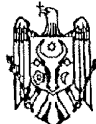




MD 2312 B2 2003.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) **2312** ⁽¹³⁾ **B2**
(51) **Int. Cl.⁷**: C 12 N 15/82, 15/60,
5/10;
A 01 H 5/00

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: 97-0144 (22) Data depozit: 1995.09.05 (31) Nr.: 08,303,266 (32) Data: 1994.09.08 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 1998.12.31, BOPI nr. 12/1998	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.11.30, BOPI nr. 11/2003 (85) 1997.04.08 (86) PCT/US95/11199 1995.09.05 (87) WO 96/07746 1996.03.14
(71) Solicitant: AMERICAN CYANAMID COMPANY, US (72) Inventatori: DIETRICH, Gabriele, NL; SMITH, Jane, US; PENG, Jianying, US (73) Titular: AMERICAN CYANAMID COMPANY, US (74) Reprezentant: BABAC Alexandr, MD	

(54) **Succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei
acetohidroxiacizilor; vector; procedeu de expresie a genei heteroloage;
construct de acid nucleic și metodă de selecție a materialului vegetal
transgenic**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la ingineria genetică, în
particular la o succesiune nucleotidă izolată a
promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor și
poate fi utilizată pentru selecția plantelor.

Succesiunea nucleotidă izolată a promotorului
genei sintazei acetohidroxiacizilor pentru expresia
genelor în plante este selectată din grupa suc-
cesiunilor SEQ ID nr. 1, SEQ ID nr. 2 sau SEQ ID
nr. 3. Se propune, de asemenea, un vector de
transformare a plantelor, care conține succesiunea

2
nucleotidă menționată, un procedeu de expresie de
un nivel înalt a genei heteroloage în plantă și în
diverse țesuturi ale acestei plante, un construct de
acid nucleic care conține succesiunea nucleotidă,
conjugată cu o genă heteroloagă, și o metodă de
selecție a materialului vegetal transgenic, rezistent
la erbicide.

Revendicări: 11
Figuri: 8

MD 2312 B2 2003.11.30

Descriere:

Invenția se referă la ingineria genetică, în particular la o succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor și poate fi utilizată pentru selecția plantelor.

Regnul vegetal este divizat în două filumuri, *Bryophyta* și *Tracheopyta*. Filumul *Tracheopyta* include peste 266000 de specii, grupate în 4 subfilumuri. Subfilumul *Pteropsida* include clasa *Angiospermae*.

Această clasă este divizată în două subclase, Dicotiledonate și Monocotiledonate. Sunt cunoscute aproximativ 50000 specii de monocotiledonate. Acestea includ crini, palmieri, orhidee, iriși, lălele, trestii și ierburi. Ierburile includ porumbul, grâul, orezul și toate celelalte cereale. Dar monocotiledonatele au fost extrem de dificil de manipulat prin inginerie genetică, astfel cele mai multe lucrări asupra plantelor au fost realizate la dicotiledonate.

Decotiledonatele cuprind aproximativ 20000 specii cunoscute. Piciorul-cocoșului, gura-leului, garoafa, magnolia, macul, varza, trandafirul, mazărea, poinsettia, bumbacul, cactusul, morcovul, coacăzul, menta, tomatele, floarea-soarelui, ulmul, stejarul și arțarul, reprezintă 19 din cele 250 familii de dicotiledonate.

Informația genetică din molecula de ADN servește, de obicei, ca matrice pentru sinteza unui număr mare de molecule ARN mai scurte, dintre care majoritatea servesc, în schimb, ca matrice pentru sinteza catenelor polipeptidice specifice. Succesiunile nucleotide specifice, numite promotori, sunt recunoscute de către moleculele ARN polimerază, care încep sinteza ARN. După ce transcrierea unei catene ARN funcționale este terminată, o a doua clasă de semnale conduce la terminarea sintezei ARN și la detașarea moleculelor ARN polimerază de matricea ADN respectiv.

În mod obișnuit, există un număr de promotori comuni, folosiți pentru a conduce expresia genei heteroloage în plante monocotiledonate.

Analiza expresiei tranzitorii ale unui construct [1], în care promotorul de la gena actină 1 de la orez (Act 1) a fuzionat la gena glucunidază bacteriană (GUS) în protoplaste de orez transformate, a dovedit că promotorul actină conduce niveluri ridicate ale expresiei genei. Această expresie a fost de circa 6 ori mai mare decât cea observată cu promotorul genei alcool dehidrogenază 1 de la porumb (Adh1) și este dependentă de prezența unui intron intact Act 15'.

De asemenea se relatează că s-au construit vectori optimizați pentru transformarea monocotiledonatelor folosind fie promotorul 35S de la Virusul Mozaicului Conopidei (CaMV), fie promotorul Act 1. Analiza expresiei tranzitorii s-a efectuat pe protoplaste transformate de orez și de porumb. Adăugarea la succesiunea promotorului a intronului Act 1 și a situsului de inițiere a translației GUS optimizat, a sporit semnificativ expresia genei. De asemenea s-a remarcat (rezultat nepublicat) că promotorul actină conduce expresia GUS în teste tranzitorii la protoplaste de grâu, ovăz, orz și sorg.

Studiul de hibridizare *in situ* a plantelor de orez transgenice, care conțin o fuziune pe gene Act I-GUS [2], a arătat că promotorul Act 1 reprezintă o expresie constitutivă în țesuturi atât vegetative, cât și reproductive.

Plante de orez transgenice s-au selectat pe bialofos [3], după transformare cu gena *bar* exprimată, fie sub controlul promotorului CaMV 35S, fie sub controlul promotorului Act 1 de orez.

Protoplaste de porumb transformate cu o genă de fuziune Ubi-1-CAT [4] au prezentat niveluri ale activității CAT de aproximativ 10 ori mai ridicate decât celulele de porumb transformate cu gena de fuziune CaMV-GUS în analize de expresie tranzitorie. Analiza Northern blot a nivelurilor transcriptului Ubi-1 și Ubi-2, care urmează după șocul termic al răsadurilor de porumb, a demonstrat că ambele gene sunt exprimate constitutiv la 25°C, dar sunt induse după șocul termic.

Plante de orez transgenice, transformate stabil, s-au obținut după transformarea mediată de electroporare a genei *bar* exprimată sub controlul promotorului Ubi-1 și selecția pe bialofos [5]. Acest rezultat demonstrează că promotorul Ubi-1 se poate folosi pentru a conduce niveluri suficient de ridicate ale expresiei genei în orez, pentru a permite selecția și regenerarea de plante de orez transgenice fertile.

S-a mai constatat, că plante de grâu, transformate stabil, se obțin după bombardarea calusurilor derivate de la embrioni imaturi cu ambele gene *bar* și GUS [6], fiecare fiind exprimată sub controlul promotorului Ubi-1 de la porumb, bombardare urmată de selecția pe bialofos. Acest rezultat demonstrează că promotorul Ubi-1 se poate folosi pentru a conduce niveluri suficient de ridicate ale expresiei genei în grâu, pentru a permite selecția și regenerarea de plante transgenice fertile.

Plante de orz fertile, transformate stabil, s-au obținut după bombardarea cu microproiectile ale țesuturilor embrionare de orz cu ambele gene *bar* și GUS, fiecare fiind exprimată sub controlul promotorului Ubi-1, urmată de selecția pe bialofos [7]. Acest rezultat demonstrează că promotorul Ubi-1 se poate folosi pentru a conduce niveluri suficient de ridicate ale expresiei genei în orz, pentru a permite selecția și regenerarea de plante transgenice fertile. Un experiment care implică bombardarea unui număr mic de plante fie cu Ubi-*bar*, fie cu CaMV-*bar* nu a arătat nici o diferență semnificativă în numărul de transformanți obținuți.

Pentru a obține plante de orez transgenice s-a introdus o fuziune *Adhl* a promotorului GUS de porumb în protoplaste de orez [8]. S-a examinat activitatea GUS în plante transgenice pentru determinarea tabloului expresiei GUS. Promotorul *Adhl* de porumb s-a dovedit a promova expresia constitutiv în toate părțile examinate ale plantelor. Așa cum s-a demonstrat anterior pentru expresia *Adhl* în porumb, expresia GUS condusă *Adhl* s-a indus în rădăcini în condiții anaerobe.

S-a mai relatat că promotorul *Adhl* de porumb s-a modificat prin adăugarea copiilor multiple ale elementului genei *Adhl* de porumb, care este responsabil în condiții anaerobe, și a elementelor *ocs* de la gena *octopin* sintază a *Agrobacterium tumefaciens* (pEmu) [9]. În analizele de expresie tranzitorie a protoplastelor de la diferite specii de monocotiledonate, transformate cu pEmu-GUS, cel mai bun construct a dat niveluri ale expresiei de 10...50 ori mai ridicate, decât promotorul CaMV 35S la grau, porumb, orez, grâu furajer și *Lolium multiflorum*.

Se menționează că transformanți stabili se obțin după transformarea calusului embriogenic al trestiei de zahăr cu gena *neomycin fosfotransferazei* sub controlul promotorului *Emu* [10].

Intr-un alt studiu, promotorul *Emu* s-a folosit pentru a conduce expresia a 4 gene marker selectabil diferite [1] (neomicin fosfotransferază, hidromicin fosfotransferază, fofinotricin N-acetiltransferază și o aceto-lactat sintază mutantă, care conferă rezistență la erbicide), care s-au transformat atât în grâu, cât și în orez. S-au obținut calusuri de grâu și plante de orez transformate, selectarea transformanților demonstrând că promotorul poate fi folosit pentru a conduce expresia genelor marker selectabil pentru a obține cereale transformate.

Recent a fost publicată o revistă a elementelor promotor folosite pentru controlul expresiei genei străine în cereale transgenice și este încorporată aici ca referință [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

În mod curent se folosește un număr de promotori pentru transformarea plantelor dicotiledonate. Acești promotori provin din surse diferite. Un grup de promotori folosiți în mod obișnuit s-au izolat de la *Agrobacterium tumefaciens*, unde ei funcționează pentru a conduce expresia genelor opin-sintază purtate pe segmentul T-ADN, care este integrat în genomul plantei în timpul infecției. Acești promotori includ promotorul octopin sintazei (*ocs*), promotorul manopin sintazei (*mas*) și promotorul neopalin sintazei (*nos*). Ei sunt activi într-o largă varietate de țesuturi de plante.

De asemenea câțiva promotori virali sunt folosiți pentru a conduce expresia genei heteroloage dicotiledonate. Promotorul 35S CaMV este unul dintre promotorii cei mai frecvent utilizați și pentru transformarea dicotiledonatelor, deoarece el conferă niveluri ridicate ale expresiei genei în aproape toate țesuturile. De asemenea sunt folosite modificările acestui promotor, care includ o configurație cu tandem de doi promotori 35S și promotorul *mas*-35S, care constă din promotorul manopin sintază în tandem cu promotorul 35S. Ambii promotori conduc niveluri ale expresiei genei chiar mai ridicate, decât o copie unică a promotorului 35S. Alți promotori virali care s-au folosit includ promotorul CaMV 19S și promotorul 34S de la virusul mozaicului unișorului.

Studiile expresiei AHAS (acetohidroxiacid sintazei) la un număr de plante arată că AHAS se exprimă în toate țesuturile plantei. Analize enzimactice, realizate pe diverse țesuturi de fasole lima, au demonstrat că activitatea AHAS a fost prezentă în toate țesuturile testate, inclusiv frunze, tulpini, rădăcini, flori, păstăi și meristeme [29]. Activitatea AHAS s-a dovedit a fi cât se poate de constantă în tulpini, dar a scăzut în frunze, rădăcini și meristeme, o dată cu înaintarea în vârstă.

S-a remarcat că tutunul conține două gene care codifică acetohidroxiacid sintaza, *SurA* și *SurB* [30]. Ambele gene par a fi exprimate în toate tipurile de țesut cu o variație de circa 4 ori în nivelul expresiei între diferite țesuturi. Organele care se dezvoltă par a avea cele mai ridicate niveluri ale expresiei. Studiile de hibridizare *in situ* au demonstrat că nivelurile cele mai ridicate ale expresiei au fost observate constant în celulele active metabolic sau care se divid rapid. *SurB* s-a exprimat la niveluri mai ridicate, decât *SurA*, în toate țesuturile examinate.

Speciile de *Brassica* conțin familii multigenice, care de asemenea codifică acetohidroxiacid sintaza [31]. Patru din cele cinci gene AHAS s-au identificat în *Brassica napus*. Analize cu protecția ARNazei, folosind sonde specifice de genă, s-au realizat pentru determinarea imaginilor expresiei diferiților membri ai familiei genei în diverse specii *Brassica*. Două dintre aceste gene, AHAS1 și AHAS3, s-au dovedit a fi exprimate constitutiv în toate țesuturile examinate. Transcripte AHAS2 s-au detectat numai în organele reproductive și în țesuturile extraembrionare ale semințelor. Nu s-au detectat transcripte codificate prin cea de-a patra genă AHAS4 și, deci, se crede că aceasta reprezintă o pseudogenă.

Compararea activității AHAS în frunze de porumb tinere și celule BMS crescute în cultură în suspensie relevă că activitatea celulelor BMS *per gram* de greutate proaspătă a fost de aproximativ 5,8 ori mai indicată, decât în probele de frunză [32]. Deoarece celulele BMS sunt în diviziune activă, acest rezultat este consecvent cu rezultatele studiilor anterioare cu tutun și fasole lima, care au demonstrat că țesuturile mai tinere care se divid activ au mai multă activitate AHAS decât țesuturile mai bătrâne.

Este cunoscut un construct de acid nucleic, cea mai apropiată soluție de esența prezentei invenției, care codifică enzimele funcționale AHAS la monocotiledonate, care nu posedă sensibilitate la erbicidele

imidazolinonă [33]. Succesiunile în acest caz includ mutația în codonul ce codifică serina aminoacidă în poziția 621 în succesiunea AHAS de la cereale (porumb).

Mai este cunoscută o metodă de identificare a expresiei genice într-o plantă [34]. Dar, deoarece monocotiledonatele includ majoritatea cerealelor și plantelor alimentare cultivate, geneticienii din domeniul plantelor sunt interesați să poată produce monocotiledonate transgenice. Oamenii de știință explorează căile de a utiliza modificarea genetică pentru a le conferi plantelor caracteristicile dorite. Tehnicile de inginerie genetică, folosite pentru îmbunătățirea caracteristicilor, cum ar fi gustul, textura, mărimea, rezistența la dăunători și rezistența la erbicide, culoarea, aciditatea sau dulceața plantelor de cultură, sunt explorate acum cu o strategie mult mai rapidă, decât metodele tradiționale de selecție încrucișată.

Așadar, problema pe care o rezolvă prezenta invenție este extinderea modalităților de influență asupra plantelor alimentare pentru a le îmbunătăți caracteristicile, cum ar fi rezistența la erbicide.

Invenția solicitată propune o succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor (AHAS) pentru expresia genelor în plante, selectată din grupa succesiunilor SEQ 1D nr. 1, SEQ 1D nr. 2 sau SEQ 1D nr. 3. Planta în acest caz fiind monocotiledonată și reprezintă porumb.

Se mai propune un vector de transformare a plantelor, conținând succesiunea nucleotidă menționată.

Se propune de asemenea un procedeu de expresie de un nivel înalt a genei heteroloage în plantă și în diverse țesuturi ale acestei plante, incluzând transformarea plantei menționate cu vectorul ce conține succesiunea nucleotidă și expresia ulterioară a genei heteroloage în planta menționată sub controlul succesiunii nucleotide menționate.

Se mai propune un construct de acid nucleic, conținând succesiunea nucleotidă, conjugat cu gena heteroloagă. Gena heteroloagă este o genă mutantă, capabilă să confere materialului transgenic selectat rezistență la erbicide, fiind gena sintazei acetohidroxiacizilor (AHAS).

În prezenta invenție se mai propune o metodă de selecție a materialului vegetal transgenic, rezistent la erbicide, care constă în:

- a) transformarea recombinată a materialului vegetal prin inserția constructului de acid nucleic, ce conține succesiunea nucleotidă a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor (AHAS), conform revendicării 1, conjugat cu gena mutantă, capabilă să confere rezistență la erbicide;
- b) plasarea materialului vegetal transformat pe un mediu nutritiv, ce conține un compus erbicid;
- c) identificarea materialului vegetal, capabil să crească în prezența compusului menționat.

Gena mutantă reprezintă gena sintazei acetohidroxiacizilor (AHAS), iar compusul se referă la imidazolinone.

Avantajele acestei invenții constau în aceea că promotorii AHAS sunt puternic activi în numeroase țesuturi ale diferitelor plante și pot fi folosiți și pentru a exprima gene noi într-o diversitate de plante. Genele noi includ, dar nu se limitează la gene pentru rezistență la erbicide, detoxicare și rezistență față de patogeni de plantă.

Promotorii, conform invenției, se pot utiliza pentru expresia genei heteroloage la monocotiledonate, incluzând, lista nefiind exhaustivă, porumb, orez, ovăz, orz, sorg și mei.

Promotorii revendicați conduc la fel expresia la dicotiledonate, deși expresia promotorilor monocotiledonați la dicotiledonate este de așteptat să fie la niveluri mai reduse, decât la monocotiledonate.

S-au utilizat promotorii AHAS de la porumb pentru a exprima la niveluri ridicate gene introduse în diverse țesuturi de plante. Promotori de la genele *als1* și *als2* de la porumb s-au clonat și secvențiat (fig. 1, 2, 3) și apoi, regiunile promotor de la aceste gene au fost introduse într-un plasmid 5' la gena raportor beta-glucuronidază (GUS). Ambele fragmente promotor sunt de la linia de porumb XI12. Fragmentul promotor *als1* este de aproximativ 1400 baze perechi (bp) lungime, în timp ce fragmentul promotor *als2* conține 819 baze perechi. Pentru a determina activitatea promotorilor AHAS plasmidele himerice s-au transferat apoi în protoplaste de porumb Black Mexican Sweet și protoplaste de orez pentru analiza nivelurilor expresiei tranzitorii. Pentru comparație, protoplastele sunt transformate de asemenea cu un plasmid cu promotorul CaMV 35S, care conduce gena raportor GUS. Expresia plasmidelor himerice în celulele porumbului se determină prin analizarea activității enzimei GUS. Activitatea promotorului *als2* de porumb a fost egală cu sau mai indicată decât activitatea promotorului CaMV 35S în ambele tipuri de celulă (fig. 4). Fig. 5 prezintă rezultatele analizelor beta-glucuronidază, realizate pe linii de celule de porumb EMS, transformate stabil fie cu pCD221B (*als2*-GUS-*ocs-terminator plasmid*), fie cu pAC400 (CaMV 35S-GUS-*ocs terminator plasmid*). Analiza distribuției mRNA AHAS prin hidridizarea *in situ* a sondelor ARN radiomarcate la țesuturi de plantă arată că promotorii AHAS de porumb sunt activi în majoritatea părților plantei (fig. 6, 7, 8).

Activitatea promotorului AHAS se analizează în plante *Arabidopsis* care sunt transformate stabil, folosind *Agrobacterium tumefaciens*. Regiunea promotoare din amonte a genei AHAS *Arabidopsis* este fuzionată la gena raportor GUS, inserată în vectorul binar pBIN19 și folosită pentru a transforma

Arabidopsis. Analiza plantelor transformate prezintă expresia GUS (indicatoare a activității promotorului) în majoritatea părților plantei.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-8, care reprezintă:

- fig. 1, succesiunea *als1* a promotorului AHAS de la porumb XA17;
- 5 - fig. 2, succesiunea *als2* a promotorului AHAS de la porumb XA17;
- fig. 3, succesiunea *als2* a promotorului AHAS de la Porumb XI12;
- fig. 4, un grafic cu bare care prezintă activitatea beta-glucuronidază de la analizele tranzitorii ale protoplastelor de celule de porumb Black Mexican Sweet sau suspensie de celule de orez după transformare cu pCD221E (ALS2-promotor-GUS-ocs terminator plasmid) sau pAC400 (CaMV 35S-GUS-ocs terminator plasmid). Activitatea GUS se calculează ca pmol/min./mg.proteină. Rezultatele sunt de la trei experimente independente;
- fig. 5, un grafic cu bare care reprezintă activitatea beta-glucuronidază în linii celulare Black Mexican Sweet transformate stabil după transformare fie cu pCD221B (*als2*-promotor-GUS-ocs terminator plasmid), fie cu pAC400 (CaMV 35S-GUS-ocs terminator plasmid). CK desemnează țesutul de control netransformat. Activitatea GUS se calculează ca pmol/min./mg.proteină;
- 15 - fig. 6, studii de hidridizare *in situ* a verticilului de frunze de la lăstari de porumb de 2 săptămâni, folosind sonde ARN radiomarcate. S-a preparat o secțiune de țesut și s-a hidridizat la sonde ARN care codifică fie banda sens AHAS (AHAS -), fie banda antisens AHAS (AHAS +). Pentru comparație s-au folosit sondele SSU (subunitate mică RUBISCO) banda sens (SSU-) sau banda antisens (SSU+). În fiecare caz se poate întâmpla ca numai antisens (+) să hibridizeze la mARN prezent în țesut, a) SSU+ sondă; b) SSU- sondă; c) AHAS+ sondă; d) AHAS- sondă;
- fig. 7, studii de hibridizare *in situ* a bobului de porumb la 12 zile după polenizare, preparat tot așa cum s-a descris pentru fig. 6: a) embrion și suspensor, AHAS+ sondă; b) embrion și suspensor, AHAS- sondă; c) pericarp, aleuronă și endosperm AHAS+ sondă;
- 25 - fig. 8, studii de hidridizare *in situ* a meristemului apical al plantei tinere de porumb, preparat tot așa cum s-a descris pentru fig. 6: a) și b) AHAS+ sondă; c) și d) AHAS- sondă.

Exemplu de realizare a invenției

Genele *als1* și *als2* de la porumb sunt donat și secvențiate și regiunile promotor de la aceste gene sunt introduse apoi într-un plasmid 5 la gena raportor GUS. Pentru realizarea invenției, o genă raportor este definită ca o succesiune nucleotidică, care este fuzionată în avalul promotorului de interes, astfel încât transcriptele care inițiază la promotor acționează prin gene raportor. Genele raportor codifică unele activități enzimatică care se pot măsura cu ușurință: de exemplu, în prezenta invenției expresia plasmidelor himerice în celule de porumb se determină prin analizarea activității enzimei beta-glucuronidază (GUS).

Se va aprecia că promotorul genei *als2* de la porumb se poate folosi pentru a conduce expresia genei în alte specii de monocotiledonate. De exemplu, promotorul Act 1 de orez conduce expresia genei în protoplaste de porumb, promotorul Emu de porumb s-a folosit pentru a selecta grâu, orz și orez transgenic și promotorul dicotiledonat AHAS *Arabidopsis* s-a folosit pentru a conduce expresia genei AHAS în tutun transgenic și cartof transgenic. Promotorul genei *als2* de la porumb dă cele mai bune rezultate la porumb, dar conduce, de asemenea, expresia genei la alt monocotiledonat. Pe baza studiilor efectuate asupra porumbului și asupra altor specii, acest promotor va conduce expresia constitutivă a unei gene într-o plantă. Nivelurile cele mai ridicate ale expresiei se observă fie în țesut activ aflat în diviziune, fie în țesut activ metabolic.

Pentru transformarea plantelor monocotiledonate de cultură sunt bine cunoscute diferite tehnici care includ, dar nu se limitează la aceasta, bombardament cu microproiectile, transformarea mediată PEG, electroporarea și fibrele siliconice. Toate aceste tehnici implică utilizarea vectorilor ADN pentru eliberarea succesiunilor nucleotidice de transformare. Vectorii adecvați pentru folosire în prezenta invenție includ, dar nu se limitează la aceasta, vectori care conțin gene marker folosite pentru selecția materialului transgenic, care includ gene ce conferă rezistență la hidromicină, canamicină, bialofos și imidazolină și erbicide sulfoniluree.

50 Eficiența promotorilor *als1* și *als2* este cercetată prin măsurarea activității GUS în protoplastele de porumb sau orez, sau în liniile celulare de porumb care conțin construite în care aceste secvențe promotor sunt fuzionate cu gena GUS. Prepararea vectorilor și protocolul de transformare sunt descrise mai jos.

Construite care conțin genele himerice CaMV35S-GUS, *als1*-GUS și *als2*-GUS

Plasmida pAC400 este o plasmidă bazată pe pUC19, care conține o fuziune a fragmentului EcoRI-XbaI 418 pb al promotorului CaMV 35S clonat în amonte de un fragment XbaI-PstI de 1,7 kilobaze (kb), care conține gena GUS și un fragment PstI-BamHI de 700 bp, care conține terminatorul octopin sintază. Genele *als1* și *als2* sunt obținute prin screening-ul unei bănci genomice preparate de la linia de porumb XI12. Un fragment EcoRI-NcoI care conține 1,4 kb ale secvenței în amonte de codonul de inițiere ATG al genei *als1*, este subclonat în pAC400 în locul promotorului CamV 35S pentru a crea pCD223B. Un fragment PstI-NcoI de 819 bp în amonte de ATG-ul lui *als2* s-a subclonat în fața aceleiași fuziuni, GUS-terminator ocs, în pBluescript® KS-(Stratagene), pentru a crea pCD221B.

Transformarea și analiza protoplastelor de orez și porumb

S-au izolat protoplaste de la orez (Nortai) sau suspensie de celule de porumb (Black Mexican Sweet, BMS) și s-au transformat cu pAc221B sau pAC400, conform protocoalelor de transformare mediate PEG ale L. A. Lyznik et. al. (1989, Stable transformation of maize protoplasts with *gus A* and *neo* genes. Plant Mol Biol. 13: 151-161) și J.Y. Peng et. al. (1990, Co-transformation of indica rice protoplasts with *gus A* and *neo* genes. Plant Cell Rept. 9: 168-172).

Pentru analizele tranzitorii, protoplastele de orez transformate sunt etalate pe filtre Millipore, plasate pe suprafața mediului, care conține celule de nutriție și protoplaste BMS transformate, sunt cultivate în 3 ml de mediu lichid. La două zile după transformare, culturile de protoplaste sunt colectate și extrase cu tampon de extracție GUS. Activitatea GUS se măsoară fluorimetric, conform protocolului R.A. Jefferson [1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system Plant. Mol. Biol. 5: 387-405].

Pentru recuperarea transformanților din cultură de porumb BMS, protoplastele sunt co-transformate cu pFF19K (care conține gena marker defectabilă, care codifică neomicin fosfotransferaza) și pCD211B sau PAC400. După transformare, protoplastele sunt cultivate pe filtre Millipore plasate pe suprafața mediului care conține celule de nutriție. O săptămână mai târziu, culturile de protoplaste sunt transferate în mediu care conține celule de nutriție și 100 mg/l canamicină. Culturile de protoplaste sunt transferate în mediu MS proaspăt cu 100 mg/l canamicină până când devin vizibile calusuri rezistente. Se strâng calusuri individuale rezistente la canamicină și se cresc timp de 2 până la mai mult de 3 săptămâni, în prezența canamicinei. Calusul rezistent la canamicină se colorează cu X-Gluc sau se analizează cu MUG, conform protocolului R.A. Jefferson (1987) pentru a căuta calusuri pozitive GUS. Calusul identificat ca exprimând GUS se fărâmițează în tampon de extracție și se analizează; activitatea GUS se măsoară fluorimetric.

Datele de la aceste experimente sunt prezentate în fig. 4 și 5.

O genă AHAS mutantă de porumb, care conferă rezistență la erbicide (imidazolinonă) și este condusă prin promotorul *als2* de porumb, se folosește ca un marker selectabil pentru a obține un calus transgenic după transformarea atât a celulelor BMS A188x873, cât și a celulelor de orez. Acest rezultat argumentează ideea că promotorul *als2* conduce niveluri de expresie suficient de ridicate pentru a conduce expresia genei marker.

Hibridizare in situ.

Sunt preparate plăci, în principiu, după J.A. Langdale et.al. (1988, Cellular pattern of photosynthetic gene expression in developing maize leaves. Gene Dev. 2: 106-115). Țesutul este fixat în 4% formaldehidă, deshidratat în etanol, clarificat cu xilen și îmbibat în parafină. Țesutul este secționat în secțiuni de 8...10 μm și plasat pe plăci acoperite cu poli-L-lizina. Parafina se îndepărtează cu xilenă și țesutul se rehidratează prin spălare cu etanol și clătire cu apă. Sondele ARN se prepară din ambele benzi (+ și -) ale unui fragment de 172 nucleotide (nt) din regiunea de codificare *als2* și un fragment de 392 nt din regiunea de codificare SSU folosind kit-ul Ambion Maxiscript®. Plăcile sunt hibridizate conform protocolului Meyerowitz et. al. (1988. In situ hybridization to RNA in plant tissue. PlantMol.Biol. Rept. 5: 242-250) la 50°C peste noapte într-o diluție 1:4 de SPB [100 μm de 10x săruri (NaCl 3M, Tris 10 mM pH 6,8; DTA 50 mM); 400 μl formamidă; 200 μl sulfat de dextran 50%; 40 μl tARN 10 mg/ml; 10 μl 1 MDTT; 50 μl poliA/poliadenilat/10 mg/ml] cu sondă denaturată în formaldehidă 50% și 10 mM DTT la 80°C timp de 30 s. Plăcile sunt spălate 2x15 min în tampon de spălare (1 x săruri, formamidă 50%, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM și DTT 10 mM) la 50°C, tratate cu ARNaza A (20 g/ml în NTE) timp de 30 min la 37°C, spălate 5x în tampon NTE la 37°C timp de 1 h, spălate 2 x 30 min în tampon de spălare la 50°C, deshidratate în etanol și uscate la aer. Plăcile sunt autoradiografiate prin scufundare într-o emulsie preîncălzită la 37°C într-o cameră întunecoasă, uscate 30 min...1 h și depozitate la întuneric la 4°C până la dezvoltare. Plăcile sunt dezvoltate timp de 2 min, clătite cu apă, fixate pentru cel puțin 5 min și clătite din nou cu apă. Țesutul se colorează cu Alcian Blue și se decolorează în etanol și xilenă. După montare cu Permount, țesutul se observă la microscop în câmp întunecat.

Datele de la experimentele de hibridizare *in situ* din fig. 6 și 8 arată că gena este de asemenea exprimată de embrionul de porumb.

Este posibil să se evalueze expresia promotorului AHAS prin:

1. Construcția unei gene de fuziune *als2*-GUS și determinarea imaginii activității GUS în plante transgenice de porumb sau orez. Studiile anterioare folosind un promotor de porumb au demonstrat fezabilitatea evaluării expresiei promotorului porumbului în orez (Junko Kyojuka et. al., 1991). După selecția plantelor transgenice, analizele histochimice sunt realizate pe țesuturi de plantă la diverse stadii de dezvoltare pentru a determina ambele specificități de tip tisular și de tip celular. Această tehnică este folosită în mod obișnuit pentru a evalua activitatea promotorului atât în monocotiledonate, cât și dicotiledonate.

2. Analizele expresiei tranzitorii sunt realizate pe protoplaste preparate de la diferite specii de plante după transformarea constructelor *als2*-GUS. Această abordare este folosită pentru evaluarea capacității diferiților promotori de a funcționa în specii heteroloage.

MD 2312 B2 2003.11.30

8

Protoplastele sunt transformate și cu constructul de interes și incubate pentru a permite genei introduse să fie exprimate și proteinei să se acumuleze. După incubare, celulele sunt cercetate pentru prezența proteinei codificate de către transgenă pentru a determina eficiența promotorului care conduce expresia transgenei.

5 LISTA DE SECVENȚE

(1) INFORMAȚII GENERALE:

- (i) SOLICITANT: Dietrich Gabriele
- (ii) TITLUL INVENȚIEI: CONSTRUCT DE ACID NUCLEIC ȘI METODĂ PENTRU IDENTIFICAREA EXPRESIEI UNEI GENE HETEROLOAGE INTR-0 PLANTĂ
- 10 (iii) NUMĂR DE SECVENȚE: 3
- (iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:
 - (A) ADRESANT: American Cyanamid Company.
 - (B) STRAD : One Cyanamid Plaza
 - (C) ORA : Wayne
 - 15 D) STAT: New Jersey (E) ARA: Statele Unite (F) COD: 07470-8426
- (v) FORMA LIZIBILĂ DE CĂTRE COMPUTER:
 - (A) TIPUL MEDIULUL: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: PC compatibil IBM
 - (C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS
 - 20 (D) SOFTWARE: patentin Release#1.0. Versiune #1.25

(vi) DATE CURENTE ALE CERERII:

- (A) NUMĂRUL CERERII: US
- (B) DATA DEPUNERII:
- (C) CLASIFICARE:
- 25 (viii) INFORMAȚIE ÎMPUTERNICIT/MANDATAR:
 - (A) NUME: Hanrington, James J.
 - (B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: P38.711
 - (C) REFERINȚĂ /NUMĂR DOSAR: 32.348
- (ix) INFORMAȚIE PENTRU TELECOMUNICARE:
 - 30 (A) TELEFON: 201-831-3246
 - (B) TELEFAX: 201-831-3305

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV ID NR: 1

- (i) CARACTERISTICI SECVENȚĂ :
 - 35 (A) LUNGIME: 413 BAZE PERECHI
 - (B) TIP: ACID NUCLEIC
 - (C) CATENARITATE: simplă
 - (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIP DE MOLECULĂ : ADN (GENOMIC)
- (iii) IPOTETIC: NU
- 40 (iv) ANTI-SENS

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV ID NR:1:

TCTAGAGAAA CTAAACTACT AATAAAAAATT ATTTTATAGCA TATTTTAGTA CTGTNGTTTA
60
TATTTNNAAG TGATAAAGTT TAACTAAAAG TGCACCGCTA AACCACCGTA AATCCAAAGA
120
GACCGTAAAT CTCTCCAGC CACTCTGTGC TGTACCAACG TGCTGTGAA ACGCTCACGT
180
ACCTTTGTGT ATTATGTACG GATTCGGGCA ACGGACATTT CGACGTCGGT TTGCCAGTCC
240
NATTTCCATC TGAACCACAC ATCTCTGAAC AAAAGTAGGG GAGGCGCCCGCTAGCCCCC
300
TTTCCACAA TCCCACTCCG TGCCAGGTGC CACCTCCCC AAGCCCTCGC GCCGCTCCGA
360
55 GAGAGCCGCC CGCAACCATG GCCACCGCCG CCACCGCGGC CGCCGCGCTC ACC
413

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV ID NR: 2

(i) CARACTERISTICI SECVENȚĂ :

MD 2312 B2 2003.11.30

9

- (A) LUNGIME: 509 BAZE PERECHI
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) ÎMPLETIRE: simplă
- (D) TOPOLOGIE: lineară

- 5 (ii) TIP DE MOLECULĂ :ADN(GENOMIC)
(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV ID NR:2

CCGGATTTC CTGTTGCGGA TTGCGGGTGG CAGCCTGGCA GGTGGGTGCG
ACCCCGTTTG
10 60
GATTCCCTTG TCTGGGCCCC TTGTGTCAGT ACCGTCTGTA CTCCGATGAC ATGCACCGTC
120
GTCCACAGTC AAGTCCAAAA TCTCCCCTCT TTTTTTTAAC GGAACAGTTC AAACCTCCT
TGACGCSCGC TGTCGTGTAC CAGCACTCGG TGGACACCAC GTTTGTAATC CAGGCCGACA
15 240
CGTCGGTCCC ACGTCGACAG GCCCCACCGT CCGGTCTGTC GCGTGTACGT
ATTCGGGCGA
300
CGGACGTGTC GTCGTCGTCT TGCGAGTCCC ATTCCCATCA CCATCTGAGC CACACATCCT
20 360
CTGAAGAAA GCAGGGAGGC CTCCACGCAC ATCCCCCTTT ATCCACTCCG GTCCGTGGCA
420
CCCACCCAA ACCCTCGCGC CGCCTCCGAG ACAGCCGCCG CAACCATGGC CACCGCCGCC
480
25 GCCGCGTCTA CCGCGCTCAC TGGCGCCAC
509

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECV 10 NR: 3

- 30 (i) CARACTERISTICI SECVENȚĂ :
(A) LUNGIME:829 BAZE PERECHI
(B) TIP: acid nucleic
(C) ÎMPLETIRE:simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIP DE MOLECULĂ : ADN(GENOMIC)
35 (xi) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECV ID NR:3

CTGCAGGTCA ACGGATCACC TATCAACATC CCAGCTAAAA ACAGTAAAA
GGGGGAAAAC
60
40 GTGGGTGAGT TGAGTCTGTC TTGTGGA AAA AACGTTTTAG TTTCTCCTGG AATTAACAAT
120
AAAAACAGTT GAACAAGATT GACTGTTTCCT CCGGGAGGGT TTGGAACATC GTTACAGATG
180
TGAGCGAAAG GTGAGGAAAC AGAGCGGAGG GCTTGAGGT GACCTCGGTA GTCAGACGCC
45 240
GGAGTTGAGC TTGATGACGA CACCGTACTG GCGTACCAGG CCTAGTAGTG AACACCGGGC
300
CTGAAGCTGT CGCCGCCGCT GCTCATCTTG TNGGCTGTGC NCGGTGTCCC TGTTCGGAT
360
50 TGCGGGTGGC AGCCTGGCAG GTGGGTGCGA CCCGTTTGGA CTCCCTGATC TGGGCCCTTT
420
GTCTCAGTAC CGTCTGTACT CCGATGACAT GCACANCGTC GTCCACAGTC AAGTCCACAA
480
55 TCTAAATCT TTTTAAACG GAATAGTTNC AAAATCTCCTTGACGCACGC TATCGTGTAC
540
CAGCGCTCAC TGGACACCAC GTTTGTAATC CACGCCGACA CGTCGNTCCC ACGTCGACAG
600
GCCCCACCGT CCGGTCTGTA GCGTGTACGT ATTCGGGCAA CGGACGTGTC GTCGTCGTCT

MD 2312 B2 2003.11.30

10

660
TGCNMNNGTC CCANNNCCCA TCACCATCTG AGCCATCACA TCTCATGCGT GAANAAAAGC
720
AGGGAAGGCC TCTACGCACA TCCCCCTTTC TNNCTNNNNT CCGTGTCCGT GGACCCAGG
5 780
GGAAACCCTC GCGCCGCCCTC CGAGACAGCC GCCGCAACCA TGGCCACCG
820

10 (57) Revendicări:

1. Succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor pentru expresia genelor în plante, selectată din grupa succesiunilor SEQ ID nr. 1, SEQ ID nr. 2 sau SEQ ID nr. 3.
2. Succesiune nucleotidă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** planta este monocotiledonată.
- 15 3. Succesiune nucleotidă conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** planta reprezintă porumb.
4. Vector de transformare a plantelor, conținând succesiunea nucleotidă conform revendicării 1.
5. Procedeu de expresie de un nivel înalt a genei heteroloage în plantă și în diverse țesuturi ale acestei plante, incluzând transformarea plantei menționate cu vectorul ce conține succesiunea nucleotidă conform revendicării 1 și expresia ulterioară a genei heteroloage în planta menționată sub controlul succesiunii nucleotide menționate.
- 20 6. Construct de acid nucleic, conținând succesiunea nucleotidă conform revendicării 1, conjugată cu gena heteroloagă.
7. Construct de acid nucleic conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că** gena heteroloagă este o genă mutantă, capabilă să confere materialului transgenic selectat rezistență la erbicide.
- 25 8. Construct de acid nucleic conform revendicării 6, **caracterizat prin aceea că** gena heteroloagă este gena sintazei acetohidroxiacizilor.
9. Metodă de selecție a materialului vegetal transgenic, rezistent la erbicide, care constă în:
 - a) transformarea recombinată a materialului vegetal prin inserția constructului de acid nucleic, ce conține succesiunea nucleotidă a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor, conform revendicării 1,
 - 30 conjugată cu gena mutantă, capabilă să confere rezistență la erbicide;
 - b) plasarea materialului vegetal transformat pe un mediu nutritiv, ce conține un compus erbicid;
 - c) identificarea materialului vegetal, capabil să crească în prezența compusului menționat.
10. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** gena mutantă reprezintă gena sintazei acetohidroxiacizilor.
- 35 11. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** compusul erbicid se referă la imidazolinone.

40

(56) Referințe bibliografice:

1. David McElroy et al., (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. Mol. Gen. Genet. 231: 150-160.
2. Wanggen Zhang et al., (1991) Analysis of the Act1 5' region activity in transgenic rice plants. The plant Cell 3: 1155-1165.
3. Jun Cao et al., (1992) Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following micro-projectile-mediated transformation of suspension culture cells. Plant Cell Reports 11: 586-591.
4. Alan H. Christensen et al., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology 18: 675-689.
5. Seiichi Toki et al., (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. Plant Physiol. 100: 1503-1507.
6. J. Troy et al., (1993) Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (Triticum aestivum). Plant Physiol. 102: 1077-1084.
7. Yuechun Wan and Peggy G. Lemaux, (1994) Generation of a large number of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 104: 37-48.
8. Junko Kyoizuka et al., (1991) Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize Adh1 promoter in transgenic rice and their progeny. Mol. Gen. Genet. 228: 40-48.
9. D. I. Last et al., (1991) pEmu: an improved promoter for gene expression in cereal cells. Theor. Appl. Genet. 81: 581-588.
10. Robert Bower and Robert G. Birch (1992) Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment.

MD 2312 B2 2003.11.30

11

- The Plant Journal 2 (3): 409-416.
11. D. A. Chamberlain et al., (1994) The use of the Emu promoter with antibiotic and herbicide resistance genes for the selection of transgenic wheat callus and rice plants. *Aust. J. Plant Physiol.*, 21: 95-112.
 12. L. Comai et al. (1985) Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
 13. C. Waldron et al. (1985) Resistance to hygromycin B: A new marker for plant transformation studies. *Plant Mol. Biol.* 5 103-108.
 14. Kevin E. McBride and Kristin R. Summerfelt 1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium-mediated* plant transformation, *Plant Mol. Biol.* 14: 269-276.
 15. Michael Bevan et al. (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
 16. Luis Herrera-Estrella et al. (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 304: 209-213.
 17. Robert T. Fraley et al. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *P.N.A.S.* 80: 4803-4807.
 18. Marc De Block et al. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO J.* 3: 1681-1689.
 16. R. Hain et al. (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199: 161-168.
 20. J-C. Kridl and Robert M. Goodman (1986) Transcriptional regulatory sequences from plant viruses. *Bio Essays* 4:4-8.
 21. Joan T. Odell et al. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 3' 5S promoter. *Nature* 313: 810-812.
 22. David W. Ow et al (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856-859.
 23. D.M. Shah et al. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.
 24. Robert Kay et al. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
 25. L. Comai et al. (1990) Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol. Biol.* 15: 373-381.
 26. J. Pazskowski et al. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3: 2717-2722.
 27. Ervin Balazs et al. (1985) Chimeric vector construction for higher-plant transformation. *Gene* 40: 343-348.
 28. Margaret Sanger et al. (1990) Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: Comparison with the analogous 3' 5S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol. Biol.* 14: 433-443.
 29. Gail Schmidt and Bijay K. Singh (1990) Tissue distribution of acetohydroxyacid synthase activity at various developmental stages of lima bean. *Pesticide Sci.* 30 (4): 418-419.
 30. Sharon J. Kheeler et al., (1993) Regulation of tobacco acetolactate synthase gene expression. *Plant Physiol.* 102:1009-1018.
 31. Therese Ouellet et al., (1992) Members of the acetohydroxyacid synthase multigene family of *Brassica napus* have divergent patterns of expression. *The Plant Journal* 2: 321-330.
 32. Dale L. Shaner and N. Moorthy Mallipudi (1991) Imidazolinone - Acetohydroxyacid synthase interactions. In *The Imidazolinone Herbicides* ed. Dale L. Shaner and Susan L. O'Connor CRC Press (Boca Raton, FL.)
 33. EP 0525384 B1 1993.02.03
 34. EP 0360750 A3 1990.03.28

Şef Secție:	GUŞAN Ala
Examinator:	BANTAŞ Valentina
Redactor:	LOZOVANU Maria

MD 2312 B2 2003.11.30

12

```
TCTAGAGAAA CTAACTACT AATAAAAATT ATTTTAGCA TATTTTAGTA CTGTNGTTTA
60
TATTNNAAA TGATAAAGTT TAACTAAAAG TGCACCGCTA AACCACCGTA AATCCAAAGA
120
GACCGTAAAT CTCTCCACG CACTCTGTCG TGTACCAACG TGCTGTGGAA ACGCTC ACGT
180
ACCTTTGTGT ATTATGTACG GATTTCGGCA ACGGACATTT CGACGTCGGT TGCCAGTCC
240
NATTCCCATC TGAACCACAC ATCTCTGAAC AAAAGTAGGG GAGGCGCCCG CGTAGCCCCC
300
TTTCCCACAA TCCCACTCCG TGCCAGGTGC CACCCTCCCC AAGCCCTCGC GCCGCTCCGA
360
GACAGCCGCC CGCAACATG GCCACCGCCG CCACCGCGGC CGCCGCGCTC ACC
413
```

Fig. 1

```
CCGGATTTC CTGTTGCGGA TTGCGGGTGG CAGCCTGGCA GGTGGGTGCG ACCCGTTTG
60
GATTCCCTTG TCTGGGCCCC TTGTGTCAGT ACCGTCTGTA CTCCGATGAC ATGCACCGTC
120
GTCCACAGTC AAGTCCAAAA TCTCCCCTCT TTTTTTAAAC GGAACAGTTC AAAACCTCCT
180
TGACGCACGC TGTCGTGTAC CAGCACTCGG TGGACACCAC GTTTGTAATC CAGGCCGACA
240
CGTCGGTCCC ACGTCGACAG GCCCACCCT CCGGTCTGTA GCGTGTACGT ATTCGGGCGA
300
CGGACGTGTC GTCGTCGTCT TCGAGTCCC ATTCCCATCA CCATCTGAGC CACACATCCT
360
CTGAACAAAA GCAGGGAGGC CTCCACGCAC ATCCCCCTTT CTCCACTCCG GTCCGTGGCA
420
CCCACCCCAA ACCCTCGCGC CGCCTCCGAG ACAGCCGCCG CAACCATGGC CACCGCCGCC
480
GCCGCGTCTA CCGCGCTCAC TGGCGCCAC
509
```

Fig. 2

MD 2312 B2 2003.11.30

13

```
CTGCAGGTCA ACGGATCACC TATCAACATC CCAGCTAAAA ACAGTAAAA GGGGGAAAA
60
GTGGGTGAGT TGAGTCTGTC TTGTGAAAA AACGTTTGTAG TTTCTCCTGG AATTAACAAT
120
AAAAACAGTT GAACAAGATT GACTGTCCT CCGGGAGGGT TTGGAACATC GTTACAGATG
180
TGAGCGAAAAG GTGAGGAAAC AGAGCGGAGG GCTTGGAGGT GACCTCGGTA
GTCGACGCCG
240
GAGTTGAGCT TGATGACGAC ACCGTACTGG CGTACCAGGC CTAGTAGTGA ACACGGGGCC
300
TGAAGCTGTC GCCGCCGCTG CTCATCTTGT GGGCTGTGCC CGGTGTCCCT GTTGCGGATT
360
GCGGGTGGCA GCCTGGCAGG TGGGTGCGAC CCGTTTGGAC TCCCTGATCT GGGCCCTTTG
420
TGTCAGTACC GTCTGTACTC CGATGACATG CACACCGTCG TCCACAGTCA AGTCCACAAT
480
CTCCCTCTT TTTTAACGG AATAGTTCAA AATCTCCTTG ACGCACGCTA TCGTGTACCA
540
GCGTCACTG GACACCACGT TTGTAATCCA CGCCGACAG TCGGTCCCAC GTCGACAGGC
600
CCCACCGTCC GGTCTGTAGC GTGTACGTAT TCGGGCGACG GACGTGTCTG CGTCGTCTTG
660
CGAGTCCCAT TCCCATCACC ATCTGAGCCA CACATCCTCT GAACAAAAGC AGGGAGGCCT
720
CTACGCACAT CCCCTTTCT CCCACTCCGT GTCCGTGGCA CCCACCCAA ACCCTCGCGC
780
CGCCTCCGAG ACAGCCGCCG CAACCATGGC CACCG
815
```

Fig. 3

MD 2312 B2 2003.11.30

14

	OREZ			BMS		
	EXPT. I	EXPT. II	EXPT. III	EXPT. I	EXPT. II	EXPT. III
ALS2-GUS						2275
						6117
			1129			3234
	3040	8337	1033	3174		2060
	2413	5110	1187	1269	7295	4018
	2847	8024	1999	4145	9419	3369
ABATERE	2767	7157	1337	2863	8357	3149
MEDIE STANDARD	321	1780	446	1463		997
35S-GUS						
						334
						624
			1882			1032
	970		1097	348		341
	1175	2430	1235	540	1021	384
	1732	3435	731	292	1228	359
ABATERE	1292	2933	1236	393	1125	529
MEDIE STANDARD	394		480	130		336
RAPORTUL ALS/35S						

Fig. 4A

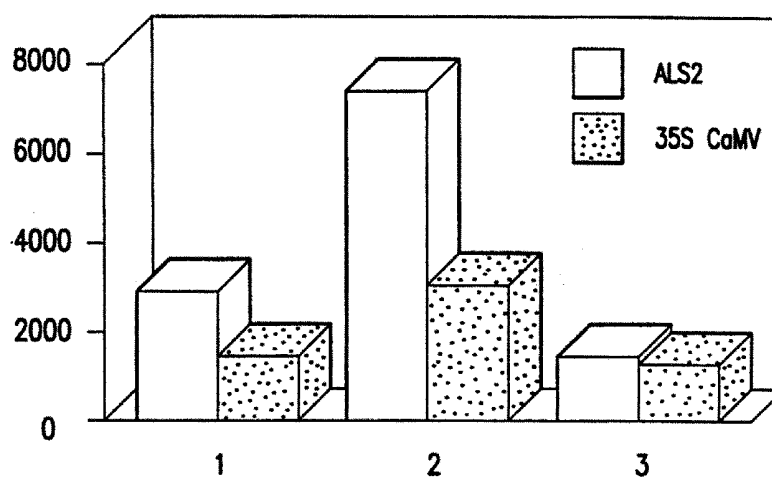


Fig. 4B

MD 2312 B2 2003.11.30

15

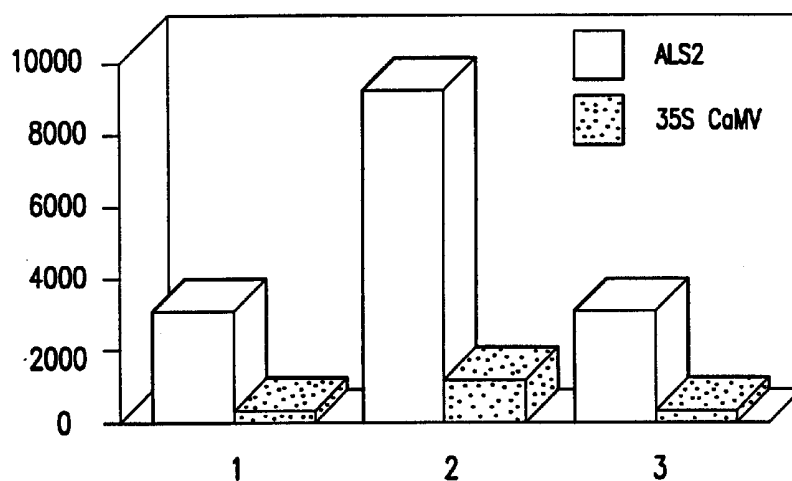


Fig. 4C

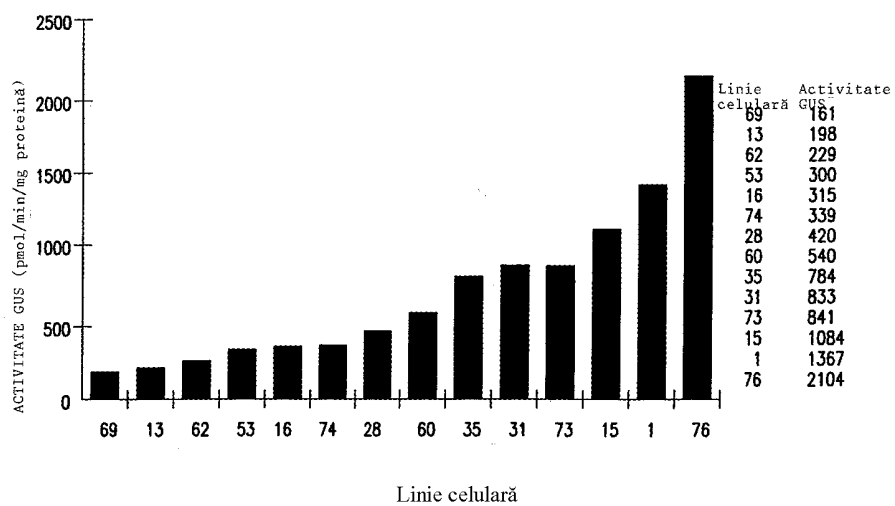


Fig. 5

MD 2312 B2 2003.11.30

16

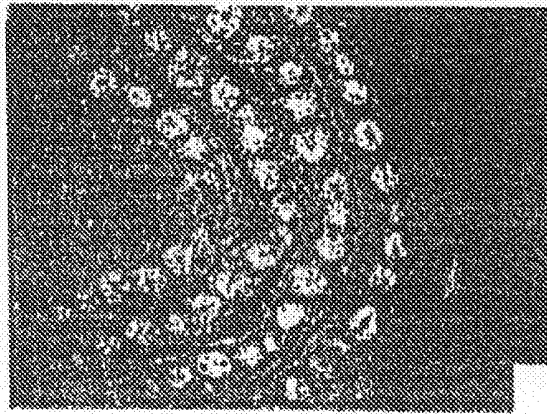


Fig. 6A

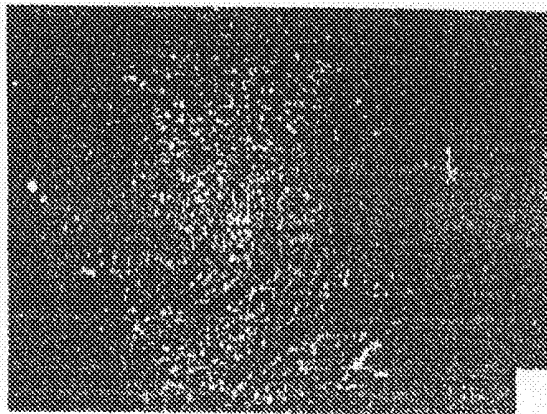


Fig. 6B



Fig. 6C

MD 2312 B2 2003.11.30

17

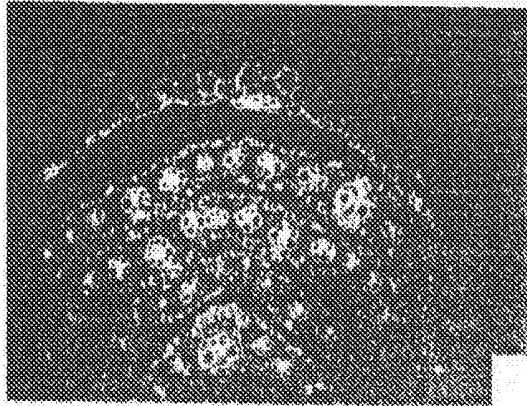


Fig. 6D

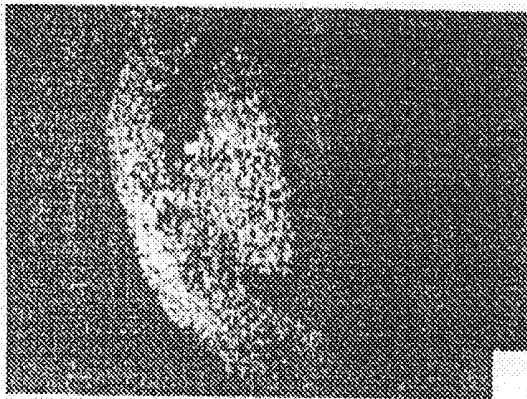


Fig. 7A

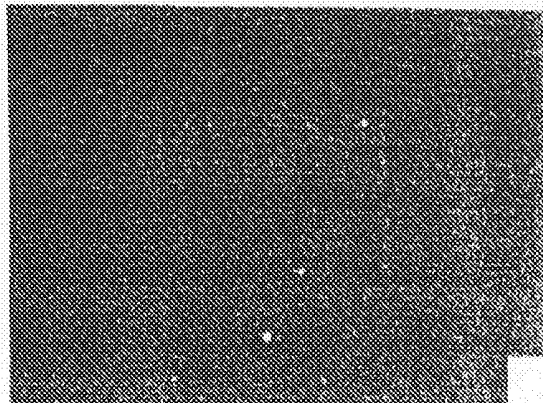


Fig. 7B

MD 2312 B2 2003.11.30

18



Fig. 7C

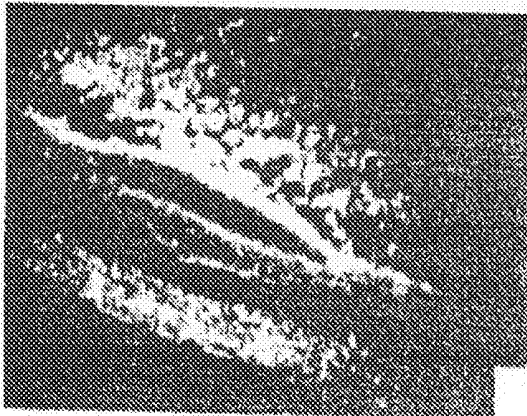


Fig. 7D

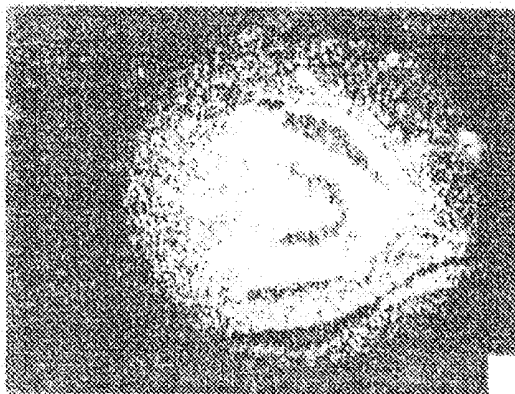


Fig. 8A

MD 2312 B2 2003.11.30

19

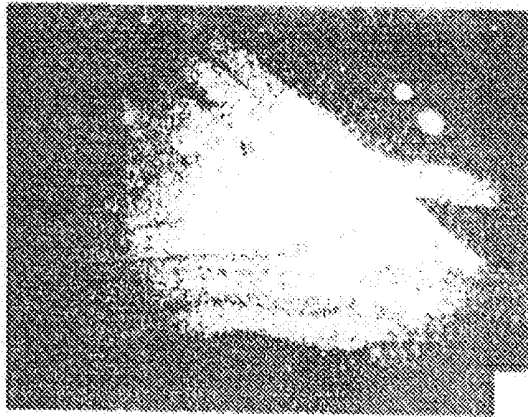


Fig. 8B

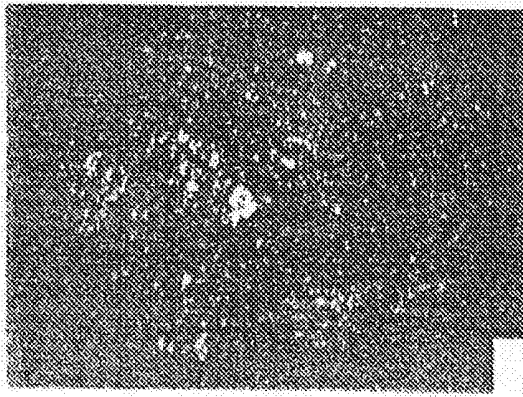


Fig. 8C

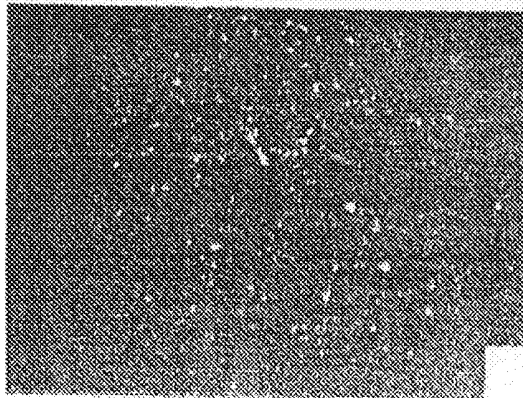


Fig. 8D

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 97-0144	(85) Data fazei naționale PCT: 1997.04.08
(22) Data depozit: 1995.09.05	(86) Cerere internațională PCT: PCT/US95/11199, 05.09.1995
Prioritatea invocată : (31) nr.: 08,303,266 (32) data : 1994.09.08 (33) țara : US (51)⁷ : C 12 N 15/82, 15/60, 5/10; A 01 H 5/00 Alți indici de clasificare: (54) Titlul : Succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor; vector; procedeu de expresie a genei heteroloage; construct de acid nucleic și metodă de selecție a materialului vegetal transgenic (71) Solicitantul : AMERICAN CYANAMID COMPANY, US Termeni caracteristici : a) limba română: succesiune nucleotidă izolată a promotorului genei sintazei acetohidroxiacizilor; vector; procedeu de expresie a genei heteroloage; construct de acid nucleic; metodă de selecție a materialului vegetal transgenic b) limba engleză: an isolated nucleotide sequence comprising an AHAS promoter; vector; a method of expressing a heterologous gene; a nucleic acid construct; a method of selection vegetal transgenic material c) limba rusă: изолированная нуклеотидная последовательность промотора гена синтазы AHAS; вектор трансформации растений; способ экспрессирования гетерологичного гена; конструкция нуклеиновой кислоты; метод селекции растительного трансгенного материала, устойчивого к гербицидам	
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.- 7)	
Int. Cl. ⁷ C 12 N 15/82, 15/60, 5/10; A 01 H 5/00 MD 1994-2003 EA 1996-2003 SU fond BRIT	
II. Literatura tehnico-științifică consultată adăugător la minim de documentație (autori, titluri, editura, țara și data publicării)	
III. Baze de date electronice consultate (denumirea BD și termen de documentare)	
RU 1994-2003-09-01 ESPACEnet ВИНИТИ	

IV. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A A A	EP 0525384 A 1993.02.03 EP 0360750 A3 1990.03.28 WO 9208794 A 1992.05.29	
☐ Documentele următoare sunt indicate în rubrica IV		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data depozit, dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
E - document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat de unul singur
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate sau poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă divulgare		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării 2003.09.01		
Examinatorul Bantaș Valentina		