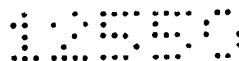


3844/42

KÖZZÉTÉTELI

PÉLDÁNY



69774

Növényekre káros gombák és egyéb mikroorganizmusok
pusztítására alkalmas anyagok és eljárás növények
rezisztenciájának fokozására

Pioneer Hi-Bred International, Inc.,

Des Moines, Iowa, Amerikai Egyesült Államok

Bejelentés napja: 1992.12.04.

Elsőbbsége: 1991.12.06.

K I V O N A T

A találmány tárgya eljárás tachyplesin-re érzékeny növényi patogén mikroorganizmusok pusztítására és szaporodásának inhibálására. A találmány szerinti eljárást úgy végzik, hogy a patogén mikroorganizmusok környezetébe antimikrobiális mennyiségű tachyplesin-t juttatnak be.

A találmány szerinti megoldásnál a növény genomjába tachyplesin-t kódoló szekvenciát illesztnek a transzkripció iniciátor és promoter szekvenciát tekintve megfelelő leolvasási keretben, amely működése során a növényben a tachyplesin-t kódoló szekvencia expresszálását idézi elő, miáltal az általában patogénnel fertőzött növény szöveteiben antimikrobiális mennyiségű tachyplesin képződik.

Jellemző leírás


Bevért

3844/92

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

12850

A

Képviselő:

Danubia Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Budapest

NSIO 6
C12N 15/31
C12N 15/82
A61N 63/02

**Növényekre káros gombák és egyéb mikroorganizmusok
pusztítására alkalmas anyagok és eljárás növények
rezisztenciájának fokozására**

Pioneer Hi-Bred International, Inc.,

Des Moines, Iowa, Amerikai Egyesült Államok

Feltaláló:

Aragula Gururaj Rao biológus,

Urbandale, Iowa, Amerikai Egyesült Államok

Bejelentés napja: 1992.12.04.

Elsőbbsége: 1991.12.06. (802794) us

76331-1045-FE

A találmány tárgya növényekre káros gombák és egyéb mikroorganizmusok pusztatására alkalmas anyagok, és eljárás növények rezisztenciájának fokozására.

A találmány tárgya továbbá eljárás tachyplesin-re érzékeny növényi patogén mikroorganizmusok elpusztítására és szaporodásuk inhibálására.

A találmány szerinti eljárást úgy végezzük, hogy a patogén mikroorganizmus környezetébe antimikrobiális mennyiségű tachyplesin-t juttatunk.

A mezőgazdaságban komoly károkat okoznak a gombák és baktériumok. Ezek elleni védekezésre anti-mikrobiális hatású szerves vegyületeket, valamint részben szerves vegyszereket használnak. Ennek a megoldásnak számos hátránya van. Újabb megoldás szerint a mikroorganizmusok elleni védekezésre olyan mikroorganizmusokat használnak, amelyek biológiai úton fejtik ki hatásukat, és amelyek a nemkívánatos mikroorganizmusok tekintetében természetes vetélytársat képeznek. E módszer hátránya, hogy nem könnyű feladat nagy felületekre felvinni ezeket a biológiai védőhatást biztosító mikroorganizmusokat, és még nehezebb feladat azt elérni, hogy ezek az élő mikroorganizmusok hosszabb időn keresztül megmaradjanak a kezelt területen. Legújabbban a rekombináns DNA technika alkalmazása új lehetőségeket nyitott meg; eszerint a növényi sejtekbe olyan klónozott géneket visznek be, amelyek antimikrobiális hatású vegyületeket expresszálnak. Azonban, ez a technológia olyan aggodalmakat keltett, hogy ez a módszer a kórokozók rezisztenciáját idézi elő a természetben előforduló antimikrobiális tényezőkkel szemben, különösen

azon a területeken merül fel ez a probléma, ahol a kiválasztás jelentős szerepet játszik. Így változatlanul fennáll annak szükségessége, hogy azonosítsuk azokat a természetben előforduló antimikrobiális hatású vegyületeket, amelyeket a növényi sejtek valamely strukturális gén lefordításával közvetlenül képeznek.

A 204 590 számú európai szabadalmi bejelentés (amely a 725 368 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésre alapítva lett benyújtva), olyan módszert ismertet, amely egy növényi sejtet genetikailag módosít, és ennek révén szabályozza az idegen szerkezetű gének expresszálasát. E módszerrel a növényi sejtet oly módon alakítják át, hogy abban egy pRi T-DNA promotert és egy idegen strukturális gént visznek be, ahol a promoter és a strukturális gén egymáshoz olyan helyzetben is orientációban van, hogy a promoter irányítása alatt a strukturális gén expresszáldjon.

Hasonlóképpen a 186 425 számú európai szabadalmi leírás (amelyet a 685 824 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásra alapítva nyújtottak be) olyan rekombináns DNA expressziós vektort ír le, amelyben (a) egy transzkripció egység van, amelyhez egy T-DNA határ szekvencia kapcsolódik, ez utóbbiban egy promoter és ehhez kapcsolódóan a szekvenciák kódolására alkalmas amino terminális régió és egy terminátor jelszekvencia kötődik, ez utóbbiban a szekvenciák a növényi sejtben természetesen expresszált géntől vagy génektől származnak, továbbá (b) egy antibiotikus rezisztencia gén-kódoló szekvencia van a promoter és az ehhez kapcsolódó amino-terminális

régiót kódoló szekvencia, valamint a terminátor szekvencia között elhelyezkedve, továbbá (c) egy DNA fragmentum van, amely az *Agrobacterium*tól származik és ebben fejt ki működését.

A 8807087 számú PCT bejelentés (amely a 168 109 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésre alapítva lett benyújtva) olyan rekombináns vírus expressziós rendszert ismertet, amely egy *Heliothis* polyhedrin promotert és egy nukleotid szekvenciát kódoló heterológ peptidet vagy fehérjét tartalmaz, amely rendszernek feltehetően antimikrobiális hatása van.

Akaji, K. és munkatársai [Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 37(10):2661-2664 (1989)] a kardfarkú tarisznnyarákból (*Limulus* poliphenus) kinyert három peptid szintézisét írja le, ezek között szerepel a tachyplesin I és II.

Kawani, K. és munkatársai [J. Biol. Chem. 265(26):15365-15367 (1990)] a tachyplesin I elkülönítését írja le. Az elkülönítést a kardfarkú tarisznnyarék hemocitáiból végzik; ugyanitt ismertetik a tachyplesin I szerkezetének meghatározását.

Miyata, T. és munkatársai [J. Biochem (Tokyo) 106(4): 663-669 ismertetik a tachyplesin II elkülönítését kardfarkú tarisznnyarákból kiindulva, ugyanitt ismertetik a tachyplesin II szerkezetének és biológiai hatásának tisztázását.

Muta, T. és munkatársai [J. Biochem. (Tokyo) 108(2):261-266 (1990)] a tachyplesin III elkülönítését és e vegyület prekursorjának előállításánál használható intermedier előállítását ismertetik.

Nakamura, T. és munkatársai [J. Biol. Chem. 263

(32):16709-16713 (1988)] a tachyplesin elkülönítését és kémiai szerkezetét ismertetik.

Niwa, M. és munkatársai, [First Scientific Meeting of the Japanese Association for Developmental and Comparative Immunology (Jadci), Tokyo, Japan, November (14(2):2-3 (1990)] a tachyplesin izopeptidek antimikrobiális hatásával foglalkoznak.

Shieh, T.C. és munkatársai [FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett., 252(1-2):121-124 (1989)] a tachyplesin I szintézisét és tulajdonságait ismertetik.

Shigenata T. és munkatársai [J. Biol. Chem. 265 (34):21350-21354 (1990)] a tachyplesin prekursor ppetidjében lévő cDNA klónozását, valamint e peptidnek a kardfarkú tarisznyarákban történő celluláris lokalizációját ismerteti.

A 02207098 számú japán közzétett szabadalmi bejelentés (Taiyo Fishery KK) olyan kompozíciót ismertet, amely nagy specifikusságot mutat a β -glukánnal szemben. Ez a készítmény Lumulina-tól származó amoebocita sejtbomlás terméket, továbbá vérsejt membrán proteineket, ideértve a tachyplesin I-t és II-t, tartalmaz.

A 0 22 04500 számú japán közrebocsátott szabadalmi leírás [szintén Taiyo Fishery KK bejelentése] a pirogéneknek folyadékokból történő eltávolítására alkalmas oldhatatlan vivőanyagot ismertet. Ezt oly módon állítják elő, hogy tachyplesin I és II-ként azonosított rák peptideket vízben oldhatatlan vivőanyaghoz kötnek.

A technika állását fenti közleményekkel mutattuk be.

A találmány megalkotása során azt találtuk, hogy a

tachyplesin peptid jelentős antimikrobiális hatást mutat a közönséges növényi kártevőkkel szemben. A tachyplesin egy kisméretű peptid, amit eredetileg a kardfarkú tarisznyarák (*Tachypleus tridentatus*) hemocitáiból állítottunk elő. A peptid 17 aminosavból áll, ebből 6 cisztein. Japán kutatók kimutatták, hogy a peptid hatásos Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal, továbbá *Candida albicans*-szal szemben. A tachyplesin szerkezete egy antiparallel (ellenkező irányítású) β -lapból áll, amely egy β -fordulattal van összekötve. A lap egyik oldalán öt nagyméretű hidrofób oldalláncot lehetett lokalizálni, a molekula hátsó részén hat kationos oldallánc van elosztva. Három izopeptid ismeretes, ezeket tachyplesin I, II és III-mal jelöljük. A peptid előfordulhat egyenes lánc alakjában, ezt a példákban "nyers" formaként említjük, de a peptid megjelenhet oly módon is, hogy a molekulában a szemben lévő cisztein csoportok között diszulfid hidak képződnek, a példákban ezt "oxidált" alaknak nevezzük. A technika állásában ismertetett vegyületnél a karboxil terminálisnál egy amidált arginin-csoport található, ezzel szemben a példáinkban alkalmazott vegyületben a karboxi-terminális arginin-csoportnál egy karboxil-csoport található. A találmány szerinti megoldásnál bármely fent említett peptid alak alkalmazható önmagában, vagy valamelyik másik alakkal kombinálva, és egyszerűség kedvéért a továbbiakban tachyplesin néven fogjuk a peptidet jelölni. Ez a peptid különösen hatásos az alábbi növényi kórokozó gombák, és a magokat károsító kórokozókkal szemben: *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia*

trifoliorum és *Aspergillus flavus*. Mindezen gombák nagy gazdasági jelentőséggel bírnak. A fentiekben említett tachyplesin peptid különösen hatásos az igen makacs *Aspergillus flavus* gombával szemben, és ezért e peptid feltehetően eredményesen alkalmazható a tárolt magok aflatoxin fertőzésének csökkentése terén.

A találmány tárgya növényi kórokozók pusztítására alkalmas eljárás, ideértve a fent említett mikroorganizmusokat is; a találmány szerinti eljárás során a káros mikroorganizmusok környezetébe antimikrobiális mennyiségű tachyplesint viszünk. A mikroorganizmusokkal fertőzött növényekre a tachyplesint eredményesen alkalmazhatjuk spray, por vagy egyéb készítmény formájában felvive. Másik megoldásként a peptidet az érzékeny növények szöveteibe bevisszük, így a növény fertőzése során a kórokozók antimikrobiális mennyiségű peptid hatásának vannak kitéve. Egy célszerű megoldás szerint a tachyplesint olyan nem-fitotoxikus vivőanyaggal elegyítjük, amely alkalmas az érzékeny növény szisztémikus kezelésére. Ezt a módszert alkalmazzák általában olyan inszekticid anyagok esetében, amelyeket a rágcsáló rovarok ellen használnak, az inszekticidek és lárvák elleni készítmények tekintetében járatos szakember előtt ezek jól ismertek. Minthogy a tachyplesint kódoló gén elkülönítése, klónozása, megfelelő expressziós kazettába való helyezése és egy érzékeny növényfélése sejtjébe való bevitele megoldható, a találmány szerinti eljárás különösen előnyös megoldása szerint a tachyplesint kódoló DNA szekvenciát a növény genomjába visszük az adott növényben hatásos transzkripciós iniciátorral és

promoter szekvenciával együtt. A szabályozó szekvenciák ellenőrzése alatt a DNA szekvencia transzkripciója és lefordítása azt eredményezi, hogy a tachyplesin szekvencia olyan mértékben expresszálódik, ami antimikrobiás mennyiségű peptid képződéséhez vezet a kórokozók által általában megtámadott növényi szövetekben. Az általában ismert klónozás, DNA elkülönítés, szaporítás és tisztítás, enzimatis reakciók - beleértve a DNA ligáz, DNA polimeráz, a restrikciós endonukleáz és hasonló enzimekkel végzett reakciókat - és a különböző elkülönítési módszerek segítségével [így például R. Wu, kiadó, (1979) Meth. Enzymol. 68; R. Wu és munkatársai, (1983) Meth. Enzymol. 100, 101; L. Grossman és K. Moldave, kiadók, (1980); Meth. Enzymol. 65; J. H. Miller (1972) Experiments in Molecular Genetics; R. Davis és munkatársai, (1980) Advanced Bacterial Genetics; R. F. Schleif és P. C. Wensink (1982) Practical Methods in Molecular Biology; és T. Manniatis és munkatársai (1982) Molecular Cloning]. Bármely megfelelő, a tachyplesin gént tartalmazó génszerkezetet alkalmazhatjuk a találmány szerinti megoldásnál.

A találmány szerinti eljárást olyan növények kezelésére alkalmazzuk, amelyek érzékenyek, és hajlamosak a *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Aspergillus flavus*-szal való fertőzésre. Ezek közül említjük meg a gabonát (*Zea mays*), a cirok fajtákat (*Sorghum bicolor*). E növényeket azonban nem korlátozó értelemben említettük. Az említett fajták a gyakorlatban igen nehezen kezelhetők, megbízható átalakításuk és regenerálásuk nem könnyű feladat; a fent említett mikroorganizmusok számos

egyéb növényeket is megtámadnak. A találmány szerinti eljárást eredményesen alkalmazhatjuk hagyományos módszerek segítségével számos egyéb növényféléseknél is, amennyiben ezek a növények érzékenyek az alábbiakban felsorolt kórokozókra nézve; a korlátozás szándéka nélkül említjük meg a *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manicot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersicon*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hemerocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browallia*, *Glycine*, *Lolium*, *Triticum* és *Datura* fajtákat.

A találmány szerinti eljárást igen eredményesen alkalmazhatjuk a gabonanövényeknél, így kukoricánál, rizsnél, árpánál, búzánál, ciroknál, zabnál, rozsnál, kölesnél, a napraforgónál, lucernánál, repcemagnál és szójababnál.

Az a DNA szekvencia, amely amikor expresszálódik, antimikrobiális hatást fejt ki, egy strukturális gén, amely a tachyplesint kódolja.

A tachyplesint kódoló DNA szekvenciát hagyományos módszerrel állíthatjuk elő, a gént megfelelő restriktív enzimek segítségével különíthetjük el, és egy kiválasztott növény expressziós kazettájába illesztjük be. Másik megoldásként a tisztított tachyplesint ismert módon teljes méretében szekvenáljuk, majd szintetikus DNA szekvenciákat állítunk elő, ezek az aminosavak szekvenciáját kódolják. Ezt a szintetikus szek-

venciát azután a megfelelő növény expressziós kazettájába illesztjük be.

Hasonlóképpen az irodalomban számos növényi expressziós kazetta és vektor van leírva. Az expressziós kazetta kifejezésen a kontroll szekvenciák teljes készletét értjük, ideértve az iniciátort, promotert, termináló szekvenciát, amelyek egy növényi sejten működnek a strukturális gén működése során. Az expressziós kazetták gyakran tartalmaznak előnyös esetben különféle restrikciós helyeket, amelyek alkalmasak arra, hogy azon a ponton a láncot felszakítsák, és oda bármely kívánatos szerkezeti gént beillesszenek. Fontos, hogy a klónozott génben a megfelelő leolvasási keretben egy induló kód álljon rendelkezésre a strukturális szekvencia számára. Ezen túlmenően a növényi expressziós kazetta célszerűen tartalmaz egy erős, konstitutív promoter szekvenciát az egyik végen, így a gén átírható nagy sebességgel, a másik végen pedig egy poli-A felismerő szekvencia áll rendelkezésre a replikáció biztosítására, és a messenger RNA továbbítására. Egy előnyösen alkalmazható (üres) expressziós kazettára, amelybe a találmány szerinti cDNA-t bele lehet illeszteni, példaként említjük meg a pPHI414 jelzésű plazmidot, amelyet Beach és munkatársai fejlesztettek ki [Pioneer Hi-Bred International Inc., Johnston, IA, a módszert a 387 739 számú, 1989. augusztus 1-én bejelentett amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás ismerteti, valamint ennek 785 648 bejelentési számmal 1991. október 31-én benyújtott CIP bejelentése, amely megoldást jelen eljárás során referenciaként említjük és használjuk]. A célszerűen alkalmaz-

ható növényi expressziós kazettákat oly módon állítják elő, hogy abban egy vagy több választható jelzőgén legyen, ezek közül említjük meg a kanamicin rezisztencia és a herbicid tolerancia géneket.

A vektor megjelölésén egy DNA szekvenciát értünk, amely képes arra, hogy a gazdasejtben egy idegen gént lemásoljon és expresszálnak. Rendszerint a vektorban egy vagy több endonukleáz felismerő hely van, amely a megfelelő enzim alkalmazásával a várákozásnak megfelelően felszakítható. Ezeket a vektorokat célszerűen oly módon készítik el, hogy tartalmazzanak további strukturális gén szekvenciákat, amelyek az antibiotikumokkal vagy herbicidekkel szemben rezisztenciát mutatnak, amelyek azután jelzőként szolgálnak, és az átalakított sejtek azonosítására és elkülönítésére használhatók. A jelzésre szelekciós szerként célszerűen kanamicint, klór-szulfuront, foszfonotricint, higromicint vagy metotrexátot alkalmaznak. Azt a sejtet, amelyben egy vektorban lévő idegen genetikai anyagot funkcionálisan expresszálnak, a vektor által átalakítottnak tekintjük, és transzformált sejtként említjük.

Az előnyösen alkalmazható vektorok közül említjük meg a plazmidot, ez egy köralakú duplaszálú DNA molekula, amely nem része a sejt kromoszómáinak.

A találmány szerinti megoldásnál alkalmazhatunk tachyplesint kódoló genomot vagy cDNA-t. A megoldáshoz alkalmazható vektort részben cDNA klónból, részben genom klónból is elkészíthetjük. Amikor a gént elkülönítjük, olyan genetikai szerkezetet állítunk elő, amelyben benne van a szükséges szabá-

lyozó szekvencia, amely gondoskodik a génnek eredményes expresszáálásáról a gazdasejtben. A találmány szerinti megoldás szerint a genetikai szerkezet tartalmaz (a) egy genetikai szekvenciát a tachyplesin kódolására, és (b) egy vagy több szabályozó szekvenciát, amely a strukturális gén bármely oldalához kapcsolódik. A szabályozó szekvencia rendszerint a promoterekből és terminátorokból van kiválasztva. A szabályozó szekvenciák autológ vagy heterológ forrásokból származhatnak.

A genetikai szekvenciákhoz alkalmazható promoterekhez tartoznak az nos, ocs, fazeolin és CaMV promoterek.

Célszerű olyan növényi promotert alkalmazni, amely a túltermelést biztosítja. Ezek közül említjük meg a szójababból kinyert ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis méretű alegységét (ss) [Berry-Lowe és munkatársai, J. Molecular and App. Gen., 1,483-498 (1982)], továbbá a klorofill α - β megkötő fehérje promoterjét. Ez a két promoter ismert módon fény hatására fejti ki működését eukariota növényi sejtekben [lásd például Genetic Engineering of Plants, An Agricultural Perspective, Cashmore A., Pelham, New York, 29-38, (1983), Coruzzi g. és munkatársai, J. Biol. Chem. 258, 1399 (1983), továbbá Dunsmuir P. és munkatársai, J. Molecular and App. Gen. 2, 285 (1983)].

A tachyplesin strukturális génjét tartalmazó expressziós kazetta, amely a kívánt kontroll szekvenciákkal van összekapcsolva, beépíthető a megfelelő klónozó vektorba. Általában olyan plazmid vagy vírusos eredetű (bakteriofág) vektorokat alkalmazunk, amelyek a gazdasejtekkel kompatibilis fajtákból

nyert replikációkat és kontroll szekvenciákat tartalmaznak. A klónozó vektor általában tartalmaz egy replikációs origót, továbbá specifikus géneket, amelyek képesek az átalakított gazdasejtekben szelekciós jelzőket előállítani. Rendszerint olyan géneket alkalmazunk, amelyek az antibiotikummal szembeni rezisztenciát vagy kiválasztott herbicidekkel szembeni rezisztenciát képesek átvinni. Miután a genetikai anyagot a cél sejtekbe bevittük, a sikeresen átalakított sejteket és/vagy sejttenyészeteket ezen jelzők alapján elkülönítjük.

A találmány szerinti megoldás szerint rendszerint egy közbenső gazdasejtet alkalmazunk a klónozó vektorok szaporítására. Miután a tachyplesin gén tartalmú vektorok számát megnöveltük, ezek elkülöníthetők jelentős mennyiségben, majd ezeket a kívánt növényi sejtbe beillesztjük. A találmány szerinti megoldásnál gazdasejtként használhatunk prokariotákat, így bakteriális gazdasejteket, mint például *E. coli*-t, *S. typhimurium*-ot, vagy *Serratia marcescens*-t. Az Eukariota gazdasejtek, mint például az élesztő, vagy a rostos gombák, szintén alkalmazhatók a találmány szerinti megoldásnál. Ezek a gazdasejtek szintén mikroorganizmusok, ezért lényeges, hogy olyan növényi promotereket alkalmazzunk a vektorban, amelyek a baktériumokban nem expresszálják a tachyplesin-t, vagy pedig olyan gazda mikroorganizmust alkalmazzunk, amely rezisztens tachyplesin-nel szemben.

Az elkülönített klónozó vektort ezután a növényi sejtbe bevisszük, ezt hagyományos technikával végezzük, például elektroporálással (protoplaszt), retrovírusok segítségével,

bombázással, mikroinjekció alkalmazásával. A beültetést végezhethetjük egyszikű vagy kétszikű növények sejtjeiben, sejt- vagy szövettenyészetekbe, így olyan transzformált növényi sejteket kapunk, amelyek idegen DNA-ként legalább egy, de célszerűen több másolatot tartalmaznak a növényi expressziós kazetta DNA szekvenciájáról. Az egyszikű növények közül alkalmazhatunk kukoricát, citromfű növényt, búzát vagy rizst, a kétszikű fajták közül említjük meg a szójababot, lucernát, dohány növényt és a paradicsomot. Az ismert technika alkalmazásával a protoalakat regeneráljuk, hasonlóképpen a sejt vagy szövettenyészeteket regenerálhatjuk, így olyan termékeny növényeket nevelhetünk, amelyek hordozzák és expresszálnak a tachyplesin géneket. A találmány egyik célszerű megoldása szerint előállíthatunk olyan transzformált kukorica növényt, amelyek sejtjei idegen DNA-ként a találmány szerinti expressziós kazetta DNA szekvenciájának legalább egy kópiáját tartalmazzák.

A találmány szerinti eljárással a növényeket rezisztenssé tehetjük olyan mikroorganizmusok által okozott betegségekkel szemben, mint a *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Aspergillus flavus* által okozott megbetegedések; a műveletet a következőképpen végezzük:

a) a kórokozóval szemben érzékeny növény regenerálható sejtjeit vagy szöveteit tenyésztjük,

b) a sejt- vagy szövettenyészet sejtjeibe olyan expressziós kazetta másolatot viszünk be, amelyik tartalmaz egy tachyplesin-t kódoló gént, amely működőképesen össze van

kapcsolva a növényi szabályozó szekvenciával, aminek eredményeként a sejtekben a tachyplestin expresszállódik, és

c) a sejt- vagy szövettenyészetből kinyerjük a kórokozóval szemben ellenálló növényt. Amikor megkapjuk a teljes növényt, a növényt ivarosan vagy klónozással szaporítjuk, így módon olyan növényeket hozva létre, amelyek sejtjei tartalmazzák az expressziós kazettát.

Másik lehetőségként a fenti rekombináns DNA módszerrel kapott transzformált növényt hagyományos növénytermelési módszerekkel keresztezéssel és viszontkeresztezéssel szaporítunk, így módon a tachyplestin-t expresszálló strukturális gént és az ehhez kapcsolódó szabályozó szekvenciát tovább adjuk. Ezt a következőképpen végezhetjük:

a) a kórokozóval szemben rezisztens növényt valamely más, a kórokozóval szemben érzékeny növényfajtaival ivarosan keresztezzük;

b) a keresztezésből származó szaporított anyagot elkülönítjük; és

c) a szaporítmányból a betegséggel szemben rezisztens növényeket szaporítunk. Az esetben, ha szükséges és kívánatos, a kórokozóval szemben érzékeny növény jellemzőit megőrizhetjük oly módon, hogy:

a) a betegséggel szemben rezisztens szaporított növényt visszakeresztezzük a betegséggel szemben érzékeny növényvel; és

b) a visszakeresztezett, és szaporításnak alávetett növények közül kiválasztjuk azokat, amelyek az antimikrobiális hatást (vagy egyéb jelző gént) expresszállják mindaddig, míg a

kórokozóra érzékeny növényfajta jellemzői kívánt százalékban a szaporított anyagban jelen vannak, a mikrobiális aktivitást biztosító génnel együtt.

A fentiekben alkalmazott "fajta" megjelölés egy botanikai osztályozást jelöl. Magában foglalja a fajt, féleséget, variációt, variánsokat, konzisztens nomenklatura alkalmazása nélkül.

A fenti módszerrel előállított növényi vektorokat beültethetjük az *Agrobacterium tumefaciens*-be is. Ezt azután felhasználhatjuk a vektornak a kórokozóra érzékeny növényi sejtekbe való átvitelére, különösen a kétszikű fajtákhoz tartozó növényeknél. Ily módon a találmány szerinti megoldással a növényi sejteket *Agrobacterium tumefaciens*-szel fertőzve a növényi sejtekbe átvihetjük az expressziós kazettát, különösen az *Agrobacterium tumefaciens*-re érzékeny kétszikű növényeknél ezzel a módszerrel az expressziós kazettát tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens*-szel fertőzött sejtekben az expressziós kazetta megjelenik.

Az alább következő példákkal szemléltetjük a találmány szerinti megoldást. Ezek a példák a korlátozás szándéka nélkül lettek összeállítva, egyéb, szakember számára ismert megoldás szerint is eljárhatunk a találmány szerinti eljárás megvalósításánál.

Ipari alkalmazhatóság

1. Példa

Ismert aminosav-szekvenciákból és szerkezetekből az irodalomban ismertetett módszer szerint tachyplesin-t

szintetizálunk [Fastmoc módszer, Fields C.G. és munkatársai, Peptide Res., 4. kötet, 95-101. oldal (1991)]. Minthogy a peptid és ennek szintézise ismert, egyik sem képezi önmagában a találmány tárgyát. A peptid szintézisének a karboxi-terminális arginin csoporton karboxilcsoport szerepel (és nem pedig amidált arginint használunk kiindulási anyagként, mint a fenti irodalmi helyen javasolják).

A tachyplesin-t 100 µg/ml koncentrációban alkalmazzuk, a koncentrációt az abszorpciós spektrum mérése alapján állapítjuk meg. A tachyplesin-t négy közönséges növényi patogénnel szemben alkalmazzuk nyers és oxidált formában. A gombaellenes hatás értékelését 0-4-ig terjedő skála segítségével végezzük. 0 érték jelentése, hogy inhibíció nem mutatkozik a vizes kontrollhoz viszonyítva; a 4 érték a teljes inhibíciót jelzi. Minden egyes kezelésnél két ismétlést végzünk. Az eredményeket az alábbiakban foglalhatjuk össze:

Gombaféleség	Készítmény	Jelzőszám
	formája	
Fusarium graminearum, 8 izolátum	nyers	4,0
	oxidált	4,0
Fusarium graminearum, 5 izolátum	nyers	4,0
	oxidált	4,0
Aspergillus flavus, 1 izolátum	nyers	3,5
	oxidált	3,5
Sclerotinia trifoliorum, 1 izolátum	nyers	4,0
	oxidált	4,0

2. Példa

A tachyplesin-t csökkenő koncentráció értékben alkalmazva vizsgáljuk a fenti négy mikroorganizmussal, valamint a *Fusarium moniliforme* és *Sclerotinia sclerotiorum*mal szembeni hatását; ily módon megállapítjuk a minimális inhibitor koncentráció értékét; ezt az értéket más antimikrobiális hatású vegyületnél kapott adatokkal hasonlítjuk össze. Az eredményeket a következő táblázatban tüntetjük fel:

μg/ml μmól Készítmény FGR005 FGR 008 FMO 001 AFL 001 SSC 002 SSC ascospores

formája								
100	44,4	nyers	4,0	4,0	4,0	3,5	4,0	4,0
		oxidált	4,0	4,0	4,0	3,75	4,0	4,0
50	22,2	nyers	4,0	4,0	4,0	3,25	4,0	4,0
		oxidált	4,0	4,0	4,0	3,75	4,0	4,0
25	11,1	nyers	4,0	4,0	3,75	1,5	4,0	4,0
		oxidált	4,0	4,0	4,0	2,75	4,0	4,0
12,5	5,6	nyers	3,0	3,75	1,25	1,0	4,0	4,0
		oxidált	3,5	4,0	2,5	1,5	4,0	4,0
6,25	2,8	nyers	1,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
		oxidált	2,25	2,0	1,0	1,0	0,0	0,0
3,13	1,4	nyers	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		oxidált	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0
1,56	0,7	nyers	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		oxidált	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

MIC összehasonlítás:

Fehérje	AFL 001	MIC μg/ml (μM)			FMO 001	SSC 002
tachyplestin	6,25 (2,8)	6,25 (2,8)	6,25 (2,8)	6,25 (2,8)	12,5 (5,6)	
defensin	11,7 (3)	2,6 (0,7)	11,7 (3)	12,5 (3,2)		
hordothionin	15 (3)	5 (1)	45 (9)	30 (6)		
CMIII	60 (15)	6,2 (1,6)	18,2 (4,6)	24 (6)		

3. Példa

Tachyplesin, defensin és hordothionin MIC értékét ($\mu\text{g/ml}$) állapítjuk meg FGR 008 és AFL 001-gyel szemben; a vizsgálatokat különböző pH-jú puffer-oldatban és ionerősségnél végezzük; különböző körülmények között megállapítjuk ezen anyagok növényi antimikrobiális hatását. 5,0 és 8,0 pH között nem mutatkozik különösen preferált érték; a defenzin és hordotionin MIC értéke *A. flavus*-szal szemben magasabb, és jelentősebb növekedést mutat (4-szer - 8-szor) amikor a nátrium-klorid koncentráció 0 és 100 mmól között van; ezzel szemben a tachyplesin-nek az *A. flavus*-szal szemben mutatott MIC értéke alacsony és csaknem konstans értéket mutat (20-nál kisebb $\mu\text{g/ml}$), miközben a nátrium-klorid koncentráció 0 és 125 mmól között van.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás tachyplesin-re érzékeny növényi patogén mikroorganizmusok elpusztítására és szaporodásuk inhibitalására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a patogén mikroorganizmus környezetébe antimikrobiális mennyiségű tachyplesin-t juttatunk.

2. Eljárás növényi patogén mikroorganizmusok, így *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum* elpusztítására és inhibitalására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy fenti patogén mikroorganizmusok környezetébe antimikrobiális mennyiségű tachyplesin-t juttatunk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a patogén mikroorganizmus környezetét az élő növény szövetei képezik.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás növényeknek patogén mikroorganizmusok, így *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum* és *Aspergillus flavus* elleni védelmére, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a növény genomjába tachyplesin-t kódoló szekvenciát illesztünk a transzkripciós iniciátor és promoter szekvenciát tekintve megfelelő leolvasási keretben, amely működése során a növényben a tachyplesin-t kódoló szekvencia expresszálását idézi elő, miáltal az általában patogénnel fertőzött növény szöveteiben antimikrobiális mennyiségű tachyplesin képződik.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a kezelést egyszikű növényeken, így búzán, rizsen vagy ciroknövényen végezzük.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a művelet végrehajtása során

- a) a kezelendő növény sejtjeit vagy szöveteit tenyésztjük,
- b) a sejt vagy szövettenyészet sejtjeibe legalább egy másolatot viszünk be egy olyan expressziós kazettáról, amely a tachyplesin-t kódoló szekvenciát tartalmazza, és
- c) a sejt vagy szövettenyészetből a tachyplesin-nel védett növényt regeneráljuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a műveletet egy olyan további lépéssel egészítjük ki, amelynek során az egész növényt klónozással vagy ivaros úton szaporítjuk oly módon, hogy a szaporított növények leszármazóinak sejtjeiben az expressziós kazetta által előállított szekvenciáról legalább egy másolat legyen jelen.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy az expressziós kazettát a növényi sejtekbe elektroporálással vissszük be.

9. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a növényi sejtekbe az expressziós kazettát mikrorészecskékkel végzett bombázással juttatjuk be.

10. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l - l e m e z v e, hogy a növényi sejtekbe az expressziós kazettát mikroinjekció segítségével juttatjuk be.

11. A 6. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l -

l e m e z v e, hogy *Agrobacterium tumefaciens*-szel szemben érzékeny növényeket teszünk e mikroorganizmussal szemben rezisztenssé oly módon, hogy a növényi sejtekben az expressziós kazettát oly módon juttatjuk be, hogy a sejteket olyan *Agrobacterium tumefaciens*-szel fertőzzük, amely előzőleg módosítva lett és tachyplezint expresszáló expressziós kazettát tartalmaz.

12. Eljárás növényi patogénekkal, így *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Aspergillus flavus* elleni rezisztencia kialakítására, e fertőzőkkel szemben érzékeny növényeknél, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy

a) a 8. igénypont szerinti eljárással a fertőzéssel szemben rezisztenssé tett ivarosos úton szaporodásra képes növényt elkülönítünk;

b) a fertőzéssel szemben rezisztens növényt a fertőzésre nézve érzékeny növényvel ivarosán keresztezünk;

c) a keresztezéssel kapott leszármazottakból szaporító anyagot különítünk el, és

d) a szaporítási anyagból a kórokozókkal szemben rezisztens növényeket tenyésztünk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás a kórokozókkal szembeni rezisztencia és antimikrobiális hatás létrehozására lényegében homozigóta növényeknél, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a műveletnél a következő további lépéseket végezzük el:

a) a kórokozóval szemben rezisztens szaporított anyagot

keresztjezzük lényegében egynemű, a kórokozóval szemben érzékeny növényekkel, és

b) a keresztezésből származó szaporított anyagnál elkülönítjük a betegséggel szemben rezisztens és antimikrobiális hatást mutató, de az érzékeny növények egyéb kívánatos tulajdonságait megtartó példányait mindaddig, amíg a kívánt százalékban tartalmazzák az érzékeny növények jellemzőit, és egyidejűleg a betegséggel szembeni rezisztenciát és antimikrobiális hatást.

14. Expressziós kazetta, amely lényegében csak tachyplestin-t kódoló DNA szekvenciát tartalmaz, és működőképes módon kapcsolódik a növény-szabályozó szekvenciákhoz, ami a növényi sejtekben a DNA klón expresszálasát idézi elő.

15. Expressziós kazetta, amely DNA szekvenciát tartalmaz, amely lényegében csak tachyplestin-t kódol, működőképesen kapcsolódik bakteriális expressziót szabályozó szekvenciákhoz, ami bakteriális sejtekben a DNA klón expresszálasát idézi elő.

16. Bakteriális sejtek, amelyek idegen plazmidként legalább egy kópiát tartalmaznak a 15. igénypont szerinti expressziós kazettából.

17. Transzformált növényi sejtek, amelyek idegen DNA-ként legalább egy kópiát tartalmaznak a 14. igénypont szerinti expressziós kazetta DNA szekvenciájáról.

18. A 17. igénypont szerinti transzformált sejtek, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy egyszikű növényfajták sejtjeiből állanak.

19. A 18. igénypont szerinti transzformált sejtek, a z -

z a l j e l l e m e z v e, hogy a sejtek kukorica, cirok, búza vagy rizs sejtekből állnak.

20. A 17. igénypont szerinti transzformált sejtek, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a sejtek kétszikű növényfajtákhoz tartoznak.

21. A 20. igénypont szerinti transzformált sejtek, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a sejtek szójabab, lucerna, dohánynövény, repce, napraforgó vagy paradicsom sejtekből állnak.

22. Kukorica sejt vagy szövettényészet, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a 19. igénypont szerinti sejteket tartalmazznak.

23. Transzformált kukorica növény, amelynek sejtjei idegen DNA-ként legalább egy másolatot tartalmazznak a 14. igénypont szerinti expressziós kazetta DNA szekvenciájáról.

24. Antimikrobiális készítmény növények kezelésére, a z - z a l j e l l e m e z v e, hogy a készítmény antimikrobiális mennyiségű tachyplesin-t tartalmaz nem fitotoxikus vivőanyag-gal elegyítve.

25. A 24. igénypont szerinti készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a készítmény az érzékeny növények szisztémikus kezelésére adaptált vivőanyagot tartalmaz.

A meghatalmazott: