCTCGCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATTT

CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(формула 2)

GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTGTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG

CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT

TAAATTAAAGTTAGCAACGG (формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCGNNCGGCTGCCGGGGCTGGC

GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT

ACTTTTCGGAACTATGCACACCGGCTGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCGCTACCTTTCGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGAGTCACCTACCGCT

TTGAATGAC (формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTTGCGGAC

GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (формула 7)

CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT
GGGAAACCC (формула 8)

в които A означава аденин

C означава цитозин

T означава тимин

G означава гуанин

и N означава неопределен нуклеотид .

5. Метод за борба с нематоди, включващ етапа на съчетаване на промоторен регион, получен от ген, добит по метод от някоя от предишните претенции, с други региони, кодирани за продукти на разграждането в резултат на нападението от нематоди.

6. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че включва етапа на комбиниране на промоторен регион на горния ген с регион, кодиран за средства, адаптирани да унищожават клетка, която се залавя да редиференцира към местоположението на храненето.

7. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че средствата, адаптирани да унищожат клетка, са подбрани от група, включваща:

- ДНКаза, РНКаза или протеиназа, токсичен протеин или токсичен пептид;

- мулти-генен токсичен синдром;

- нечувствителна РНК към редиференцираните клетки .

8. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че другите региони кодират продукт притежаващ летален или добре проявен сублетален ефект при поемане от нематоди.

9. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че продуктът е подбран от група, състояща се от:

- токсичен за нематода протеин

- антитяло, което действа вредно при поглъщането му от нематода

- токсичен за нематодите невропептид .

10. Резистентно на нематоди растение съдържащ ген или модифициран ген, получен по метод съгласно всяка от предишните претенции.

11. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че нематодите са цистообразуващи нематоди.

12. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че растенията са подбрани от рода Solanum.

13. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че растението е Solanum tuberosum.

14. Резистентно на нематоди растение, характеризиращо се с това, че съдържа модифициран ген, създаден от ген, включващ ДНК последователност, състояща се предимно от последователност, подбрана от групата, включваща:

GCCCAAACTTTCCGGTGTACTCCTTGTCCTTGTTTTTTGTAGTCTTTTACCTATCCAAC

AAAAATTTCTCGCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATTT

CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(формула 2)

GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG

CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT

TAAATTAAAGTTAGCAACGG (формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCGNNCGGCTGCCGGGGCTGGC

GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGGATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT

ACTTTTCCGAACTATGCACACCGGCTGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCGCTACCTTTCGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGAGTCACCTACCGCT
TTGAATGAC (формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTTGCGGAC
GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (формула 7)

CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT
GGGAAACCC (формула 8)

в които A означава аденин

C означава цитозин

T означава тимин

G означава гуанин

и N означава неопределен нуклеотит .

15. Резистентно на нематоди растение от рода Solanum , характеризиращо се с това, че съдържа генна последователност съгласно претенция 14.

16. Използване на растително генен промоторен регион, идентифициран чрез метода на всяка от претенциите от 1 до 13 или в съответствие с претенция 14 за предаване на резистентност на растението по отношение на цистообразуващи нематоди.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова Редактор: Н. Божинова

Пор. 37666 Тираж: 40 ЮМ