

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 974430 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **974430**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 39/02
A61K 39/104
A01H 5/00
A01N 63/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **05.06.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **05.12.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **26.01.1998**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **05.06.1996 PCT/US1996/008819**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

07.06.1995 US 475775

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Cornell Research Foundation Inc., Suite 105, 20 Thornwood Drive, Ithaca, NY 14850, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Wei, Zhong-Min, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Beer, Steven V., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Hypersensitiivisen vasteen indusoima resistenssi kasveissa

Resistens i plantor inducerad av en hypersensitiv respons

Yliherkkyyssreaktiolla synnytetty vastustuskyky kasveissa – Genom hypersensitiv reaktion inducerad resistens hos växter

5 Tämä keksintö on tehty USA:n valtion tuella, jonka USDA NRI (maatalousministeriön Kansallinen tutkimuslaitos) on myöntänyt kilpailukykyiseen tutkimukseen nro:lla 91-37303-6430.

Keksinnön ala

Tämä keksintö koskee yliherkkyyssreaktiolla indusoidun vastustuskyvyn synnyttämistä kasveissa.

10 Keksinnön tausta

Elävät organismit ovat kehittäneet monimutkaisen valikoiman biokemiallisia reittejä, jotka tekevät niille mahdolliseksi tunnistaa ja reagoida ympäristöstä tuleviin signaaleihin. Tällaisia reittejä ovat reseptorielimet, hormonit, toisioälyt ja entsymaattiset muutokset. Tällä hetkellä tiedetään vähän signaalitransduktioteistä, jotka aktivoitu-

15 vat kasvin reagoidessa jonkin patogeenin hyökkäykseen, vaikka tämä tieto on keskeistä tauteihin sairastumisalttiuden ja taudinkestävyyden ymmärtämiseksi. Kasvin taudinkestävyyden tavallinen muoto ilmenee patogeenin leviämisen rajoittumisena infektiokohtaa ympäröivälle pienelle alueelle. Monissa tapauksissa tätä rajoittumista seuraa isäntäkudosten paikallinen kuolema (s.o. nekroosi). Patogeenin rajoittuminen ja paikallinen kudokset ovat yhdessä tunnusomaisia yliherkkyyssreaktiolle. Paikallisten puolustusreaktioiden lisäksi monet kasvit reagoivat infektiioon aktivoimalla puolustuksen kasvin infektoitumattomissa osissa. Tämän seurauksena koko kasvi on vastustuskykyisempi myöhemmälle infektiolle. Tämä hankittu systeeminen vastustuskyky voi säilyä useita viikkoja tai pitempäänkin [R.E.F. Matthews, Plant Virology (Academic Press, New York, ed. 2, 1981)] ja usein se antaa ristikkäisresistenssin muillekin patogeeneille [J. Kuc teoksessa Innovative Approaches to Plant Disease Control, I. Chet, toim. (Wiley, New York, 1987), ss. 255-274, joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].

20 25

Systeemisen hankitun vastustuskyvyn ilmenemisen jälkeen normaalisti virulentit taudinaiheuttajat eivät pysty tunkeutumaan immunisoituneeseen kudokseen [Kuc, J. "Induced Immunity to Plant Disease", Bioscience, 32:854-856 (1982), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Systeemisen hankitun vastustuskyvyn vakiintumisen kanssa korreloi systeemisen solunseinän hydroksipoliinitason ja peroksidaasiaktii-

30

visuuden nousu [Smith, J.A. *et al.*, "Comparative Study of Acidic Peroxidases Associated with Induced Resistance in Cucumber, Muskmelon and Watermelon", Physiol. Mol. Plant Pathol. 14:329-338 (1988), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna] ja niin kutsutun systeemisen hankitun resistenssigeenin yhdeksän perheen

5 sarjan ilmentyminen [Ward, E.R., *et al.*, "Coordinate Gene Activity in Response to Agents that Induce Systemic Acquired Resistance", Plant Cell 3:49-59 (1991), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Viisi näistä puolustusgeeniperheistä koodaa patogeenisiin liittyviä proteiineja, joiden fysiologisia toimintoja ei ole selvitetty. Joillakin näistä proteiineista on kuitenkin sieniä tuhoavaa aktiivisuutta *in vitro* [Bol, J.F.

10 *et al.*, "Plant Pathogenesis-Related Proteins Induced by Virus Infection", Ann. Rev. Phytopathol. 28:113-38 (1990), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna], ja pavun kitinaasigeenin konstitutiivinen ilmentyminen siirtogeenisessä tupakassa suojaa *Rhizoctonia solani* -sienen infektiolta [Broglie, K., *et al.*, "Transgenic Plants with Enhanced Resistance to the Fungal Pathogen *Rhizoctonia Solani*", Science,

15 254:1194-1197 (1991), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna], mikä viittaa siihen, että nämä systeemiset hankitut resistenssiproteiinit saattavat olla mukana tuottamassa immuunitilaa [Uknes, S. *et al.*, "Acquired Resistance in *Arabidopsis*", Plant Cell 4:645-656 (1992), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].

Salisyylilihapolla näyttää olevan signaalifunktio systeemisen hankitun vastustuskyvyn synnyttämisessä, koska sen endogeeniset tasot nousevat immunisoitumisen jälkeen [Malamy, J. *et al.*, "Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection", Science 250:1002-1004 (1990), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna] ja eksogeeninen salisylaatti indusoi systeemisen hankittuja resistenssigeenejä [Yalpani, N. *et al.*, "Salicylic Acid is a Systemic Signal and an Inducer of Pathogenesis-Related Proteins in Virus-Infected Tobacco", Plant Cell 3:809-818 (1991), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna] ja hankittua vastustuskykyä [Uknes, S. *et al.*, "Acquired Resistance in *Arabidopsis*", Plant Cell 4:645-656 (1992), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Lisäksi siirtogeenisillä tupakkakasveilla, joissa salisylaattia tuhoutuu erästä bakteeriperäistä siirtogeeniä koodaavan salisylaattihydroksylaasin vaikutuksesta, ei ole systeemistä hankittua vastustuskykyä [Gaffney, T. *et al.*, "Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance", Science 261:754-296 (1993), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Tämä vaikutus saattaa kuitenkin heijastaa pikemminkin paikallisen kuin systeemisen signaalifunktion estymistä ja signaalitransmission yksityiskohtainen kineettinen analyysi kurkussa antaa aiheen ajatella, että salisylaatti ei olisikaan välttämätön pitkän etäisyyden signaalin siirrolle [Rasmussen, J.B. *et al.*, "Systemic Induction of Salicylic Acid Accumulation in Cucumber after Inoculation with *Pseu-*

domonas Syringae pv. *Syringae*", Plant Physiol. 97:1342-1347 (1991), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].

- Bioottisia aineita käyttämällä tapahtuvaa immunisointia on tutkittu laajasti. Vihreitä papuja immunisoitiin systeemisesti tautia vastaan, jonka aiheuttavat *Colletotrichum*
- 5 *lindemuthianum* lajikepatogeeniset lajit infektoimalla niitä etukäteen lajikkeille ei-patogeenisilla lajeilla [Rahe, J.E. "Induced Resistance in *Phaseolus Vulgaris* to Bean Anthracnose", Phytopathology 59:1641-5 (1969); Elliston, J. *et al.*, "Induced Resistance to Anthracnose at a Distance from the Site of Inducing Interaction", Phytopathology 61:1110-12 (1971); Skipp, R. *et al.*, "Studies on Cross Protection in the Anthracnose Disease of Bean", Physiological Plant Pathology 3:299-313 (1973),
- 10 jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuna], lajikepatogeenisilla lajeilla, joita oli heikennetty lämmöllä isäntäkudoksissa ennen oireiden ilmenemistä [Rahe, J.E. *et al.*, "Metabolic Nature of the Infection-Limiting Effect of Heat on Bean Anthracnose", Phytopathology 60:1005-9 (1970), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna] tai lajeilla,
- 15 la, jotka eivät ole patogeenisiä pavuille. Kurkun antraknoosipatogeeni, *Colletotrichum lagenarium*, oli yhtä tehokas kuin ei-patogeeniset lajit systeemisen suojan indusoinnissa kaikkia pavun antraknoosilajeja vastaan. Suoja indusoitiin *C. lagenariumilla* lajikkeissa, jotka olivat vastustuskykyisiä yhdelle tai useammalle *C. lindemuthianum* -lajille, sekä lajikkeissa, jotka olivat herkkiä sienien kaikille raportoiduille
- 20 le lajeille ja joista oli siten mainittu "puuttuvan geneettinen vastustuskyky" patogeenille [Elliston, J. *et al.*, "Protection of Bean Against Anthracnose by *Colletotrichum* Species Nonpathogenic on Bean", Phytopathologische Zeitschrift 86:117-26 (1979); Elliston, J. *et al.*, "A Comparative Study on the Development of Compatible, Incompatible and Induced Incompatible Interactions Between *Colletotrichum* Species and *Phaseolus Vulgaris*", Phytopathologische Zeitschrift 87:289-303 (1976),
- 25 jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Nämä tulokset viittaavat siihen, että sama mekanismi saattaa indusoitua lajikkeissa, joiden raportoidaan "omaavan" tai joilta raportoidaan "puuttuvan" resistenssigeenejä [Elliston, J. *et al.*, "Relation of Phytoalexin Accumulation to Local and Systemic Protection of Bean Against Anthracnose", Phytopathologische Zeitschrift 88:114-30 (1977), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. On myös ilmeistä, että lajikkeista, jotka ovat herkkiä kaikille *C. lindemuthianum* -lajeille, ei puutu geenejä, jotka tuovat vastustusmekanismeja patogeenia kohtaan.
- 30
- Kuc, J. *et al.*, "Protection of Cucumber Against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*", Physiological Plant Pathology 7:195-9 (1975), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna, osoittivat, että kurkkukasveja voidaan systeemisesti
- 35

- suojella *Colletotrichum lagenariumin* aiheuttamalta taudilta istuttamalla etukäteen sirkkalehtiin tai ensimmäiseen varsinaiseen lehteen sama sieni. Sen jälkeen kurkkuja on suojattu systeemisesti sien-, bakteeri- ja virustauteja vastaan infektoimalla ne paikallisesti etukäteen sienillä, bakteereilla tai viruksilla [Hammerschmidt, R. *et al.*, "Protection of Cucumbers Against *Colletotrichum Lagenarium* and *Cladosporium Cucumerinum*", *Phytopathology* 66:790-3 (1976); Jenns, A.E. *et al.*, "Localized Infection with Tobacco Necrosis Virus Protects Cucumber Against *Colletotrichum Lagenarium*", *Physiological Plant Pathology* 11:207-12 (1977); Caruso, F.L. *et al.*, "Induced Resistance of Cucumber to Anthracnose and Angular Leaf Spot by *Pseudomonas Lachrymans* and *Colletotrichum Lagenarium*", *Physiological Plant Pathology* 14:191-201 (1979); Staub, T. *et al.*, "Systemic Protection of Cucumber Plants Against Disease Caused by *Cladosporium Cucumerinum* and *Colletotrichum Lagenarium* by Prior Localized Infection with Either Fungus", *Physiological Plant Pathology* 17:389-93 (1980); Bergstrom, G.C. *et al.*, "Effects of Local Infection of Cucumber by *Colletotrichum Lagenarium*, *Pseudomonas Lachrymans* or Tobacco Necrosis Virus on Systemic Resistance to Cucumber Mosaic Virus", *Phytopathology* 72:922-6 (1982); Gessler, C. *et al.*, "Induction of Resistance to *Fusarium* Wilt in Cucumber by Root and Foliar Pathogens", *Phytopathology* 72:1439-41 (1982); Bas-ham, B. *et al.*, "Tobacco Necrosis Virus Induces Systemic Resistance in Cucumbers Against *Sphaerotheca Fuliginea*", *Physiological Plant Pathology* 23:137-44 (1983), jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuina]. Epäspesifinen suoja, joka aikaansaatiin infektoimalla *C. lagenariumilla* eli tupakan nekroosia aiheuttavalla viruksella, tehoi ainakin 13 patogeeniin, joihin sisältyi pakollisia ja valinnaisia parasiittisieniä, paikallisia leesioita aiheuttavia ja systeemisiä viruksia, kuihtumista aiheuttavia sieniä ja bakteereita. Samalla tavalla suoja synnyttiin juuripatogeenilla ja se myös tehoi niitä vastaan. Muita kurkkukasveja, mukaan lukien vesimeloni ja meloni, on suojattu systeemisesti *C. lagenariumia* vastaan [Caruso, F.L. *et al.*, "Protection of Watermelon and Muskmelon Against *Colletotrichum Lagenarium* by *Colletotrichum Lagenarium*", *Phytopathology* 67:1285-9 (1977), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].
- Tupakassa on saatu aikaan systeeminen suoja monenlaisia tauteja vastaan [Kuc, J. *et al.*, "Immunization for Disease Resistance in Tobacco", *Recent Advances in Tobacco Science* 9:179-213 (1983), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Tupakan mosaikkiviruksen aikaansaamat nekroottiset vauriot vahvistivat vastustuskykyä ylemmissä lehdistä viruksen aiheuttamalle taudille [Ross, A.F. *et al.*, "Systemic Acquired Resistance Induced by Localized Virus Infections in Plants", *Virology* 14:340-58 (1961); Ross, A.F. *et al.*, "Systemic Effects of Local Lesion Formation",

- teoksessa Viruses of Plants ss. 127-50 (1966), jotka sisällytetään tähän viitejulkaisui-
suina]. *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *P. tabacina* ja *Pseudomonas tabaci*
vähensivät *Myzus persicae* -lehtikirvan lisääntymistä [McIntyre, L.J. *et al.*,
"Induction of Localized and Systemic Protection Against *Phytophthora Parasitica*
var. *nicotianae* by Tobacco Mosaic Virus Infection of Tobacco Hypersensitive to
5 the Virus", Physiological Plant Pathology 15:321-30 (1979); McIntyre, J.L. *et al.*,
"Effects of Localized Infections of *Nicotiana Tabacum* by Tobacco Mosaic Virus on
Systemic Resistance Against Diverse Pathogens and an Insect", Phytopathology
71:297-301 (1981), jotka sisällytetään tähän viitejulkaisui-
10 *tabacin* [Lovrekovich, L. *et al.*, "Induced Reaction Against Wildfire Disease in To-
bacco Leaves Treated with Heat-Killed Bacteria", Nature 205:823-4 (1965), joka
sisällytetään tähän viitejulkaisuna] ja *Pseudomonas solanacearum* [Sequeira, L. *et*
al., "Interaction of Bacteria and Host Cell Walls: Its Relation to Mechanisms of In-
duced Resistance", Physiological Plant Pathology 10:43-50 (1977), joka sisällyte-
15 tään tähän viitejulkaisuna] infiltroiminen tupakan lehtiin synnytti resistenssin sa-
moille bakteereille, jota käytettiin infiltroimiseen. Tupakkakasveja suojattiin myös
Pratylenchus penetrans -sukkulamadoilla *P. parasitica* var. *nicotiana* vastaan
[McIntyre, J.L. *et al.*, "Protection of Tobacco Against *Phytophthora Parasitica* Var.
Nicotianae by Cultivar-Nonpathogenic Races, Cell-Free Sonicates and *Pratylenchus*
20 *Penetrans*", Phytopathology 68:235-9 (1978), joka sisällytetään tähän viitejulkaisu-
na].
- Cruikshank, I.A.M. *et al.*, "The Effect of Stem Infestation of Tobacco with *Peronospo-
ra Tabacina* Adam on Foliage Reaction to Blue Mould", Journal of the Aust-
ralian Institute of Agricultural Science 26:369-72 (1960), joka sisällytetään tähän
25 viitejulkaisuna, raportoivat ensimmäisinä tupakan lehtien immunisoinnin viherho-
metta (s.o. *P. tabacina*) vastaan ruiskuttamalla sen varteen sientä, mikä aiheutti
myös kääpiökasvuisuutta ja ennenaikaista kuihtumista. Äskettäin paljastui, että inji-
sointi ksyleemin ulkopuolelle ei ainoastaan vähentänyt kasvun hidastumista, vaan
myös edisti kasvua ja kehittymistä. Immunisoidut tupakantaimet olivat sekä kasvi-
30 huoneessa että kenttäkokeissa noin 40 % suurempia, niiden kuivapaino nousi 40 %
ja tuorepaino 30 %, ja niille kehittyi 4 - 6 lehteä enemmän kuin verrokkitaimille
[Tuzun, S. *et al.*, "The Effect of Stem Injections with *Peronospora Tabacina* and
Metalaxyl Treatment on Growth of Tobacco and Protection Against Blue Mould in
the Field", Phytopathology 74:804 (1984), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].
35 Nämä taimet kukkivat suunnilleen 2 - 3 viikkoa aikaisemmin kuin verrokkikasvit
[Tuzur, S. *et al.*, "Movement of a Factor in Tobacco Infected with *Peronospora Ta-*

Tabacina Adam which Systemically Protects Against Blue Mould", Physiological Plant Pathology 26:321-30 (1985), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].

5 Systeeminen suoja ei tuota absoluuttista immuniteettia infektiota kohtaan, mutta se lieventää taudin vakavuutta ja viivästyttää oireiden kehittymistä. Vaurioiden lukumäärä, vaurioiden koko ja sienipatogeenien itiönmuodostus vähentyvät kaikki. Taudin vaivaama pinta-ala saattaa supistua yli 90 %.

10 Kun kurkuille annettiin "tehostustartutus" 3 - 6 viikkoa ensitartutuksen jälkeen *C. lagenariumilla*, aikaansaatu immuniteetti kesti koko kukinnan ja hedelmien tuoton ajan [Kuc, J. *et al.*, "Aspects of the Protection of Cucumber Against *Colletotrichum Lagenerium* by *Colletotrichum Lagenerium*" Phytopathology 67:533-6 (1977), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Suojausta ei voitu synnyttää sen jälkeen, kun kasvit olivat virittyneet tuottamaan satoa. Tupakantaimia immunisoitiin kasvukautta varten ruiskuttamalla varteen *P. tabacinan* itiöitä. Systeemisen viherhomeen kehittymisen osalta tämä menetelmä tehosi kuitenkin vain silloin, kun taimet olivat yli 15 20 cm:n korkuisia.

Indusoiijalehden poistaminen immunisoiduista kurkuntaimista ei alentanut jo olemassa olevien kasvaneiden lehtien immunisaatiotasoa. Lehtien, joita myöhemmin kasvoi kasvupisteestä, suoja heikkeni vähitellen heikommaksi kuin varhaisempien lehtien [Dean, R.A. *et al.*, "Induced Systemic Protection in Cucumber: Time of Production and Movement of the 'Signal'", Phytopathology 76:966-70 (1986), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Samankaltaisia tuloksia raportoi Ross, A.F., "Systemic Effects of Local Lesion Formation", teoksessa Viruses of Plants ss. 127-50 (1966), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna, tupakasta (paikallinen leesioisäntä), joka oli immunisoitu tupakanmosaiikkivirusta vastaan ennen kuin se infektoitiin 25 tupakanmosaiikkiviruksella. Sitä vastoin uudet lehdet, joita kehittyi *P. tabacinalla* varsi-immunisoiduista tupakantaimista leikatuista varrennusoksista, olivat erittäin hyvin suojattuja [Tuzun, S. *et al.*, "Transfer of Induced Resistance in Tobacco to Blue Mould (*Peronospora Tabacina* Adam) Via Callus", Phytopathology 75:1304 (1985), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Kasveissa, jotka regeneroitiin kudosisviljelyn avulla immunisoitujen kasvien lehdistä, esiintyi merkittävästi vähemmän viherhometta verrattuna kasveihin, jotka oli regeneroitu immunisoimattomien emokasvien lehdistä. Nuorissa regeneranteissa esiintyi vain vähäistä itiönmuodostusta. Kasvien vanhetessa sekä vaurioiden kehittyminen että itiönmuodostus oli vähäisempää. Toiset tutkijat eivät kuitenkaan tulleet samoihin päätelmiin, vaikka eräästä ko- 35 keesta raportoitiinkin merkittävää vähenemistä itiönmuodostuksessa [Lucas, J.A. *et al.*, "Nontransmissability to Regenerants from Protected Tobacco Explants of Indu-

ced Resistance to *Peronospora Hyoscyami*", Phytopathology 75:1222-5 (1985), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna].

- 5 Kurkun ja vesimelonin suojaaminen onnistuu tehokkaasti kasvihuoneessa ja kentällä [Caruso, F.L. *et al.*, "Field Protection of Cucumber Against *Colletotrichum Lagenarium* by *C. Lagenarium*", Phytopathology 67:1290-2 (1977), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna]. Eräässä kokeessa *C. lagenariumin* vaurioittama kokonaispinta-ala suojatussa kurkussa oli alle 2 % suojaamattomilla kasveilla esiintyvistä vauriopinta-alasta. Samaten ainoastaan yksi (1) 66 suojatusta ja altistetusta kasvista kuoli, kun sen sijaan 69 suojaamattomasta altistetusta vesimelonista kuoli 47. Kentuckyssa ja Puerto Ricossa suoritetuissa laajoissa kenttäkokeissa *P. tabacinan* itiöpesäkkeiden ruiskuttaminen tupakan varteen oli vähintään yhtä tehokasta viherhomeen torjunnassa kuin paras fungisidi, metalaksyyli. Kasvien suoja oli 95 - 99 % nekroottisen pinta-alan ja itiömuodostusasteen perusteella määritettynä, mikä johti parannetun tupakan sadon lisääntymiseen 10 - 25 %:lla.
- 10
- 15 Indusoitu resistenssi bakteereille ja viruksille näytetään ilmaistavan taudin oireiden tai taudinaiheuttajan lisääntymisen tai molempien suppressiona [Caruso, F.L. *et al.*, "Induced Resistance of Cucumber to Anthracnose and Angular Leaf Spot by *Pseudomonas Lachrymans* and *Colletotrichum Lagenarium*", Physiological Plant Pathology 14:191-201 (1979); Doss, M. *et al.*, "Systemic Acquired Resistance of Cucumber to *Pseudomonas Lachrymans* as Expressed in Suppression of Symptoms, but not in Multiplication of Bacteria", Acta Phytopathologia Academiae Scientiarum Hungaricae 16:(3-4), 269-72 (1981); Jenns, A.E. *et al.*, "Non-Specific Resistance to Pathogens Induced Systemically by Local Infection of Cucumber with Tobacco Necrosis Virus, *Colletotrichum Lagenarium* or *Pseudomonas Lachrymans*", Phytopathologia Mediterranea 18:129-34 (1979), jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuina].
- 20
- 25

- Kuten edellä kuvattiin, tutkittaessa systeemistä hankittua vastustuskykyä kasveja infektoidaan infektoivilla taudinaiheuttajilla. Vaikka tämän alan tutkimukset ovat hyödyllisiä hankitun systeemisen vastustuskyvyn toiminnan ymmärtämiseksi, tällaisen vastustuskyvyn aikaansaaminen infektoivilla agenseilla ei ole kaupallisesti hyödyllistä, koska tällainen kasvipatogeenin kosketus saattaa heikentää tai tappaa taimet. Esillä oleva keksintö tähtää tämän puutteen korjaamiseen.
- 30

Yhteenveto keksinnöstä

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajille. Tässä menetelmässä kasviin levitetään yliherkkyyksireaktion syn-

nyttävää polypeptidiä tai proteiinia ei-infektoivassa muodossa sellaisissa olosuhteissa, että polypeptidi tai proteiini on kosketuksessa kasvin soluihin.

- 5 Esillä olevan keksinnön toinen aspekti koskee taudinaiheuttajalle vastustuskykyistä kasvia, jonka solut ovat kosketuksessa ei-infektoivan yliherkkyyksireaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin kanssa.

Esillä olevan keksinnön vielä eräs aspekti koskee koostumusta, jolla saadaan aikaan taudinkestävyys kasveissa. Koostumus käsittää ei-infektoivan, yliherkkyyksireaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin ja jonkin kantaja-aineen.

- 10 Esillä olevan keksinnön avulla voidaan: hoitaa kasvitauteja, joita ei aikaisemmin ole voitu hoitaa; hoitaa systeemisesti tauteja, joita kustannusten vuoksi ei haluttaisi hoitaa erikseen; ja välttää infektoivien aineiden käyttöä kasvien hoitamiseen. Esillä olevalla keksinnöllä voidaan saada aikaan vastustuskyky käyttämättä aineita, jotka ovat patogeenisia hoidettaville kasveille tai kasveille, jotka ovat hoidettujen kasvien läheisyydessä. Koska esillä olevassa keksinnössä käytetään luonnontuotetta, joka on
15 täysin biologisesti hajoava, se ei aiheuta ympäristön saastumista.

Piirustusten lyhyt kuvaus

- 20 Kuvio 1 esittää geeniryppään, joka koodaa *Erwinia amylovorasta* johdettua yliherkkyyksireaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia, (s.o. *hrpN*) geneettistä järjestystä. Yläriivi esittää plasmidivektorin pCPP430 restriktioentsyymikarttaa, jossa E=*EcoRI*, B=*BamHI* ja H=*HindIII*. Suorakulmiot kuvaavat transskriptioyksiköitä ja suorakulmioiden alla olevat nuolet osoittavat transskription suunnan. Pitempi nuoli osoittaa alueen, joka tarvitaan yliherkkyyksireaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin myöhempään translaatioon. pCPP430 *hrpN* on pCPP430:n johdos, jossa *hrpN* on mutatoitu insertoimalla siihen transposoni Tn*Stac*.

- 25 Kuvio 2 on plasmidivektorin pCPP9 kartta. Merkittäviä tunnusmerkkejä ovat konjugation mobilisointikohta (mob), λ :n kohesiivinen kohta (cos) ja plasmidin stabiilin inheritanssin partioalue (par). B on *BamHI*, E on *EcoRI*, H on *HindIII*, P on *PstI*, S on *SaII*, Sm on *SmaI*, oriV on replikaation aloituskohta, Sp^r on spektinomysiiniresistenssi ja Sm^r on streptomysiiniresistenssi.

30 Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajille. Tässä menetelmässä koko kasviin tai osaan siitä levitetään jota-

kin yliherkkyyssreaktion synnyttävää, ei-infektiivassa muodossa olevaa polypeptidiä tai proteiinia sellaisissa olosuhteissa, että polypeptidi tai proteiini on kosketuksessa kasvin kaikkiin soluihin tai osaan niistä.

- 5 Esillä olevan keksinnön toinen aspekti koskee taudinaiheuttajalle vastustuskykyistä kasvia, jonka solut ovat kosketuksessa jonkin ei-infektiivassa muodossa olevan, yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin kanssa.

Vielä eräs esillä olevan keksinnön aspekti koskee koostumusta kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajille. Koostumus sisältää ei-infektiivan, yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin ja jonkin kantaja-aineen.

- 10 Esillä olevassa keksinnössä käytetty yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini voi olla kovin monenlaisista patogeeneista johdettu yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini. Sellaiset polypeptidit tai proteiinit pystyvät aiheuttamaan paikallista nekroosia kasvikuudoksessa, joka joutuu kosketukseen reaktion synnyttävän taudinaiheuttajan kanssa. Edullisia patogeeneja ovat *Erwinia amylo-*
 15 *vora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* tai niiden seokset.

Esillä olevan keksinnön tarkoituksiin yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin ei-infektiivat muodot pystyvät synnyttämään tautia aiheuttamatta yliherkkyyssreaktion kasvissa, jonka kanssa polypeptidi tai proteiini on kosketuksessa.

- 20 Tämä voidaan saada aikaan eri tavoilla, joita ovat: 1) eristetyn yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin käyttäminen; 2) bakteerien, jotka eivät aiheuta tautia ja jotka on muunnettu yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia koodaavilla geeneillä, käyttäminen; ja 3) bakteerien, jotka aiheuttavat tautia joissakin kasvilajeissa (mutta ei niissä, joihin sitä käytetään) ja jotka sisältävät
 25 luonnostaan yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin, käyttäminen.

Esillä olevan keksinnön eräässä toteutusmuodossa yliherkkyyssreaktion synnyttävät polypeptidit tai proteiinit voidaan eristää vastaavista organismeistaan ja levittää niitä sitten kasveihin. Sellaiset eristysmenetelmät ovat hyvin tunnettuja, kuten kuvataan
 30 artikkelissa Arlat, M., F. Van Gijsegem, J.C. Huet, J.C. Pemollet ja C.A. Boucher: "PopA1, a Protein which Includes a Hypersensitive-like Response in Specific Petunia Genotypes is Secreted via the Hrp Pathway of *Pseudomonas solanacearum*", EMBO J. 13:543-553 (1994); He, S.Y., H.C. Huang ja A. Collmer: "*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin_{PSS}: a Protein that is Secreted via the Hrp Pathway and

Elicits the Hypersensitive Response in Plants", *Cell* 73:1255-1266 (1993); ja Wei, Z.-M., R.J. Laby, C.H. Zumoff, D.W. Bauer, S.-Y. He, A. Collmer ja S.V. Beer: "Harpin Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora*", *Science* 257:85-88 (1992), jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuina. Katso myös käsiteltävänä olevat US-patenttihakemukset nro 08/200 024 ja 08/062 024, jotka sisällytetään tähän viitejulkaisuina. Esillä olevan keksinnön mukaiset eristetyt yliherkkyyssreaktion synnyttävät polypeptidit tai proteiinit tuotetaan kuitenkin edullisesti yhdistelmä-DNA-tekniikalla ja puhdistetaan tuonnempana selitetyllä tavalla.

- 10 Esillä olevan keksinnön eräässä toisessa toteutusmuodossa tämän keksinnön mukais-
ta yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia voidaan levittää kas-
veihin käyttämällä bakteereja, jotka sisältävät yliherkkyyssreaktion synnyttävää poly-
peptidiä tai proteiinia koodaavia geenejä. Sellaisten bakteerien tulee pystyä erittä-
mään tai tuottamaan polypeptidiä tai proteiinia siten, että aiheuttaja pääsee kosket-
15 tamaan kasvisoluja. Näissä toteutusmuodoissa bakteerit tuottavat yliherkkyyssreakti-
on synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia *in planta* tai juuri ennen bakteerien vie-
mistä kasveihin.

Esillä olevan keksinnön mukaisen bakteerien käyttötavan eräässä toteutusmuodossa
bakteerit eivät aiheuta tautia ja ne on muunnettu (esimerkiksi yhdistelmä-DNA-
20 tekniikalla) geeneillä, jotka koodaavat yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä
tai proteiinia. Esimerkiksi *E. colia*, joka ei aikaansaa yliherkkyyssreaktiota kasveissa,
voidaan muuntaa geeneillä, jotka koodaavat jotakin yliherkkyyssreaktion synnyttävää
polypeptidiä tai proteiinia, ja levittää sitä sitten kasveihin. Muitakin (kuin *E. coli*)
bakteerilajeja voidaan käyttää esillä olevan keksinnön tässä toteutusmuodossa.

- 25 Esillä olevan keksinnön mukaisen bakteerien käyttötavan eräässä toisessa toteutus-
muodossa bakteerit eivät aiheuta tautia ja sisältävät luontaisesti geenin, joka koodaa
jotakin yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia. Esimerkkejä
sellaisista bakteereista mainittiin edellä. Tässä toteutusmuodossa näitä bakteereja
käytetään kuitenkin kasveihin, jotka eivät ole alttiita bakteerien kantamalle taudille.
30 Esimerkiksi *Erwinia amylovora* aiheuttaa tautia omenassa tai päärynässä, mutta ei
tomaatissa. Sellaisten bakteerit synnyttävät kuitenkin yliherkkyyssreaktion tomaatissa.
Niinpä esillä olevan keksinnön tämän toteutusmuodon mukaan *Erwinia amylovora*
voidaan käyttää tomaattiin vastustuskyvyn aikaansaamiseksi patogeenille aiheutta-
matta tautia tuossa lajissa.

Erwinia chrysanthemista johdetulla yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 1 seuraavasti:

Met	Gln	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	His	Ile	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Val	Ser	1	5	10	15
Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	20	25	30	
Leu	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Ser	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Leu	Thr	35	40	45	
Ser	Ala	Leu	Thr	Ser	Met	Met	Phe	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Gln	Gly	Leu	50	55	60	
Gly	Ala	Ser	Ser	Lys	Gly	Leu	Gly	Met	Ser	Asn	Gln	Leu	Gly	Gln	Ser	65	70	75	80
Phe	Gly	Asn	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Lys	85	90	95	
Ser	Gly	Gly	Asp	Ala	Leu	Ser	Lys	Met	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu	Asp	Asp	100	105	110	
Leu	Leu	Gly	His	Asp	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Thr	Asn	Gln	Ser	Asn	Gln	115	120	125	
Leu	Ala	Asn	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Ser	Gln	Met	Thr	Gln	Gly	Asn	Met	130	135	140	
Asn	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Asn	Ala	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Gly	145	150	155	160
Asn	Gly	Leu	Gly	Gln	Ser	Met	Ser	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Leu	Gly	165	170	175	
Ala	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Asn	Gln	Leu	180	185	190	
Gly	Asn	Ala	Ile	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	195	200	205	
Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	His	Val	Asp	Gly	Asn	Asn	Arg	His	Phe	Val	210	215	220	
Asp	Lys	Glu	Asp	Arg	Gly	Met	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Gln	Phe	Met	Asp	225	230	235	240
Gln	Tyr	Pro	Glu	Ile	Phe	Gly	Lys	Pro	Glu	Tyr	Gln	Lys	Asp	Gly	Trp	245	250	255	
Ser	Ser	Pro	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Ser	Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	Lys	260	265	270	
Pro	Asp	Asp	Asp	Gly	Met	Thr	Gly	Ala	Ser	Met	Asp	Lys	Phe	Arg	Gln	275	280	285	
Ala	Met	Gly	Met	Ile	Lys	Ser	Ala	Val	Ala	Gly	Asp	Thr	Gly	Asn	Thr	290	295	300	

Asn Leu Asn Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Ser Leu Gly Ile Asp Ala
 305 310 315 320
 Ala Val Val Gly Asp Lys Ile Ala Asn Met Ser Leu Gly Lys Leu Ala
 325 330 335
 Asn Ala

- 5 Tämän yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin molekyylipaino on 34 kDa, se on lämmönkestävä, sen glysiinipitoisuus on suurempi kuin 16 % eikä se sisällä olennaisesti kysteiiniä. *Erwinia chrysanthemista* johdettu yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia koodaa DNA-molekyyli, jolla on nukleotidisekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifointinumeroa 2 seuraavasti:

CGATTTTACC	CGGGTGAACG	TGCTATGACC	GACAGCATCA	CGGTATTCTGA	CACCGTTACG	60
GCGTTTATGG	CCGCGATGAA	CCGGCATCAG	GCGGCGCGCT	GGTCGCCGCA	ATCCGGCGTC	120
GATCTGGTAT	TTCAGTTTGG	GGACACCGGG	CGTGAACCTCA	TGATGCAGAT	TCAGCCGGGG	180
CAGCAATATC	CCGGCATGTT	GCGCACGCTG	CTCGCTCGTC	GTTATCAGCA	GGCGGCAGAG	240
TGCGATGGCT	GCCATCTGTG	CCTGAACGGC	AGCGATGTAT	TGATCCTCTG	GTGGCCGCTG	300
CCGTCGGATC	CCGGCAGTTA	TCCGCAGGTG	ATCGAACGTT	TGTTTGAACCT	GGCGGGAATG	360
ACGTTGCCGT	CGCTATCCAT	AGCACCGACG	GCGCGTCCGC	AGACAGGGAA	CGGACGCGCC	420
CGATCATTAA	GATAAAGGCG	GCTTTTTTTTA	TTGCAAAACG	GTAACGGTGA	GGAACCGTTT	480
CACCGTCGGC	GTCACCTCAGT	AACAAGTATC	CATCATGATG	CCTACATCGG	GATCGGCGTG	540
GGCATCCGTT	GCAGATACTT	TTGCGAACAC	CTGACATGAA	TGAGGAAACG	AAATTATGCA	600
AATTACGATC	AAAGCGCACA	TCGGCGGTGA	TTTGGGCGTC	TCCGGTCTGG	GGCTGGGTGC	660
TCAGGGACTG	AAAGGACTGA	ATTCCGCGGC	TTCATCGCTG	GGTTCCAGCG	TGGATAAACT	720
GAGCAGCACC	ATCGATAAGT	TGACCTCCGC	GCTGACTTCG	ATGATGTTTG	GCGGCGCGCT	780
GGCGCAGGGG	CTGGGCGCCA	GCTCGAAGGG	GCTGGGGATG	AGCAATCAAC	TGGGCCAGTC	840
TTTCGGCAAT	GGCGCGCAGG	GTGCGAGCAA	CCTGCTATCC	GTACCGAAAT	CCGGCGGCGA	900

TGCGTTGTCA AAAATGTTTG ATAAAGCGCT GGACGATCTG CTGGGTCATG ACACCGTGAC	960
CAAGCTGACT AACCAGAGCA ACCAACTGGC TAATTCAATG CTGAACGCCA GCCAGATGAC	1020
CCAGGGTAAT ATGAATGCGT TCGGCAGCGG TGTGAACAAC GCACTGTCGT CCATTCTCGG	1080
CAACGGTCTC GGCCAGTCGA TGAGTGGCTT CTCTCAGCCT TCTCTGGGGG CAGGCGGCTT	1140
GCAGGGCCTG AGCGGCGCGG GTGCATTCAA CCAGTTGGGT AATGCCATCG GCATGGGCGT	1200
GGGGCAGAAT GCTGCGCTGA GTGCGTTGAG TAACGTCAGC ACCCACGTAG ACGGTAACAA	1260
CCGCCACTTT GTAGATAAAG AAGATCGCGG CATGGCGAAA GAGATCGGCC AGTTTATGGA	1320
TCAGTATCCG GAAATATTCG GTAAACCGGA ATACCAGAAA GATGGCTGGA GTTCGCCGAA	1380
GACGGACGAC AAATCCTGGG CTAAAGCGCT GAGTAAACCG GATGATGACG GTATGACCGG	1440
CGCCAGCATG GACAAATTCC GTCAGGCGAT GGGTATGATC AAAAGCGCGG TGGCGGGTGA	1500
TACCGGCAAT ACCAACCTGA ACCTGCGTGG CGCGGGCGGT GCATCGCTGG GTATCGATGC	1560
GGCTGTCTG GCGGATAAAA TAGCCAACAT GTCGCTGGGT AAGCTGGCCA ACGCCTGATA	1620
ATCTGTCTG GCCTGATAAA GCGGAAACGA AAAAAGAGAC GGGGAAGCCT GTCTCTTTTC	1680
TTATTATGCG GTTTATGCGG TTACCTGGAC CGGTTAATCA TCGTCATCGA TCTGGTACAA	1740
ACGCACATTT TCCCGTTCAT TCGCGTCGTT ACGCGCCACA ATCGCGATGG CATCTTCCTC	1800
GTCGCTCAGA TTGCGCGGCT GATGGGGAAC GCCGGGTGGA ATATAGAGAA ACTCGCCGGC	1860
CAGATGGAGA CACGTCTGCG ATAAATCTGT GCCGTAACGT GTTTCTATCC GCCCCTTTAG	1920
CAGATAGATT GCGGTTTCGT AATCAACATG GTAATGCGGT TCCGCCTGTG CGCCGGCCGG	1980
GATCACCACA ATATTCATAG AAAGCTGTCT TGCACCTACC GTATCGCGGG AGATACCGAC	2040
AAAATAGGGC AGTTTTTGCG TGGTATCCGT GGGGTGTTCC GGCCTGACAA TCTTGAGTTG	2100
GTTCGTCATC ATCTTTCTCC ATCTGGGCGA CCTGATCGGT T	2141

Erwinia amylovorasta johdetulla yliherkkyysreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 3 seuraavasti:

Met	Ser	Leu	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Met	Gln	Ile	Ser	1	5	10	15
Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Ser	Arg	Gln	20	25	30	
Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Asn	35	40	45	
Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Asn	Gln	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Thr	Gly	Met	Met	50	55	60	
Met	Met	Met	Ser	Met	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Met	Gly	Gly	Gly	Leu	65	70	75	80
Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Asn	Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Glu	85	90	95	
Gly	Leu	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Asn	Thr	100	105	110	
Leu	Gly	Ser	Lys	Gly	Gly	Asn	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Pro	115	120	125	
Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Ser	Thr	Ser	Gln	Asn	Asp	Asp	Ser	130	135	140	
Thr	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Met	Gln	Gln	145	150	155	160
Leu	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Glu	Ile	Met	Gln	Ser	Leu	Phe	Gly	Asp	Gly	165	170	175	
Gln	Asp	Gly	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Gln	Pro	Thr	Glu	180	185	190	
Gly	Glu	Gln	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	195	200	205	
Leu	Met	Gly	Asn	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	210	215	220	
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Asn	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	Asp	Tyr	Gln	Gln	245	250	255	
Leu	Gly	Asn	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Lys	Ala	Gly	Ile	Gln	260	265	270	
Ala	Leu	Asn	Asp	Ile	Gly	Thr	His	Arg	His	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Phe	275	280	285	
Val	Asn	Lys	Gly	Asp	Arg	Ala	Met	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Gln	Phe	Met	290	295	300	
Asp	Gln	Tyr	Pro	Glu	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Gln	Tyr	Gln	Lys	Gly	Pro	305	310	315	320
Gly	Gln	Glu	Val	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Ser	Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser	325	330	335	

Lys Pro Asp Asp Gly Met Thr Pro Ala Ser Met Glu Gln Phe Asn
 340 345 350
 Lys Ala Lys Gly Met Ile Lys Arg Pro Met Ala Gly Asp Thr Gly Asn
 355 360 365
 Gly Asn Leu Gln His Ala Val Pro Val Val Leu Arg Trp Val Leu Met
 370 375 380
 Pro
 385

5

Tämän yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin molekyylipaino on noin 37 kDa, sen pI on suunnilleen 4,3 ja se kestää 100°C:n lämpötilaa ainakin 10 minuuttia. Tässä yliherkkyyssreaktion synnyttävässä polypeptidissä tai proteiinissa ei ole olennaisesti kysteiniä. Yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia, joka on johdettu *Erwinia amylovorasta*, kuvataan täydellisemmin artikkelissa Wei, Z.-M., R.J. Laby, C.H. Zumoff, D.W. Bauer, S.-Y. He, A. Collmer ja S.V. Beer: "Harpin, Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora*", *Science* 257:85-88 (1992), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna. Tätä polypeptidiä tai proteiinia koodaavalla DNA-molekyyllillä on nukleotidisekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifointinumeroa 4 seuraavasti:

15

ATGAGTCTGA	ATACAAGTGG	GCTGGGAGCG	TCAACGATGC	AAATTTCTAT	CGGCGGTGCG	60
GGCGGAAATA	ACGGGTGCT	GGGTACCAGT	CGCCAGAATG	CTGGGTTGGG	TGGCAATTCT	120
GCACTGGGGC	TGGGCGGCGG	TAATCAAAAT	GATACCGTCA	ATCAGCTGGC	TGGCTTACTC	180
ACCGGCATGA	TGATGATGAT	GAGCATGATG	GGCGGTGGTG	GGCTGATGGG	CGGTGGCTTA	240
GGCGGTGGCT	TAGGTAATGG	CTTGGGTGGC	TCAGGTGGCC	TGGGCGAAGG	ACTGTGGAAC	300
GCGCTGAACG	ATATGTTAGG	CGGTTGCTG	AACACGCTGG	GCTCGAAAGG	CGGCAACAAT	360
ACCACTTCAA	CAACAAATTC	CCCGCTGGAC	CAGGCGCTGG	GTATTAATC	AACGTCCCAA	420
AACGACGATT	CCACCTCCGG	CACAGATTCC	ACCTCAGACT	CCAGCGACCC	GATGCAGCAG	480
CTGCTGAAGA	TGTTGAGCGA	GATAATGCAA	AGCCTGTTTG	GTGATGGGCA	AGATGGCACC	540
CAGGGCAGTT	CCTCTGGGGG	CAAGCAGCCG	ACCGAAGGCG	AGCAGAACGC	CTATAAAAAA	600
GGAGTCACTG	ATGCGCTGTC	GGGCCTGATG	GGTAATGGTC	TGAGCCAGCT	CCTTGGCAAC	660
GGGGGACTGG	GAGGTGGTCA	GGGCGGTAAT	GCTGGCACGG	GTCTTGACGG	TTCGTCGCTG	720
GGCGGCAAAG	GGCTGCAAAA	CCTGAGCGGG	CCGGTGGACT	ACCAGCAGTT	AGGTAACGCC	780
GTGGGTACCG	GTATCGGTAT	GAAAGCGGGC	ATTCAGGCGC	TGAATGATAT	CGGTACGCAC	840
AGGCACAGTT	CAACCCGTTT	TTTCGTCAAT	AAAGGCGATC	GGGCGATGGC	GAAGGAAATC	900

GGTCAGTTCA TGGACCAGTA TCCTGAGGTG TTTGGCAAGC CGCAGTACCA GAAAGGCCCG 960
 GGTCAGGAGG TGAAAACCGA TGACAAATCA TGGGCAAAAG CACTGAGCAA GCCAGATGAC 1020
 GACGGAATGA CACCAGCCAG TATGGAGCAG TTCAACAAAG CCAAGGGCAT GATCAAAAGG 1080
 CCCATGGCGG GTGATACCGG CAACGGCAAC CTGCAGCACG CGGTGCCGGT GGTTCCTTCGC 1140
 TGGGTATTGA TGCCATGA 1158

5

Pseudomonas syringaesta johdetulla yliherkkyysreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 5 seuraavasti:

Met Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Ser Ser Leu Gln Thr Pro Ala Met
 1 5 10 15
 Ala Leu Val Leu Val Arg Pro Glu Ala Glu Thr Thr Gly Ser Thr Ser
 20 25 30
 Ser Lys Ala Leu Gln Glu Val Val Val Lys Leu Ala Glu Glu Leu Met
 35 40 45
 Arg Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ser Ser Pro Leu Gly Lys Leu Leu Ala
 50 55 60
 Lys Ser Met Ala Ala Asp Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ile Glu Asp Val
 65 70 75 80
 Ile Ala Ala Leu Asp Lys Leu Ile His Glu Lys Leu Gly Asp Asn Phe
 85 90 95
 Gly Ala Ser Ala Asp Ser Ala Ser Gly Thr Gly Gln Gln Asp Leu Met
 100 105 110
 Thr Gln Val Leu Asn Gly Leu Ala Lys Ser Met Leu Asp Asp Leu Leu
 115 120 125
 Thr Lys Gln Asp Gly Gly Thr Ser Phe Ser Glu Asp Asp Met Pro Met
 130 135 140
 Leu Asn Lys Ile Ala Gln Phe Met Asp Asp Asn Pro Ala Gln Phe Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Ser Gly Ser Trp Val Asn Glu Leu Lys Glu Asp Asn Phe
 165 170 175
 Leu Asp Gly Asp Glu Thr Ala Ala Phe Arg Ser Ala Leu Asp Ile Ile
 180 185 190
 Gly Gln Gln Leu Gly Asn Gln Gln Ser Asp Ala Gly Ser Leu Ala Gly
 195 200 205
 Thr Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Ser Ser Phe Ser Asn Asn Ser Ser
 210 215 220
 Val Met Gly Asp Pro Leu Ile Asp Ala Asn Thr Gly Pro Gly Asp Ser
 225 230 235 240

5

10

15

TCGGTATTGG CCGGTGGTGG ACTGGGCACA CCCGTAAACA CCCC GCAGAC CCGTACGTCG 840
 GCGAATGGCG GACAGTCCGC TCAGGATCTT GATCAGTTGC TGGGCGGCTT GCTGCTCAAG 900
 GGCCTGGAGG CAACGCTCAA GGATGCCGGG CAAACAGGCA CCGACGTGCA GTCGAGCGCT 960
 GCGCAAATCG CCACCTTGCT GGTCAGTACG CTGCTGCAAG GCACCCGCAA TCAGGCTGCA 1020

5

*Pseudomonas solanacearum*ista johdetulla yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 7 seuraavasti:

Met Ser Val Gly Asn Ile Gln Ser Pro Ser Asn Leu Pro Gly Leu Gln 1 5 10 15
 Asn Leu Asn Leu Asn Thr Asn Thr Asn Ser Gln Gln Ser Gly Gln Ser 20 25 30
 Val Gln Asp Leu Ile Lys Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Ile Ile 35 40 45
 Ala Ala Leu Val Gln Lys Ala Ala Gln Ser Ala Gly Gly Asn Thr Gly 50 55 60
 Asn Thr Gly Asn Ala Pro Ala Lys Asp Gly Asn Ala Asn Ala Gly Ala 65 70 75 80
 Asn Asp Pro Ser Lys Asn Asp Pro Ser Lys Ser Gln Ala Pro Gln Ser 85 90 95
 Ala Asn Lys Thr Gly Asn Val Asp Asp Ala Asn Asn Gln Asp Pro Met 100 105 110
 Gln Ala Leu Met Gln Leu Leu Glu Asp Leu Val Lys Leu Leu Lys Ala 115 120 125
 Ala Leu His Met Gln Gln Pro Gly Gly Asn Asp Lys Gly Asn Gly Val 130 135 140
 Gly Gly Ala Asn Gly Ala Lys Gly Ala Gly Gly Gln Gly Gly Leu Ala 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Gln Glu Ile Glu Gln Ile Leu Ala Gln Leu Gly Gly Gly 165 170 175
 Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Val Gly Gly Ala Gly Gly 180 185 190
 Ala Asp Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asn Gly Ala 195 200 205
 Asp Gly Gly Asn Gly Val Asn Gly Asn Gln Ala Asn Gly Pro Gln Asn 210 215 220
 Ala Gly Asp Val Asn Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gly Ser Glu Asp 225 230 235 240

Gln Gly Gly Leu Thr Gly Val Leu Gln Lys Leu Met Lys Ile Leu Asn
 245 250 255
 Ala Leu Val Gln Met Met Gln Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gly Asn Gln
 260 265 270
 Ala Gln Gly Gly Ser Lys Gly Ala Gly Asn Ala Ser Pro Ala Ser Gly
 275 280 285
 5 Ala Asn Pro Gly Ala Asn Gln Pro Gly Ser Ala Asp Asp Gln Ser Ser
 290 295 300
 Gly Gln Asn Asn Leu Gln Ser Gln Ile Met Asp Val Val Lys Glu Val
 305 310 315 320
 Val Gln Ile Leu Gln Gln Met Leu Ala Ala Gln Asn Gly Gly Ser Gln
 325 330 335
 Gln Ser Thr Ser Thr Gln Pro Met
 340

- 10 Sitä koodaa DNA-molekyyli, jolla on nukleotidisekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 8 seuraavasti:

ATGTCAGTCG GAAACATCCA GAGCCCGTCG AACCTCCCGG GTCTGCAGAA CCTGAACCTC 60
 AACACCAACA CCAACAGCCA GCAATCGGGC CAGTCCGTGC AAGACCTGAT CAAGCAGGTC 120
 GAGAAGGACA TCCTCAACAT CATCGCAGCC CTCGTGCAGA AGGCCGCACA GTCGGCGGGC 180
 GGCAACACCG GTAACACCGG CAACGCGCCG GCGAAGGACG GCAATGCCAA CGCGGGCGCC 240
 15 AACGACCCGA GCAAGAACGA CCCGAGCAAG AGCCAGGCTC CGCAGTCGGC CAACAAGACC 300
 GGCAACGTCG ACGACGCCAA CAACCAGGAT CCGATGCAAG CGCTGATGCA GCTGCTGGAA 360
 GACCTGGTGA AGCTGCTGAA GCGGGCCCTG CACATGCAGC AGCCCGGCGG CAATGACAAG 420
 GGCAACGGCG TGGGCGGTGC CAACGGCGCC AAGGGTGCCG GCGGCCAGGG CGGCCTGGCC 480
 GAAGCGCTGC AGGAGATCGA GCAGATCCTC GCCCAGCTCG GCGGCGGCGG TGCTGGCGCC 540
 GCGGCGGCGG GTGGCGGTGT CGGCGGTGCT GGTGGCGCGG ATGGCGGCTC CGGTGCGGGT 600
 GGCGCAGGCG GTGCGAACGG CGCCGACGGC GGCAATGGCG TGAACGGCAA CCAGGCGAAC 660
 GGCCCGCAGA ACGCAGGCGA TGTCAACGGT GCCAACGGCG CGGATGACGG CAGCGAAGAC 720
 20 CAGGGCGGCC TCACCGGCGT GCTGCAAAAG CTGATGAAGA TCCTGAACGC GCTGGTGCAG 780
 ATGATGCAGC AAGGCGGCCT CGGCGGCGGC AACCAGGCGC AGGGCGGCTC GAAGGGTGCC 840
 GGCAACGCCT CGCCGGCTTC CGGCGCGAAC CCGGGCGCGA ACCAGCCCGG TTCGGCGGAT 900
 GATCAATCGT CCGGCCAGAA CAATCTGCAA TCCCAGATCA TGGATGTGGT GAAGGAGGTC 960
 GTCCAGATCC TGCAGCAGAT GCTGGCGGCG CAGAACGGCG GCAGCCAGCA GTCCACCTCG 1020
 ACGCAGCCGA TGTA 1035

5

Organismista *Xanthomonas campestris* pv. glysiini johdetulla yliherkkyysreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi, joka vastaa sekvenssin identifiointinumeroa 9 seuraavasti:

10

15

20

25

30

sitten testata sen reaktion synnyttämisaktiivisuuden kannalta tuonnempana kuvatun menettelytavan mukaisesti.

- Vaihtoehtoisesti fragmentteja jostakin yliherkkyyssreaktion synnyttävästä proteiinista voidaan tuottaa digestoimalla täysipituista yliherkkyyssreaktion synnyttävää proteiinia proteolyytisillä entsyymeillä kuten kymotrypsiinillä tai *Staphylococcus*-proteinaasi A:lla tai trypsiinillä. Erilaiset proteolyytiset entsyymit todennäköisesti pilkkovat yliherkkyyssreaktion synnyttäviä proteiineja eri kohdista kysymyksessä olevan proteiinin aminohapposekvenssistä riippuen. Jotkut proteolyysistä saatavista fragmenteista voivat olla aktiivisia resistenssin synnyttäjiä.
- 10 Eräässä toisessa lähestymistavassa, joka perustuu proteiinin primaarisen rakenteen tuntemukseen, reaktion synnyttävän proteiinin geenin fragmentteja voidaan syntetisoida käyttämällä PCR-menetelmää yhdessä spesifisten alukesarjojen kanssa, jotka on valittu edustamaan proteiinin kysymykseen tulevia osia. Ne voitaisiin sitten kloonata johonkin sopivaan vektoriin katkaistun peptidin tai proteiinin monistamiseksi ja
- 15 ilmentämiseksi.

- Variantteja voidaan myös (tai vaihtoehtoisesti) muuntaa esimerkiksi poistamalla tai lisäämällä aminohappoja, joilla on mahdollisimman vähäinen vaikutus polypeptidin ominaisuuksiin, sekundaariseen rakenteeseen ja hydropaattisuuteen. Polypeptidi voidaan esimerkiksi konjugoida proteiinin N-terminaalisessa päässä johonkin signaalisekvenssiin (tai ohjaajasekvenssiin), joka translaation aikana tai translaation jälkeen ohjaa proteiinin siirtymistä. Polypeptidi voidaan myös konjugoida johonkin ohjaussekvenssiin tai muuhun sekvenssiin polypeptidin syntetisoinnin, puhdistuksen tai identifioinnin helpottamiseksi.
- 20

- Esillä olevan keksinnön mukainen proteiini tai polypeptidi tuotetaan edullisesti puhdistetussa muodossa (edullisesti vähintään noin 80-prosenttisen, vielä edullisemmin 90-prosenttisen puhtaana) konventionaalisilla menetelmillä. Tyypillisesti esillä olevan keksinnön mukainen proteiini tai polypeptidi sekretoidaan yhdistelmä-*E. coli*n kasvatusliuokseen. Proteiinin eristämiseksi jotakin yhdistelmä-plasmidia kantava *E. coli* -isäntäsolu monistetaan, homogenoidaan ja homogenaatti sentrifugoidaan bakteerijäämien poistamiseksi. Sitten supernatantti saostetaan sekventiaalisesti ammoniumsulfaatilla. Esillä olevan keksinnön mukaisen polypeptidin tai proteiinin sisältävälle fraktiolle suoritetaan geelisuodatus jossakin huokoskooltaan sopivassa dekstraanissa tai polyakryyliamidikolonissa proteiinien erottamiseksi. Tarpeen vaatiessa proteiinifraktio voidaan vielä puhdistaa HPLC:llä.
- 25
- 30

DNA-molekyyli, joka koodaa yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia, voidaan viedä soluihin käyttämällä konventionaalista yhdistelmä-DNA-tekniikkaa. Yleensä siinä viedään DNA-molekyyli johonkin ilmentämissysteemiin, jonka kanssa DNA-molekyyli on heterologinen (s.o. ei normaalisti läsnä). Heterologinen DNA-molekyyli istutetaan ilmentämissysteemiin eli vektoriin oikeassa orientaatioissa ja oikeassa lukukehyksessä. Vektori sisältää tarpeelliset ainekset insertoitujen proteiinia koodaavien sekvenssien transskriptiota ja translaatiota varten.

Cohenin ja Boyerin US-patentti nro 4 237 224, joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna, kuvaa yhdistelmäplasmidien muodossa olevien ilmentämissysteemien tuottamista käyttämällä restriktioentsyymipilkontaa ja ligaatiota DNA-ligaasilla. Sitten nämä yhdistelmäplasmidit istutetaan transformaation avulla yksisoluviljelmiin, joiina voivat olla kudosisviljelmässä kasvatetut prokaryootiset organismit ja eukaryootiset solut, ja monistetaan niissä.

Yhdistelmägenejä voidaan istuttaa myös viruksiin, kuten vacciniaviruksiin. Yhdistelmäviruksia voidaan kehittää leikkaamalla plasmideja soluiksi, jotka virus on infektoinut.

Sopivia vektoreita ovat, rajoittumatta kuitenkaan niihin, seuraavat virusvektorit, kuten lambdavektorisysteemi gt11, gt WES.tB, Charon 4, ja plasmidivektorit, kuten pBR322, pBR325, pACYC177, pACYC184, pUC8, pUC9, pUC18, pUC19, pR290, pKC37, pKC101, SV 40, pBluescript II SK +/- tai KS +/- [katso "Stratagene Cloning Systems" Catalog (1993) Stratagenelta, La Jolla, Kalifornia, joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna], pQE, pIH821, pGEX, pET-sarja [katso F.W. Studier *et al.*, "Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes", Gene Expression Technology vol. 185 (1990), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna], ja mitkä tahansa niiden johdokset. Yhdistelmä-molekyyliä voidaan istuttaa soluihin transformaation, erityisesti transduktion, konjugoinnin, mobilisoinnin tai elektroporaation avulla. DNA-sekvenssit kloonataan vektoriin käyttäen alalla tavallisia kloonausmenetelmiä, Maniatisin *et al.* kuvauksen mukaisesti Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Laboratory, Cold Springs Harbor, New York (1982), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna.

Proteiinia koodaavan sekvenssin tai sekvenssien ilmentämiseen voidaan käyttää erilaisia isäntä-vektorisysteemejä. Vektorisysteemin tulee ensi sijaissa olla yhteensopiva käytetyn isäntäsolun kanssa. Isäntä-vektorisysteemejä ovat seuraavat, rajoittumatta kuitenkaan niihin: bakteerit, jotka on transformoitu bakteriofagi-DNA:lla, plasmidi-DNA:lla tai kosmidi-DNA:lla, mikro-organismit, kuten esimerkiksi hiiva-

vektoreita sisältävä hiiva, nisäkässolusysteemit, jotka on infektoitu viruksella (esimerkiksi vacciniaviruksella, adenoviruksella jne.), hyönteissolusysteemit, jotka on infektoitu viruksella (esimerkiksi baculoviruksella), ja kasvisolusysteemit, jotka on infektoitu bakteereilla. Näiden vektoreiden ilmentymiselementit vaihtelevat voimakkuudeltaan ja spesifisyyksiltään. Käytetystä isäntä-vektorisysteemistä riippuen voidaan käyttää kaikenlaisia sopivia transskriptio- ja translaatioelementtejä.

Eri geneettiset signaalit ja prosessitapahtumat ohjaavat geeniekspressiota (esimerkiksi DNA-transskriptiota ja lähetti-RNA(mRNA)-translaatiota).

DNA:n transskriptio on riippuvainen jonkin promoottorin läsnäolosta, jona on jokin DNA-sekvenssi, joka ohjaa RNA-polymeraasin sitoutumista ja sillä tavoin edistää mRNA-synteesiä. Eukaryoottisten promoottorien DNA-sekvenssit ovat erilaisia kuin prokaryoottisten promoottorien. Lisäksi eukaryoottisia promoottoreita ja niihin liittyviä geneettisiä signaaleja ei ehkä tunnisteta tai ne eivät toimi jossakin prokaryoottisessa systeemissä ja edelleen, prokaryoottisia promoottoreita ei tunnisteta tai ne eivät toimi eukaryoottisissa systeemeissä.

Samaten mRNA:n translaatio prokaryooteissa riippuu oikeiden prokaryoottisten signaalien läsnäolosta, jotka eroavat eukaryoottisista signaaleista. mRNA:n tehokas translaatio prokaryooteissa vaatii, että mRNA:ssa on ribosomin sitoutumiskohta, jota nimitetään Shine-Dalgarno("SD")-sekvenssiksi. Tämä sekvenssi on mRNA:n lyhyt nukleotidisekvenssi, joka sijaitsee ennen aloituskodonia, tavallisesti AUG, joka koodaa proteiinin aminotermiinalista metioniinia. SD-sekvenssit ovat komplementaarisia 16S rRNA:n (ribosomi-RNA) 3'-päälle ja luultavasti edistävät mRNA:n sitoutumista ribosomeihin kahdentumalla rRNA:n kanssa, jotta ribosomi pääsee sitoutumaan oikeaan paikkaan. Koskien katsausta geeniekspression maksimoinnista katso Roberts ja Lauer, Methods in Enzymology, 68:473 (1979), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna.

Promoottorit vaihtelevat "voimakkuudeltaan" (s.o. kyvyltään edistää transskriptiota). Kloonatun geenin ilmentämiseksi on suotavaa käyttää voimakkaita promoottoreita, jotta saadaan aikaan korkean tason transskriptio ja siten geenin hyvä ilmentyminen. Käytetystä isäntäsolusysteemistä riippuen voidaan käyttää monenlaisia sopivia promoottoreita. Esimerkiksi kun kloonataan *E. coli*a, sen bakteriofageja tai plasmideja, voidaan käyttää sellaisia promoottoreita kuten T7-faagipromoottoria, *lac*-promoottoria, *trp*-promoottoria, *recA*-promoottoria, ribosomi-RNA-promoottoria, kolifagi-lambdan P_R - ja P_L -promoottoreita ynnä muita, mukaan lukien mutta rajoittumatta näihin: *lacUV5*, *ompF*, *bla*, *lpp*, ja vastaavat, viereisten DNA-segmenttien

korkean tason transskription ohjaamiseksi. Lisäksi insertoidun geenin transskription aikaansaamiseksi voidaan käyttää jotakin hybridi-*trp-lacUV5(tac)*-promoottoria tai muita *E. coli* -promoottoreita, jotka on tuotettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla tai muilla synteettisillä DNA-menetelmillä.

- 5 Voidaan valita sellaisia bakteeri-isäntäkantoja ja ilmentämisvektoreita, jotka estävät promoottorin toiminnan, mikäli sitä ei varta vasten indusoida. Joissakin operaatioissa spesifisten indusoidijien lisääminen on tarpeen insertoidun DNA:n transskriptioiksi tehokkaasti. Esimerkiksi *lac*-operoni indusoidaan lisäämällä laktoosia tai IPTG:tä (isopropyylitio-beta-D-galaktosidi). Erilaisia muita operoneja, kuten esi-
- 10 merkiksi *trp*:tä, *pro*:ta jne. ohjataan eri tavoin.

- Spesifejä aloitussignaaleja tarvitaan myös tehokkaan geenitransskription ja -translation aikaansaamiseksi prokaryoottisissa soluissa. Nämä transskription ja translaation aloitussignaalit voivat vaihdella "voimakkuudeltaan" geenispesifin lähetti-RNA:n ja, vastaavasti, syntetisoidun proteiinin määrällä mitattuna. Jonkin pro-
- 15 moottorin sisältävä DNA-ilmentämisvektori voi sisältää myös minkä tahansa yhdistelmän erilaisia "voimakkaita" transskription ja/tai translaation aloitussignaaleja. Esimerkiksi tehokas translaatio *E. coli*ssa vaatii noin 7 - 9 emäksen kokoisen Shine-Dalgarno-sekvenssin (SD) 5'-päästä aloituskodoniin (ATG) ribosomin sitoutumiskohdan aikaansaamiseksi. On siis mahdollista käyttää mitä tahansa SD-ATG -yhdis-
- 20 telmää, joita isäntäsoluribosomit pystyvät käyttämään. Sellaisia yhdistelmiä ovat, rajoittumatta kuitenkaan niihin, SD-ATG -yhdistelmä kolofagi-lambdan *cro*-geenistä tai *N*-geenistä tai *E. coli* -tryptofaanin E-, D-, C-, B- tai A-geeneistä. Lisäksi voidaan käyttää mitä tahansa SD-ATG -yhdistelmää, joka on tuotettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla tai muilla menetelmillä, joissa käytetään synteettisten nukleotidien istut-
- 25 tamista.

- Kun yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia koodaava eristetty DNA-molekyylä on kloonattu johonkin ilmentämissysteemiin, se on valmis istutettavaksi isäntäsoluun. Sellainen istuttaminen voidaan toteuttaa transformaation edellä mainituilla eri muodoilla, vektori/isäntäsolusysteemistä riippuen. Sopivia isäntäsolu-
- 30 ja ovat, rajoittumatta kuitenkaan niihin, bakteerit, virukset, hiiva, nisäkässolut, hyönteissolut, kasvisolut ja vastaavat.

- Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää voidaan käyttää kovin erilaisten kasvien hoitamiseen niiden saamiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajille. Sopivia kasveja ovat kaksisirkkaiset ja yksisirkkaiset. Tarkemmin sanottuna käyttökelpoisia
- 35 viljelykasveja voivat olla: riisi, vehnä, ohra, ruis, puuvilla, auringonkukka, maapäh-

kinä, maissi, peruna, bataatti, papu, herne, sikuri, salaatti, endiivi, kaali, kukkakaali, parsakaali, rapsi, retiisi, pinaatti, sipuli, valkosipuli, munakoiso, paprika, selleri, porkkana, squash, kurpitsa, kesäkurpitsa, kurkku, omena, päärynä, meloni, mansikka, viinirypäle, vadelma, ananas, soijapapu, tupakka, tomaatti, durra ja sokeriruoko.

- 5 Esimerkkejä sopivista koristekasveista ovat: *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonia, joulutähti, krysanteemi, neilikka ja oppineidenkukka.

Esillä olevan keksinnön mukaista menetelmää kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajille voidaan käyttää vastustuskyvyn synnyttämiseen monenlaisille patogeeneille, mukaan lukien virukset, bakteerit ja sienet.

- 10 Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan kasveja tehdä vastustuskykyisiksi *inter alia* seuraaville viruksille: tupakanmosaiikkivirus ja tomaatinmosaiikkivirus.

Esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan kasveja tehdä vastustuskykyisiksi *inter alia* seuraaville bakteereille: *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudo-*

- 15 *monas syringae* pv. *tabaci* ja *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*.

Kasveja voidaan tämän keksinnön mukaisella menetelmällä tehdä vastustuskykyisiksi *inter alia* seuraaville sienille: *Fusarium oxysporum* ja *Phytophthora infestans*.

Esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä voidaan toteuttaa erilaisilla tavoilla yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin levittämiseksi koko käsiteltävään kasviin tai osaan siitä. Yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini voidaan (mutta ei ole välttämätöntä) infiltroida kasviin. Sopivia käyttomenetelmiä ovat suurpaine- tai pienpainesumutus, ruiskutus ja lehden raaputtaminen ennen yliherkkyyssreaktion synnyttävän aineen levittämistä. Alaan perehtynyt osaa ajatella muitakin sopivia levitystapoja edellyttäen, että niillä saadaan aikaan yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin kosketus kasvin soluihin.

Yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini voidaan levittää kasveihin esillä olevan keksinnön mukaan joko yksinään tai seoksena muiden aineiden kanssa.

Eräs esillä olevan keksinnön aspekti koskee koostumusta kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi, joka koostumus sisältää jonkin yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiini ja jonkin kantaja-aineen. Sopivia kantajia ovat vesi tai vesipitoiset liuokset. Tässä toteutusmuodossa koostumus sisältää enemmän kuin 500 nM yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.

Tämä koostumus voi sisältää muita apuaineita, mukaan lukien lannoitteita, insektisidejä, fungisidejä ja niiden seoksia, vaikka se ei olekaan välttämätöntä. Sopivia lannoitteita ovat $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$. Eräs esimerkki sopivasta insektisidistä on malationi. Käyttökelpoisia fungisidejä on kaptaani.

- 5 Muita sopivia apuaineita ovat puskuriaineet, kostutusaineet ja hankausaineet. Näitä aineita voidaan käyttää helpottamaan esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän toteuttamista.

Esimerkit

10 **Esimerkki 1 – Tomaatin harpiinilla synnytetty vastustuskyky bakteeriperäiselle etelänlakastumistaudille (*Pseudomonas solanacearum*)**

Kaksiviikkoisia tomaatintaimia, joita kasvatettiin 8 x 15 cm lavoissa kasvihuoneessa, käsiteltiin seuraavasti: kutakin kuutta käsittelyä, joille annettiin tunnuksat A - F, kohti käytettiin 20 tainta, ja käsittely kuvataan alla:

- 15 (A) Noin 100 µl raakaharpiinivalmistetta [s.o. yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiini (Z-M. Wei, "Harpin, Elicitor of the Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora*", Science 257:85-88, 1992), joka sisällytetään tähän viitejulkaisuna] konsentraationa 200 µg/ml infiltroitiin kunkin taimen alimpaan varsinaiseen lehteen.

- 20 (B) Samaa harpiinivalmistetta, jota käytettiin käsittelyssä (A), sumutettiin 400 meshin karborumdumin kanssa taimien lehtipinnalle ja sitten näitä pintoja haggattiin varovasti peukalolla.

- 25 (C) *E. coli* DH5:ttä (pCPP430) (katso kuviosta 1 plasmidivektorin pCPP430 kartta) kasvatettiin LB-elatusaineessa optiseen tiheyteen $\text{OD}_{620}=0,7$. Viljelmä sentrifugoitiin ja lietettiin sitten uudestaan 5 mM:iin kaliumfosfaattipuskuria, pH 6,5. Noin 100 µl solususpensiota infiltroitiin taimien kuhunkin lehteen.

- (D) *E. coli* DH5:ttä (pCPP430::*hrpN*) (katso kuviosta 1 plasmidivektorin pCPP430::*hrpN* kartta) käytettiin kuten kohdassa (C). Solut kasvatettiin ja suspensio ja ja käytetty istutemäärä olivat samat kuin kohdassa (C) kuvatut.

- 30 (E) *E. coli* HD5 (pCPP9) (katso kuvio 2) -soluja kasvatettiin ja käytetty suspensio ja istutemäärä olivat samat kuin kohdassa (C) kuvatut.

(F) Lehtien infiltrointi 5 mM:lla kaliumfosfaattipuskuria tapahtui kuten kohdassa (C) kuvattiin.

- 5 Altistuksessa käytettyä patogeenista bakteeria, *Pseudomonas solanacearum* kanta K60, kasvatettiin Kingin elatusaineessa B optiseen tiheyteen $OD_{620} = 0,7$ (noin 10^8 cfu/ml). Viljelmä sentrifugoitiin 100 tilavuusyksikössä 5 mM kaliumfosfaattipuskuria lopulliseen konsentraatioon noin 1×10^6 cfu/ml.

- 10 Kolmen vuorokauden kuluttua siitä, kun tomaatintaimet oli käsitelty harpiinilla tai bakteereilla, ne vedettiin ylös ja suunnilleen yksi senttimetri juurta katkaistiin saksilla. Taimet upotettiin sitten 3 minuutiksi *P. solanacearum* K60 -suspensioon. Käsitellyt taimet istutettiin takaisin samoihin ruukkuihin. Taimien annettiin olla kasvihuoneessa ja taudin esiintyminen rekisteröitiin 7 vuorokautta tartuttamisen jälkeen.

A. Harpiinikäsittelyn vaikutus

- 15 Kahdenkymmenen neljän (24) tunnin kuluttua ainoastaan ne lehden osat, jotka oli infiltroitu harpiinilla tai *E. coli* DH5(pCPP430):lla, olivat lakastuneet. Lehdissä, jotka oli sumutettu harpiinilla ja karborundumilla, esiintyi vain pistemäistä nekroosia.

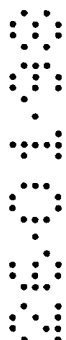
B. Harpiinikäsittelyn vaikutus bakteeriperäisen etelänlakastumistaudin kehittymiseen

- 20 Yhdessäkään 20:stä harpiinilla infiltroiduista taimesta ei esiintynyt minkäänlaisia oireita viikon kuluttua *P. solanacearum* K60 tartuttamisesta (taulukko 1). Yhdessä 20:stä kasvista esiintyi kuihtumisoireita. Seitsemässä 20:stä puskurilla infiltroidusta taimesta esiintyi kuihtumisoireita. *E. coli* DH5(pCPP430):lla (eräs transposonilla indusoitu mutantti, joka ei kyennyt aikaansaamaan yliherkkyysslakastumista) tai *E. coli* DH5(pCPP9):llä suoritettulla käsittelyllä ei ollut merkittävää eroa verrattuna puskurilla käsiteltyihin taimiin. Nämä tulokset johtavat ajattelemaan, että harpiini tai 25 *E. coli* DH5(pCPP430), joka tuottaa harpiinia, synnyttävät vastustuskyvyn tomaatintaimissa *P. solanacearum* K60:n aiheuttamalle bakteeriperäiselle etelänlakastumistaudille.

Taulukko 1. Taudin esiintyvyys tomaatintaimissa 7 ja 14 vuorokautta *P. solanacearum* K60:n tartuttamisen jälkeen

Käsittely	Taimien lukumäärä			
	<u>7 vuorokautta</u>		<u>14 vuorokautta</u>	
	Kuihtuneita	Terveitä	Kuihtuneita	Terveitä
A. Harpiini-infiltointi	0	20	2	18
B. Harpiiniruiskutus	1	19	3	17
C. <i>E. coli</i> DH5(pCPP430)	2	18	3	17
D. <i>E. coli</i> DH5(pCPP430)	4	16	7	13
E. <i>E. coli</i> DH5(pCPP9)	5	15	6+1 lakastunut	13
F. Puskuri	7	13	8+1 lakastunut	11
Ei patogeenia	0	20	0	20

- 5 Neljä viikkoa patogeenin tartuttamisen jälkeen harpiinilla tai *E. coli* DH5(pCPP430):lla käsiteltyt taimet olivat pitempiä ja suurempia puskurilla käsiteltyihin taimiin verrattuna. Kymmenen harpiinilla tai puskurilla käsitellyn taimen keskikorkeudet on esitetty taulukossa 2.



Taulukko 2. Tomaatintaimien korkeudet (cm) neljä viikkoa *Pseudomonas solanacearum* K60:n tartuttamisesta ja harpiinilla tai puskurilla käsittelemisen jälkeen

Infiltoitu puskurilla	Infiltoitu harpiinilla	Infiltoitu puskurilla
<u>Ei tartutettu</u>	<u>Tartutettu K60</u>	<u>Tartutettu K60</u>
36	32	11
41	29	21
35	38	33
34	35	12
39	37	15
35	33	32
36	22	25
35	35	15
41	40	37
37	29	38
Keskimäärin 36,9	33	23,9

5 Esimerkki 2 – Tomaatin harpiinilla synnitetty vastustuskyky bakteeriperäiselle etelänlakastumistaudille (*Pseudomonas solanacearum*)

Kaikki menetelmät, joita käytettiin infiltroimiseen ja tartuttamiseen, olivat samat kuin esimerkissä 1 kuvatut, paitsi että *P. solanacearum* K60:n pitoisuus oli noin 5×10^4 cfu/ml.

- 10 Puskurilla infiltroiduissa kasveissa esiintyi oireita 15 vuorokautta *P. solanacearum* K60:n tartuttamisen jälkeen. Kuudessa 20 taimesta esiintyi kuihtumisoireita 15 vuorokauden kuluttua; 2 kasvia lakastui 21 vuorokauden jälkeen. Lakastuneet taimet saattoivat kuolla. Yhdessäkään 20:stä harpiinilla käsitellyssä taimessa ei esiintynyt kuihtumisoireita. Kolme viikkoa tartuttamisen jälkeen 3:ssa 20:stä harpiinilla käsitellystä taimesta esiintyi kuihtumisoireita. On mahdollista, että kolmen viikon kuluttua taimet ovat ehkä menettäneet synnitetyn vastustuskykynsä. Kuten ensimmäisessäkin kokeessa, harpiinilla käsiteltyjen taimien kokonaiskoko ja -korkeus olivat suuremmat kuin puskurilla käsiteltyjen.

Esimerkki 3 – Tomaatin harpiinilla synnitetty vastustuskyky bakteeriperäiselle etelänlakastumistaudille (*Pseudomonas solanacearum*)

Tämä koe oli samanlainen kuin esimerkissä 1, paitsi että ruukkuihin, jotka sisälsivät käsitellyt tomaatintaimet, lisättiin toinen *Pseudomonas solanacearum* K60 -tartutus.

- 5 Harpiinia infiltroitiin kahden viikon ikäisiin tomaatintaimiin. Kaksi sarjaa kutakin kasvia infiltroitiin noin 200 µl:lla harpiinia, joka oli lietetty 5 mM kaliumfosfaattipuskuriin pitoisuutena noin 200 µg/ml. Kaikkiaan 20 tomaatintainta infiltroitiin. Sama määrä tomaatintaimia infiltroitiin puskurilla. Kahden vuorokauden kuluttua taimiin tartutettiin *Pseudomonas solanacearum* K60 kastamalla niiden juuret suspensiossa.
- 10 Harpiinilla ja puskurilla infiltroidut taimet vedettiin ulos multaseoksesta ja pieni määrä juuria katkaistiin saksilla ja sitten loput juuret upotettiin *Pseudomonas solanacearum* K60 -suspensioon kolmeksi minuutiksi. Bakteerisolususpension konsentraatio oli noin 5×10^8 cfu/ml. Taimet istutettiin kukin takaisin omaan ruukkuunsa. Kuhunkin yksittäiseen läpimitaltaan 4 tuuman (10 cm) ruukkuun lisättiin
- 15 vielä 3 ml bakteerisuspensiota. Taudin esiintyvyys rekisteröitiin viikon kuluttua. Kaikki kokeet suoritettiin kasvihuoneessa, jossa oli vähäinen lämpötilan säätö.

Kolmen viikon kuluttua 11 kahdestakymmenestä (20) puskurilla infiltroidusta taimesta oli kuollut ja 2 tainta, jotka olivat lakastuneet, toipuivat, mutta jäivät vakavasti kuihtuneiksi. Ainoastaan 4 tainta kasvoi normaalisti verrattuna tartuttamattomiin tomaatteihin. Viisitoista harpiinilla käsiteltyä tainta vaikutti kuitenkin terveiltä; kolme tainta oli kuihtuneita ja kaksi tainta lakastui 3 viikon kuluttua tartuttamisesta. Nämä tulokset on koottu alla olevaan taulukkoon 3.

Taulukko 3. Tomaatin harpiinilla synnitetty vastustuskyky bakteeriperäiselle lakastumistaudille, jonka aiheuttaa *P. solanacearum*

<u>Käsittely</u>	<u>Viikkoja tartutuksen jälkeen</u>		
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
Harpiini			
Terveitä	20	17	15
Lakastuneita	0	1	2
Kuihtuneita	0	2	3
Puskuri			
Terveitä	8	5	4
Lakastuneita	8	12	13
Kuihtuneita	4	3	3

Esimerkki 4 – Tupakan harpiinilla synnitetty vastustuskyky tupakanmosaiikkivirukselle

- Sarja neljän viikon ikäisten tupakantaimien (viljelylajike, Xanthi, sisälsi N-geenin) alalehtiä infiltroitiin *E. amylovora* -harpiinilla käyttäen konsentraatiota 200 µg/ml.
- 5 Kolmen vuorokauden kuluttua taimet altistettiin tupakanmosaiikkivirukselle ("TMV"). Virusta käytettiin kahtena konsentraationa (5 µg ja 100 µg/ml). Noin 50 µl virussuspensiota levitettiin tupakan yhdelle ylälehdelle. Lehti pölytettiin 400 meshin karborundumilla ja lehteä hangattiin varovasti. Kumpikin konsentraatio testattiin kolmella taimella. Nekroottiset vauriot laskettiin 4 vuorokauden kuluttua
- 10 tartutuksesta ja kahtena peräkkäisenä päivänä ja vaurioiden keskilukumäärä kolmella lehdellä raportoidaan (taulukko 4). Päivään 10 mennessä oli vaikea erottaa yksittäisiä vaurioita, koska jotkut nekroottisista vaurioista olivat kasvaneet yhteen. Sen vuoksi rekisteröityjen vaurioiden lukumäärä vaikutti vähäisemmältä kuin päivänä 7 rekisteröityjen. Nekroottisten vaurioiden laajuus puskurilla käsitellyissä lehdissä oli
- 15 paljon suurempi kuin harpiinilla käsitellyissä lehdissä.

Taulukko 4. Tupakan harpiinilla synnitetty vastustuskyky TMV:lle tartuttamalla 5 µg/ml virusta

Vaurioiden keskimääräinen lukumäärä/lehti				
	Käsittely	Päivä 4	Päivä 7	Päivä 10
	Harpiini	21	32	35
	Puskuri	67	102	76
20	Paikallisten vaurioiden, joita kehittyi harpiinilla käsitellyssä tupakassa ja puskurilla käsitellyssä tupakassa, kun tupakanmosaiikkivirussiirroksen pitoisuus oli 100 µg/ml, lukumäärässä ei ollut merkittävää eroa.			

Esimerkki 5 – Tupakan harpiinilla synnitetty vastustuskyky *Fusariumin* aiheuttamalle lakastumistaudille

- 25 Kuuden viikon ikäisiä tupakantaimia käsiteltiin harpiinilla esimerkissä 3 kuvatulla tavalla. Sienipatogeenia, *Fusarium oxysporumia*, kasvatettiin limanpapuagarelatusaineessa 5 vuorokautta 27°C:ssa. Kahta kokonaista agarmaljallista sienirihmastoa sekoitettiin 2 minuuttia 20 ml:ssa 5 mM kaliumfosfaattipuskuria. Harpiinilla tai pus-

- kurilla käsiteltyjen tomaatintaimien juuria vioitettiin työntämällä puinen tukikeppi ruukkujen multaan. Sitten 3 ml sienilietettä kaadettiin kunkin 4 tuuman (10 cm) ruukun multaan. Tartutettuja taimia pidettiin ympäristöolosuhteiltaan säädellyssä tilassa 24°C:ssa antaen niille 16 tuntia valoa vuorokaudessa. Taudin esiintyminen
- 5 rekisteröitiin 7 vuorokautta tartutuksen jälkeen. Kukin käsittely koski 10 tainta. Tulokset esitetään alla olevassa taulukossa 5.

Taulukko 5. Harpiini- tai puskurikäsitteilyn vaikutus *Fusariumin* aiheuttamaan lakastumistautiin tomaatissa

Taimien, joissa esiintyi lakastumisoireita mainittuna aikana tartutuksen jälkeen, lukumäärä (10:stä)

Käsittely	Päivä 7	Päivä 10	Päivä 15	Päivä 20
Harpiini	1	2	4	4 (1 kuollut)
Puskuri	3	6	7	7 (4 kuollutta)

10

Esimerkki 6 – Tupakan harpiinilla synnitetty vastustuskyky ruskearuosteelle (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)

- Harpiinia infiltroitiin yhden kappaleen sarjoihin 4 viikon ikäisten tupakantaimien (20 cm korkeiden) alalehtiä. Kolmen vuorokauden kuluttua *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* -suspensioita infiltroitiin yhden kappaleen sarjoihin ylälehtiä. Neljän vuorokauden kuluttua taudin esiintyvyys rekisteröitiin alla olevan taulukon 6 mukaisesti.
- 15

- Taulukko 6.** Ruskearuosteinfektion oireet tupakanlehdissä, joihin oli tartutettu *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, alalehtien harpiinikäsitteilyn jälkeen
- 20

<i>P.s. tabaci</i> n pitoisuus	Käsitelty harpiinilla	Ei käsitelty harpiinilla
10 ⁴ cfu/ml	ei oireita	nekroosi ja vedessä liotus
10 ⁵ cfu/ml	ei oireita	nekroosi ja vedessä liotus
10 cfu/ml	ei oireita	nekroosi ja vedessä liotus
10 ⁷ cfu/ml	ei oireita	nekroosi ja vedessä liotus
10 ⁸ cfu/ml	nekroosi	nekroosi ja vedessä liotus

Esimerkki 7 –Pelargonian (*Pelargonium hortorum*) harpiinilla synnitetty vastustuskyky lehtilaikulle (*Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*)

- Tämä koe tehtiin juurtuneilla pelargoniaistukkailla, jotka kasvoivat yksittäisissä 4 tai 6 tuuman (10 ja 16 cm) ruukuissa keinotekoisessa kasvualustassa kasvihuoneessa.
- 5 Kaksi alalehteä kustakin taimesta infiltroitiin joko 0,05 M kaliumfosfaattipuskurilla, pH 6,5 (verrokki) tai harpiinilla tai *Escherichia coli* DH5 (pCPP430) -suspensiolla (*E. amylovoran* kokonainen kloonattu hrp-geenirypäs). Kaksi – seitsemän vuorokautta infiltroinnin jälkeen kaikkiin taimiin istutettiin bakteeriperäisen lehtilaikkupatogeenin, *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, puhdasviljelmä. Bakteerisuspensiota (5×10^6 cfu/ml) sumutettiin taimien lehtien sekä ala- että yläpinnoille pienpaineella. Kukin käsittely tehtiin kahteen taimiin (merkitty tunnuksilla "A" ja "B" taulukossa 7). Taimia pidettiin suljetussa tilassa 48 tuntia käyttäen lisäsumutusta, joka toteutettiin kylmäsumusumuttimilla. Sitten taimia pidettiin kasvihuoneen pöydällä alttiina ympäristön kosteudelle ja 23°C:n - 32°C:n lämpötilalle 10 vuorokautta
- 15 ennen taudin kehittymisen arviointia.

Taulukko 7. Harpiinin ja *Erwinia amylovoran* hrp-geenirypään vaikutus pelargonian bakteeriperäisen lehtilaikun kehittymiseen

Käsittely	Aika käsittelyn ja <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>pelargonii</i> istuttamisen välillä									
	7 vrk		5 vrk		4 vrk		3 vrk		2 vrk	
	Taimi		Taimi		Taimi		Taimi		Taimi	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Puskuri	3*	5	5	4	3	2	4	3	4	5
Harpiini	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
DH5(pCPP430)	0	0	NT	NT	0	0	0	1	1	0

- * Taulukossa olevat numerot tarkoittavat lehtien, joissa esiintyi taudin oireita (korostunutta nekroosia, kloroosia tai lakastumista) 10 vrk taudin istuttamisen jälkeen, lukumäärää.

Esimerkki 8 – Useiden harpiinien aktiivisuus vastustuskyvyn synnyttämisessä *Pseudomonas syringae* pv. *tabacin* aiheuttamalle lehtilaikulle

- Tupakantaimia (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*) kasvatettiin kasvihuoneessa. Niiden ollessa neljäviikkoisia harpiinivalmisteita infiltroitiin yhteen kunkin kasvin

kaksi alalehteä käsittävään sarjaan. Kaksitoista tainta käsiteltiin kullakin harpiini-valmisteella ja kolme käsiteltiin samalla kaliumfosfaattipuskurilla, jota käytettiin harpiinien valmistukseen. Yliherkkyysnekroosi kehittyi 24 tunnin kuluessa lehtisarjoissa, jotka oli infiltroitu harpiinivalmisteilla, mutta ei puskurilla infiltroituissa.

- 5 Kun harpiinikäsittelystä oli kulunut 7, 10, 11 ja 12 vuorokautta, kaikkiin taimiin istutettiin *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* suspensiolla, joka sisälsi 10^4 - 10^6 solua/ml, sumuttamalla sitä sarjojen ylälehtiin. Taimia inkuboitiin kasvihuoneessa 7 vuorokautta ennen taudin kehittymisen arviointia. Tulokset on taulukoitu seuraavasti taulukkoon 8:

10

Taulukko 8

Harpiinin lähde	Vuorokausia käsittelyn ja taudin istuttamisen välillä											
	<u>12</u>			<u>11</u>			<u>10</u>			<u>7</u>		
log (istutt.)	4	5	6	4	5	6	4	5	6	4	5	6
Ilman (puskuri)	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++
<i>P. syringae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>E. chrysanthemi</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>E. amylovora</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

- = ei oireita

+ = nekroosia, ympärillä lehtilaikulle tyypillinen keltainen halorengas

++ = vakavaa nekroosia, ympärillä lehtilaikulle tyypillinen keltainen halorengas

15

Tulokset osoittavat, että kolmesta bakteerista valmistetut harpiinivalmisteet synnyttävät tehokkaasti vastustuskyvyn lehtilaikkupatogeenille. Millä tahansa näistä harpiineista käsitellyissä taimissa ei esiintynyt oireita, kun käytettiin kahta pienempää pitoisuutta. Suuremmalla pitoisuudella oireet olivat vakavampia puskurilla käsitellyissä taimissa kuin harpiinilla käsitellyissä taimissa.

20

Esimerkki 9 – Harpiinilla synnytetty vastustuskyky *Phytophthora infestansin* aiheuttamalle perunarutolle

Perunaruttopatogeeni koskee ensi sijassa perunoita ja tomaatteja. Se oli syynä pahamaineiseen Irlannin perunanälänhätään. Harpiinin vaikutus vastustuskyvyn synnyttämiseen tälle taudinaiheuttajalle testattiin kasvihuoneessa kasvatetuilla tomaatin-

25

- 5 taimilla. Kolmen viikon ikäisiä taimia [lajike "Mama Mia", noin 6 - 8 tuuman (16 - 20 cm) korkuisia] käsiteltiin harpiinilla ja sen jälkeen niihin istutettiin *Phytophthora infestans*. Kaksi sarjaa kunkin taimen alalehtiä infiltrtoitiin harpiiniliuoksella, *Escherichia coli* DH5 (pCPP430) -lietteellä, joka tuottaa ja erittää harpiinia, tai kaliumfosfaattipuskurilla.

- 10 Kahden, kolmen tai neljän vuorokauden kuluttua liuoksen infiltrtoimisesta taimiin istutettiin *Phytophthora infestans* -sienirihmastoliete. Tässä käytettiin U.S. 7 -kantaa, joka on erittäin virulentti tomaatille. Sienirihmastoliete valmistettiin sekoittamalla varovasti kahden ohra jauho-agarmaljan sisältö, joissa sientä oli kasvatettu 2 viikkoa 21°C:ssa. Lietettä siveltiin yhden lehden ylä- ja alapintaan per käsitelty taimi leveällä maalarinsiveltimellä.

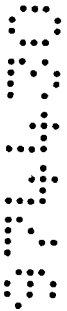
- 15 Käsiteltyjä taimia, joihin tauti oli istutettu, inkuboitiin kasvihuoneessa erityisrakenteisessa sumutilassa, joka on sovitettu ylläpitämään 20 - 23°C:n lämpötilaa ja samalla säilyttämään sopivan ilmankosteuden. Kosteus saatiin aikaan usealla kylmätihkumuttajalla, jotka toimivat maksiminopeudella puhdistetulla vedellä. Taudin esiintyvyys arvioitiin 13 vuorokautta *Phytophthora infestansin* tartuttamisen jälkeen ja tulokset on taulukoitu taulukkoon 9. Kukin käsittely tehtiin neljään yksittäiseen taimiin.

- 20 **Taulukko 9.** Perunaruttovaurioiden lukumäärä tomaatinlehdissä 13 vuorokauden kuluttua taudin istuttamisesta

Käsittely		Vuorokausia käsittelyn ja taudin istuttamisen välillä											
		<u>4</u>				<u>3</u>				<u>2</u>			
	Taimi	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
	Puskuri	3	2	0	0	1	2	2	0	0	0	4	1
	Harpiini	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1	0	0
	DH5(pCPP430)	0	0	0	1	0	2	2	1	0	1	1	0

- 25 Käsittely harpiinilla vähensi vaurioiden, joita taimiin kehittyi kaikilla jaksoilla käsittelyn ja taudin istuttamisen välillä, lukumäärää. Kehittyneiden perunaruttovaurioiden lukumäärää vähensi myös esikäsittely DH5:llä (pCPP430), joka tuottaa ja erittää harpiinia.

Vaikka keksintöä on kuvattu tässä yksityiskohtaisesti sen havainnollistamiseksi esimerkein, on selvää, että tällaiset yksityiskohdat palvelevat vain mainittua tarkoitusta, ja alan ammattilainen osaa tehdä siihen muunnelmia keksinnön seuraavissa patenttivaatimuksissa määritellystä hengestä ja suoja-alasta poikkeamatta.



Sekvenssiluettelo

(1) YLEISINFORMAATIO:

- (i) HAKIJA: Cornell Research Foundation, Inc.
- (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Yliherkkyyssreaktiolla synnytetty vastustus-
kyky kasveissa

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 9

(iv) YHTEYSTIEDOT:

- (A) VASTAANOTTAJA: Nixon, Hargrave, Devans & Doyle LLP
- (B) KATUOSOITE: Clinton Square, P.O. Box 1051
- (C) KAUPUNKI: Rochester
- (D) OSAVALTIO: New York
- (E) MAA: U.S.A.
- (F) ZIP: 14603

(v) TIETOKONEKIELINEN MUOTO:

- (A) VÄLINE: Levyke
- (B) TIETOKONE: IMB PC yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
- (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0, Version "1.30"

(vi) TÄMÄNHETKISET HAKEMUSTIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO:
- (B) HAKEMISPÄIVÄ:
- (C) LUOKKA:

(vii) AIKAISEMPAA HAKEMUSTA KOSKEVAT TIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO: US 08/475,775
- (B) HAKEMISPÄIVÄ: 07-06-1995

(viii) ASIAMIESTIEDOT:

- (A) NIMI: Goldman, Michael L.
- (B) REKISTERINUMERO: 30,727
- (C) VIITE/ASIANUMERO: 19603/10051

(xi) TELEKOMMUNIKAATIOTIEDOT:

- (A) PUHELIN: (716) 263-1304

(B) TELEFAX: (716) 263-1600

(2) SEK.ID.NRO 1:TÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 338 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) SÄIKEISYYS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 1:

Met	Gln	Ile	Thr	Ile	Lys	Ala	His	Ile	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Val	Ser	
1				5					10					15		
Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Asn	Ser	Ala	Ala	Ser	Ser	
			20					25					30			
Leu	Gly	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Ser	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Leu	Thr	
		35					40					45				
Ser	Ala	Leu	Thr	Ser	Met	Met	Phe	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Gln	Gly	Leu	
		50				55					60					
Gly	Ala	Ser	Ser	Lys	Gly	Leu	Gly	Met	Ser	Asn	Gln	Leu	Gly	Gln	Ser	
65					70					75					80	
Phe	Gly	Asn	Gly	Ala	Gln	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Lys	
				85					90					95		
Ser	Gly	Gly	Asp	Ala	Leu	Ser	Lys	Met	Phe	Asp	Lys	Ala	Leu	Asp	Asp	
			100					105					110			
Leu	Leu	Gly	His	Asp	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Thr	Asn	Gln	Ser	Asn	Gln	
		115					120					125				
Leu	Ala	Asn	Ser	Met	Leu	Asn	Ala	Ser	Gln	Met	Thr	Gln	Gly	Asn	Met	
		130				135					140					
Asn	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Asn	Ala	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Gly	
145					150					155					160	
Asn	Gly	Leu	Gly	Gln	Ser	Met	Ser	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Leu	Gly	
				165					170					175		
Ala	Gly	Gly	Leu	Gln	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	Gly	Ala	Phe	Asn	Gln	Leu	
			180					185					190			
Gly	Asn	Ala	Ile	Gly	Met	Gly	Val	Gly	Gln	Asn	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	
		195				200						205				
Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Thr	His	Val	Asp	Gly	Asn	Asn	Arg	His	Phe	Val	
		210				215					220					
Asp	Lys	Glu	Asp	Arg	Gly	Met	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Gln	Phe	Met	Asp	
225					230					235					240	

[illegible]

(2) SEK.ID.NRO 2:TA KOSKEVAT TIEDOT:

(i) **SEKVENS SITUNNUSMERKIT:**

- (A) PITUUS: 2141 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genomi)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 2:

CGATTTTACC	CGGGTGAACG	TGCTATGACC	GACAGCATCA	CGGTATTCTGA	CACCGTTACG	60
GCGTTTATGG	CCGCGATGAA	CCGGCATCAG	GCGGCGCGCT	GGTCGCCGCA	ATCCGGCGCTC	120
GATCTGGTAT	TTCAGTTTGG	GGACACCGGG	CGTGAACCTCA	TGATGCAGAT	TCAGCCGGGG	180
CAGCAATATC	CCGGCATGTT	GCGCACGCTG	CTCGCTCGTC	GTTATCAGCA	GGCGGCAGAG	240
TGCGATGGCT	GCCATCTGTG	CCTGAACGGC	AGCGATGTAT	TGATCCTCTG	GTGGCCGCTG	300
CCGTCGGATC	CCGGCAGTTA	TCCGCAGGTG	ATCGAACGTT	TGTTTGAAC	GGCGGGAATG	360
ACGTTGCCGT	CGCTATCCAT	AGCACCGACG	GCGCGTCCGC	AGACAGGGAA	CGGACGCGCC	420
CGATCATTA	GATAAAGGCG	GCTTTTTTTA	TTGCAAAACG	GTAACGGTGA	GGAACCGTTT	480
CACCGTCGGC	GTCACTCAGT	AACAAGTATC	CATCATGATG	CCTACATCGG	GATCGGCGTG	540
GGCATCCGTT	GCAGATACTT	TTGCGAACAC	CTGACATGAA	TGAGGAAACG	AAATTATGCA	600
AATTACGATC	AAAGCGCACA	TCGGCGGTGA	TTTGGGCGTC	TCCGGTCTGG	GGCTGGGTGC	660
TCAGGGACTG	AAAGGACTGA	ATTCCGCGGC	TTCATCGCTG	GGTTCAGCG	TGGATAAACT	720

GAGCAGCACC ATCGATAAGT TGACCTCCGC GCTGACTTCG ATGATGTTTG GCGGCGCGCT	780
GGCGCAGGGG CTGGGCGCCA GCTCGAAGGG GCTGGGGATG AGCAATCAAC TGGGCCAGTC	840
TTTCGGCAAT GGCGCGCAGG GTGCGAGCAA CCTGCTATCC GTACCGAAAT CCGGCGGCGA	900
TGCGTTGTCA AAAATGTTTG ATAAAGCGCT GGACGATCTG CTGGGTCATG ACACCGTGAC	960
CAAGCTGACT AACCAGAGCA ACCAACTGGC TAATTCAATG CTGAACGCCA GCCAGATGAC	1020
CCAGGGTAAT ATGAATGCGT TCGGCAGCGG TGTGAACAAC GCACTGTCGT CCATTCTCGG	1080
CAACGGTCTC GGCCAGTCGA TGAGTGGCTT CTCTCAGCCT TCTCTGGGGG CAGGCGGCTT	1140
GCAGGGCCTG AGCGGCGCGG GTGCATTCAA CCAGTTGGGT AATGCCATCG GCATGGGCGT	1200
GGGGCAGAAT GCTGCGCTGA GTGCGTTGAG TAACGTCAGC ACCCACGTAG ACGGTAACAA	1260
CCGCCACTTT GTAGATAAAG AAGATCGCGG CATGGCGAAA GAGATCGGCC AGTTTATGGA	1320
TCAGTATCCG GAAATATTCG GTAAACCGGA ATACCAGAAA GATGGCTGGA GTTCGCCGAA	1380
GACGGACGAC AAATCCTGGG CTAAAGCGCT GAGTAAACCG GATGATGACG GTATGACCGG	1440
CGCCAGCATG GACAAATTCC GTCAGGCGAT GGGTATGATC AAAAGCGCGG TGGCGGGTGA	1500
TACCGGCAAT ACCAACCTGA ACCTGCGTGG CGCGGGCGGT GCATCGCTGG GTATCGATGC	1560
GGCTGTCGTC GGCGATAAAA TAGCCAACAT GTCGCTGGGT AAGCTGGCCA ACGCCTGATA	1620
ATCTGTGCTG GCCTGATAAA GCGGAAACGA AAAAAGAGAC GGGGAAGCCT GTCTCTTTTC	1680
TTATTATGCG GTTTATGCGG TTACCTGGAC CGGTTAATCA TCGTCATCGA TCTGGTACAA	1740
ACGCACATTT TCCCGTTCAT TCGCGTCGTT ACGCGCCACA ATCGCGATGG CATCTTCCTC	1800
GTCGCTCAGA TTGCGCGGCT GATGGGGAAC GCCGGGTGGA ATATAGAGAA ACTCGCCGGC	1860
CAGATGGAGA CACGTCTGCG ATAAATCTGT GCCGTAACGT GTTCTATCC GCCCCTTTAG	1920
CAGATAGATT GCGGTTTCGT AATCAACATG GTAATGCGGT TCCGCCTGTG CGCCGGCCGG	1980
GATCACCACA ATATTCATAG AAAGCTGTCT TGCACCTACC GTATCGCGGG AGATACCGAC	2040
AAAATAGGGC AGTTTTTGCG TGGTATCCGT GGGGTGTTCC GGCCTGACAA TCTTGAGTTG	2100
GTTTCGTCATC ATCTTTCTCC ATCTGGGCGA CCTGATCGGT T	2141

(2) SEK.ID.NRO 3:A KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENS SITUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 385 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) SÄIKEISYYS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 3:

Met	Ser	Leu	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala	Ser	Thr	Met	Gln	Ile	Ser	1	5	10	15
Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Asn	Gly	Leu	Leu	Gly	Thr	Ser	Arg	Gln	20	25	30	
Asn	Ala	Gly	Leu	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Asn	35	40	45	
Gln	Asn	Asp	Thr	Val	Asn	Gln	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Thr	Gly	Met	Met	50	55	60	
Met	Met	Met	Ser	Met	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Met	Gly	Gly	Gly	Leu	65	70	75	80
Gly	Gly	Gly	Leu	Gly	Asn	Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Glu	85	90	95	
Gly	Leu	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Asp	Met	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Asn	Thr	100	105	110	
Leu	Gly	Ser	Lys	Gly	Gly	Asn	Asn	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Pro	115	120	125	
Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Gly	Ile	Asn	Ser	Thr	Ser	Gln	Asn	Asp	Asp	Ser	130	135	140	
Thr	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Ser	Asp	Pro	Met	Gln	Gln	145	150	155	160
Leu	Leu	Lys	Met	Phe	Ser	Glu	Ile	Met	Gln	Ser	Leu	Phe	Gly	Asp	Gly	165	170	175	
Gln	Asp	Gly	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Lys	Gln	Pro	Thr	Glu	180	185	190	
Gly	Glu	Gln	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Val	Thr	Asp	Ala	Leu	Ser	Gly	195	200	205	
Leu	Met	Gly	Asn	Gly	Leu	Ser	Gln	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	210	215	220	
Gly	Gly	Gln	Gly	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Leu	225	230	235	240
Gly	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Asn	Leu	Ser	Gly	Pro	Val	Asp	Tyr	Gln	Gln	245	250	255	
Leu	Gly	Asn	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Ile	Gly	Met	Lys	Ala	Gly	Ile	Gln	260	265	270	
Ala	Leu	Asn	Asp	Ile	Gly	Thr	His	Arg	His	Ser	Ser	Thr	Arg	Ser	Phe	275	280	285	
Val	Asn	Lys	Gly	Asp	Arg	Ala	Met	Ala	Lys	Glu	Ile	Gly	Gln	Phe	Met	290	295	300	
Asp	Gln	Tyr	Pro	Glu	Val	Phe	Gly	Lys	Pro	Gln	Tyr	Gln	Lys	Gly	Pro	305	310	315	320

Gly	Gln	Glu	Val	Lys 325	Thr	Asp	Asp	Lys	Ser 330	Trp	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser
Lys	Pro	Asp	Asp	Asp 340	Gly	Met	Thr	Pro 345	Ala	Ser	Met	Glu	Gln 350	Phe	Asn
Lys	Ala	Lys 355	Gly	Met	Ile	Lys	Arg 360	Pro	Met	Ala	Gly	Asp 365	Thr	Gly	Asn
Gly	Asn 370	Leu	Gln	His	Ala	Val 375	Pro	Val	Val	Leu	Arg 380	Trp	Val	Leu	Met
Pro 385															

(2) SEK.ID.NRO 4:ÄÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 1158 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genomi)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 4:

ATGAGTCTGA	ATACAAGTGG	GCTGGGAGCG	TCAACGATGC	AAATTTCTAT	CGGCGGTGCG	60
GGCGGAAATA	ACGGGTTGCT	GGGTACCAGT	CGCCAGAATG	CTGGGTTGGG	TGGCAATTCT	120
GCACTGGGGC	TGGGCGGCGG	TAATCAAAAT	GATACCGTCA	ATCAGCTGGC	TGGCTTACTC	180
ACCGGCATGA	TGATGATGAT	GAGCATGATG	GGCGGTGGTG	GGCTGATGGG	CGGTGGCTTA	240
GGCGGTGGCT	TAGGTAATGG	CTTGGGTGGC	TCAGGTGGCC	TGGGCGAAGG	ACTGTCGAAC	300
GCGCTGAACG	ATATGTTAGG	CGGTTGCGTG	AACACGCTGG	GCTCGAAAGG	CGGCAACAAT	360
ACCACTTCAA	CAACAAATTC	CCCGCTGGAC	CAGGCGCTGG	GTATTAATCT	AACGTCCCAA	420
AACGACGATT	CCACCTCCGG	CACAGATTCC	ACCTCAGACT	CCAGCGACCC	GATGCAGCAG	480
CTGCTGAAGA	TG TTCAGCGA	GATAATGCAA	AGCCTGTTTG	GTGATGGGCA	AGATGGCACC	540
CAGGGCAGTT	CCTCTGGGGG	CAAGCAGCCG	ACCGAAGGCG	AGCAGAACGC	CTATAAAAAA	600
GGAGTCACTG	ATGCGCTGTC	GGGCCTGATG	GGTAATGGTC	TGAGCCAGCT	CCTTGGCAAC	660
GGGGGACTGG	GAGGTGGTCA	GGGCGGTAAT	GCTGGCACGG	GTCTTGACGG	TTCGTCGCTG	720
GGCGGCAAAG	GGCTGCAAAA	CCTGAGCGGG	CCGGTGGACT	ACCAGCAGTT	AGGTAACGCC	780
GTGGGTACCG	GTATCGGTAT	GAAAGCGGGC	ATTCAGGCGC	TGAATGATAT	CGGTACGCAC	840
AGGCACAGTT	CAACCCGTTT	TTTCGTCAAT	AAAGGCGATC	GGGCGATGGC	GAAGGAAATC	900

```

GGTCAGTTCA TGGACCAGTA TCCTGAGGTG TTTGGCAAGC CGCAGTACCA GAAAGGCCCG      960
GGTCAGGAGG TGAAAACCGA TGACAAATCA TGGGCAAAAG CACTGAGCAA GCCAGATGAC      1020
GACGGAATGA CACCAGCCAG TATGGAGCAG TTCAACAAAG CCAAGGGCAT GATCAAAAGG      1080
CCCATGGCGG GTGATACCGG CAACGGCAAC CTGCAGCACG CGGTGCCGGT GGTTCCTTCGC      1140
TGGGTATTGA TGCCATGA                                     1158

```

(2) SEK.ID.NRO 5:TTÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 341 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) SÄIKEISYYS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 5



```

Met -Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Ser Ser Leu Gln Thr Pro Ala Met
1      5      10      15
Ala Leu Val Leu Val Arg Pro Glu Ala Glu Thr Thr Gly Ser Thr Ser
20      25      30
Ser Lys Ala Leu Gln Glu Val Val Val Lys Leu Ala Glu Glu Leu Met
35      40      45
Arg Asn Gly Gln Leu Asp Asp Ser Ser Pro Leu Gly Lys Leu Leu Ala
50      55      60
Lys Ser Met Ala Ala Asp Gly Lys Ala Gly Gly Gly Ile Glu Asp Val
65      70      75      80
Ile Ala Ala Leu Asp Lys Leu Ile His Glu Lys Leu Gly Asp Asn Phe
85      90      95
Gly Ala Ser Ala Asp Ser Ala Ser Gly Thr Gly Gln Gln Asp Leu Met
100     105     110
Thr Gln Val Leu Asn Gly Leu Ala Lys Ser Met Leu Asp Asp Leu Leu
115     120     125
Thr Lys Gln Asp Gly Gly Thr Ser Phe Ser Glu Asp Asp Met Pro Met
130     135     140
Leu Asn Lys Ile Ala Gln Phe Met Asp Asp Asn Pro Ala Gln Phe Pro
145     150     155     160
Lys Pro Asp Ser Gly Ser Trp Val Asn Glu Leu Lys Glu Asp Asn Phe
165     170     175

```

Leu Asp Gly Asp Glu Thr Ala Ala Phe Arg Ser Ala Leu Asp Ile Ile
 180 185 190
 Gly Gln Gln Leu Gly Asn Gln Gln Ser Asp Ala Gly Ser Leu Ala Gly
 195 200 205
 Thr Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Ser Ser Phe Ser Asn Asn Ser Ser
 210 215 220
 Val Met Gly Asp Pro Leu Ile Asp Ala Asn Thr Gly Pro Gly Asp Ser
 225 230 235 240
 Gly Asn Thr Arg Gly Glu Ala Gly Gln Leu Ile Gly Glu Leu Ile Asp
 245 250 255
 Arg Gly Leu Gln Ser Val Leu Ala Gly Gly Gly Leu Gly Thr Pro Val
 260 265 270
 Asn Thr Pro Gln Thr Gly Thr Ser Ala Asn Gly Gly Gln Ser Ala Gln
 275 280 285
 Asp Leu Asp Gln Leu Leu Gly Gly Leu Leu Leu Lys Gly Leu Glu Ala
 290 295 300
 Thr Leu Lys Asp Ala Gly Gln Thr Gly Thr Asp Val Gln Ser Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Gln Ile Ala Thr Leu Leu Val Ser Thr Leu Leu Gln Gly Thr Arg
 325 330 335
 Asn Gln Ala Ala Ala
 340

(2) SEK.ID.NRO 6:TTA KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSTITUNNUSMERKIT:

- (A) PITUUS: 1026 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genomi)

(xi) SEKVENSsin KUVAUS: SEK.ID.NRO 6:

ATGCAGAGTC TCAGTCTTAA CAGCAGCTCG CTGCAAACCC CGGCAATGGC CTTGTCTCTG	60
GTACGTCTCTG AAGCCGAGAC GACTGGCAGT ACGTCGAGCA AGGCGCTTCA GGAAGTTGTC	120
GTGAAGCTGG CCGAGGAACT GATGCGCAAT GGTCAACTCG ACGACAGCTC GCCATTGGGA	180

```

AAACTGTTGG CCAAGTCGAT GGCCGCAGAT GGCAAGGCGG GCGGCGGTAT TGAGGATGTC      240
ATCGCTGCGC TGGACAAGCT GATCCATGAA AAGCTCGGTG ACAACTTCGG CGCGTCTGCG      300
GACAGCGCCT CGGGTACCGG ACAGCAGGAC CTGATGACTC AGGTGCTCAA TGGCCTGGCC      360
AAGTCGATGC TCGATGATCT TCTGACCAAG CAGGATGGCG GGACAAGCTT CTCCGAAGAC      420
GATATGCCGA TGCTGAACAA GATCGCGCAG TTCATGGATG ACAATCCCGC ACAGTTTCCC      480
AAGCCGGACT CGGGCTCCTG GGTGAACGAA CTCAAGGAAG ACAACTTCCT TGATGGCGAC      540
GAAACGGCTG CGTTCCGTTT GGCACCTGAC ATCATTGGCC AGCAACTGGG TAATCAGCAG      600
AGTGACGCTG GCAGTCTGGC AGGGACGGGT GGAGGTCTGG GCACTCCGAG CAGTTTTTCC      660
AACAACCTCGT CCGTGATGGG TGATCCGCTG ATCGACGCCA ATACCGGTCC CGGTGACAGC      720
GGCAATACCC GTGGTGAAGC GGGGCAACTG ATCGGCGAGC TTATCGACCG TGGCCTGCAA      780
TCGGTATTGG CCGGTGGTGG ACTGGGCACA CCCGTAAACA CCCC GCAGAC CGGTACGTCG      840
GCGAATGGCG GACAGTCCGC TCAGGATCTT GATCAGTTGC TGGGCGGCTT GCTGCTCAAG      900
GGCCTGGAGG CAACGCTCAA GGATGCCGGG CAAACAGGCA CCGACGTGCA GTCGAGCGCT      960
GCGCAAATCG CCACCTTGCT GGTCAGTACG CTGCTGCAAG GCACCCGCAA TCAGGCTGCA     1020
GCCTGA                                           1026

```

(2) SEK.ID.NRO 7:ÄÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 344 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) SÄIKEISYYS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 7:

```

Met Ser Val Gly Asn Ile Gln Ser Pro Ser Asn Leu Pro Gly Leu Gln
1          5          10          15
Asn Leu Asn Leu Asn Thr Asn Thr Asn Ser Gln Gln Ser Gly Gln Ser
20          25          30
Val Gln Asp Leu Ile Lys Gln Val Glu Lys Asp Ile Leu Asn Ile Ile
35          40          45
Ala Ala Leu Val Gln Lys Ala Ala Gln Ser Ala Gly Gly Asn Thr Gly
50          55          60
Asn Thr Gly Asn Ala Pro Ala Lys Asp Gly Asn Ala Asn Ala Gly Ala
65          70          75          80

```

Asn Asp Pro Ser Lys Asn Asp Pro Ser Lys Ser Gln Ala Pro Gln Ser
 85 90 95
 Ala Asn Lys Thr Gly Asn Val Asp Asp Ala Asn Asn Gln Asp Pro Met
 100 105 110
 Gln Ala Leu Met Gln Leu Leu Glu Asp Leu Val Lys Leu Leu Lys Ala
 115 120 125
 Ala Leu His Met Gln Gln Pro Gly Gly Asn Asp Lys Gly Asn Gly Val
 130 135 140
 Gly Gly Ala Asn Gly Ala Lys Gly Ala Gly Gly Gln Gly Gly Leu Ala
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Gln Glu Ile Glu Gln Ile Leu Ala Gln Leu Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Val Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190
 Ala Asp Gly Gly Ser Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Asn Gly Ala
 195 200 205
 Asp Gly Gly Asn Gly Val Asn Gly Asn Gln Ala Asn Gly Pro Gln Asn
 210 215 220
 Ala Gly Asp Val Asn Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gly Ser Glu Asp
 225 230 235 240
 Gln Gly Gly Leu Thr Gly Val Leu Gln Lys Leu Met Lys Ile Leu Asn
 245 250 255
 Ala Leu Val Gln Met Met Gln Gln Gly Gly Leu Gly Gly Gly Asn Gln
 260 265 270
 Ala Gln Gly Gly Ser Lys Gly Ala Gly Asn Ala Ser Pro Ala Ser Gly
 275 280 285
 Ala Asn Pro Gly Ala Asn Gln Pro Gly Ser Ala Asp Asp Gln Ser Ser
 290 295 300
 Gly Gln Asn Asn Leu Gln Ser Gln Ile Met Asp Val Val Lys Glu Val
 305 310 315 320
 Val Gln Ile Leu Gln Gln Met Leu Ala Ala Gln Asn Gly Gly Ser Gln
 325 330 335
 Gln Ser Thr Ser Thr Gln Pro Met
 340

(2) SEK.ID.NRO 8:AA KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 1035 emäsparia

(B) TYYPPI: nukleiinihappo

(C) SÄIKEISYYS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: DNA (genomi)

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 8:

ATGTCAGTCG GAAACATCCA GAGCCCGTCG AACCTCCCGG GTCTGCAGAA CCTGAACCTC	60
AACACCAACA CCAACAGCCA GCAATCGGGC CAGTCCGTGC AAGACCTGAT CAAGCAGGTC	120
GAGAAGGACA TCCTCAACAT CATCGCAGCC CTCGTGCAGA AGGCCGCACA GTCGGCGGGC	180
GGCAACACCG GTAACACCGG CAACGCGCCG GCGAAGGACG GCAATGCCAA CGCGGGCGCC	240
AACGACCCGA GCAAGAACGA CCCGAGCAAG AGCCAGGCTC CGCAGTCGGC CAACAAGACC	300
GGCAACGTCG ACGACGCCAA CAACCAGGAT CCGATGCAAG CGCTGATGCA GCTGCTGGAA	360
GACCTGGTGA AGCTGTGTAA GCGGGCCCTG CACATGCAGC AGCCCGGCGG CAATGACAAG	420
GGCAACGGCG TGGGCGGTGC CAACGGCGCC AAGGGTGCCG GCGGCCAGGG CGGCCTGGCC	480
GAAGCGCTGC AGGAGATCGA GCAGATCCTC GCCCAGCTCG GCGGCGGCGG TGCTGGCGCC	540
GGCGGCGCGG GTGGCGGTGT CGGCGGTGCT GGTGGCGCGG ATGGCGGCTC CGGTGCGGGT	600
GGCGCAGGCG GTGCGAACGG CGCCGACGGC GGCAATGGCG TGAACGGCAA CCAGGCGAAC	660
GGCCCGCAGA ACGCAGGCGA TGTCAACGGT GCCAACGGCG CGGATGACGG CAGCGAAGAC	720
CAGGGCGGCC TCACCGGCGT GCTGCAAAAAG CTGATGAAGA TCCTGAACGC GCTGGTGCAG	780
ATGATGCAGC AAGGCGGCCT CGGCGGCGGC AACCAGGCGC AGGGCGGCTC GAAGGGTGCC	840
GGCAACGCCT CGCCGGCTTC CGGCGCGAAC CCGGGCGCGA ACCAGCCCGG TTCGGCGGAT	900
GATCAATCGT CCGGCCAGAA CAATCTGCAA TCCCAGATCA TGGATGTGGT GAAGGAGGTC	960
GTCCAGATCC TGCAGCAGAT GCTGGCGGCG CAGAACGGCG GCAGCCAGCA GTCCACCTCG	1020
ACGCAGCCGA TGTA	1035

(2) SEK.ID.NRO 9:ÄÄ KOSKEVAT TIEDOT:

(i) SEKVENSSITUNNUSMERKIT:

(A) PITUUS: 26 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) SÄIKEISYYS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEK.ID.NRO 9:

Thr	Leu	Ile	Glu	Leu	Met	Ile	Val	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ile	Ala	Leu	Pro	Ala	Tyr	Gln	Asp	Tyr						
			20					25							



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajalle, **tunnettu** siitä, että:
kasviin levitetään jotakin yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia
5 ei-infektiivassa muodossa, jolloin polypeptidi tai proteiini joutuu kosketukseen kasvin solujen kanssa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu jostakin patogeenista, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*,
10 *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* ja niiden seokset.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Erwinia chrysanthemista*.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi
15 SEK.ID.NRO 1.
5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin molekyylipaino on 34 kDa.
6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Erwinia amylovorasta*.
20
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 3.
8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin molekyylipaino on 37 kDa.
25
9. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Pseudomonas syringaesta*.
10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi
30 SEK.ID.NRO 5.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävän polypeptidin tai molekyylin molekyylipaino on 34 - 35 kDa.
12. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Pseudomonas solanacearumista*.
13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 7.
14. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Xanthomonas campestrisesta*.
15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 9.
16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kasvi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat kaksisirkkaiset ja yksisirkkaiset.
17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kasvi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat riisi, vehnä, ohra, ruis, puuvilla, auringonkukka, maapähkinä, maissi, peruna, bataatti, papu, herne, sikuri, salaatti, endiivi, kaali, kukkakaali, parsakaali, rapsi, retiisi, pinaatti, sipuli, valkosipuli, munakoiso, paprika, selleri, porkkana, squash, kurpitsa, kesäkurpitsa, kurkku, omena, päärynä, meloni, mansikka, rypäle, vadelma, ananas, soijapapu, tupakka, tomaatti, durra ja sokeriruoko.
18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kasvi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonia, joulutähti, krysanteemi, neilikka ja oppineidenkukka.
19. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että patogeeni, jolle kasvi on vastustuskykyinen, on valittu ryhmästä, jonka muodostavat virukset, bakteerit, sienet ja niiden yhdistelmät.
20. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että levittäminen toteutetaan sumuttamalla, ruiskuttamalla tai hankaamalla lehteä ennen kuin mainittu levittäminen suoritetaan.

21. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini levitetään kasveihin koostumuksena, joka käsittää lisäksi jonkin kantaja-aineen.
- 5 22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kantaja-aine on valittu ryhmästä, jonka muodostavat vesi ja vesiliuokset.
23. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että koostumus sisältää enemmän kuin 500 nM yliherkkyysreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.
- 10 24. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että koostumus sisältää lisäksi apuaineita, jotka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat lannoitteet, insektisidit, fungisidit ja niiden seokset.
25. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on eristetyssä muodossa.
- 15 26. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini levitetään bakteereina, jotka eivät aiheuta tautia ja ovat muunnetut geenillä, joka koodaa yliherkkyysreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.
- 20 27. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini levitetään bakteereina, jotka aiheuttavat taudin joissakin kasvilajeissa, mutta ei niissä, joihin mainittu levitys suoritetaan, ja ne sisältävät geenin, joka koodaa yliherkkyysreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.
- 25 28. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu levittäminen aiheuttaa polypeptidin tai proteiinin infiltroitumisen kasviin.
29. Patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että sen solut ovat kosketuksessa ei-infektoivan yliherkkyysreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin kanssa.
- 30 30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyysreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu patogeenista, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Xanthomonas campestris* ja niiden seokset.

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Erwinia chrysanthemista*.
- 5 32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 1.
33. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Erwinia amylovorasta*.
- 10 34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 3.
- 15 35. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Pseudomonas syringaesta*.
36. Patenttivaatimuksen 35 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 5.
- 20 37. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Pseudomonas solanacearumista*.
38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 7.
- 25 39. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on johdettu *Xanthomonas campestrisesta*.
- 30 40. Patenttivaatimuksen 39 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävällä polypeptidillä tai proteiinilla on aminohapposekvenssi SEK.ID.NRO 9.

41. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että se on valittu ryhmästä, jonka muodostavat kaksisirkkaiset ja yksisirkkaiset.

5 42. Patenttivaatimuksen 41 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että kasvi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat riisi, vehnä, ohra, ruis, puuvilla, auringonkukka, maapähkinä, maissi, peruna, bataatti, papu, herne, sikuri, lehtisalaatti, endiivi, kaali, kukkakaali, parsakaali, rapsi, retiisi, pinaatti, sipuli, valkosipuli, munakoiso, paprika, selleri, porkkana, squash, kurpitsa, kesäkurpitsa, kurkku, omena, päärynä, meloni, mansikka, rypäle, vadelma, ananas, soijapapu, tupakka, tomaatti, durra ja sokeriruoko.

43. Patenttivaatimuksen 41 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että kasvi on valittu ryhmästä, jonka muodostavat *Arabidopsis thaliana*, *Saintpaulia*, petunia, pelargonia, joulutähti, krysanteemi, neilikka ja oppineidenkukka.

15 44. Patenttivaatimuksen 30 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että patogeeni, jolle kasvi on vastustuskykyinen, on valittu ryhmästä, jonka muodostavat virukset, bakteerit, sienet ja niiden yhdistelmät.

20 45. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että yliherkkyyssreaktion synnyttävä polypeptidi tai proteiini on eristetyssä muodossa.

46. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että kasvin solut ovat kosketuksessa bakteereihin, jotka eivät aiheuta tautia ja jotka on muunnettu geenillä, joka koodaa yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.

25 47. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että kasvin solut ovat kosketuksessa bakteereihin, jotka eivät aiheuta tautia kasvissa, mutta aiheuttavat taudin muissa kasvilajeissa, ja jotka sisältävät geenin, joka koodaa yliherkkyyssreaktion synnyttävää polypeptidiä tai proteiinia.

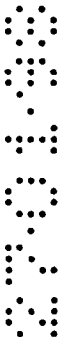
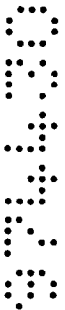
30 48. Patenttivaatimuksen 29 mukainen patogeenille vastustuskykyinen kasvi, **tunnettu** siitä, että kasvi on infiltroitu polypeptidillä tai proteiinilla.

49. Koostumus kasvien tekemiseksi vastustuskykyisiksi taudinaiheuttajalle, **tunnettu** siitä, että se käsittää:

- jonkin ei-infektoivan yliherkkyyssreaktion synnyttävän polypeptidin tai proteiinin ja
- jonkin kantaja-aineen.

.

.



350198 37430

1/2

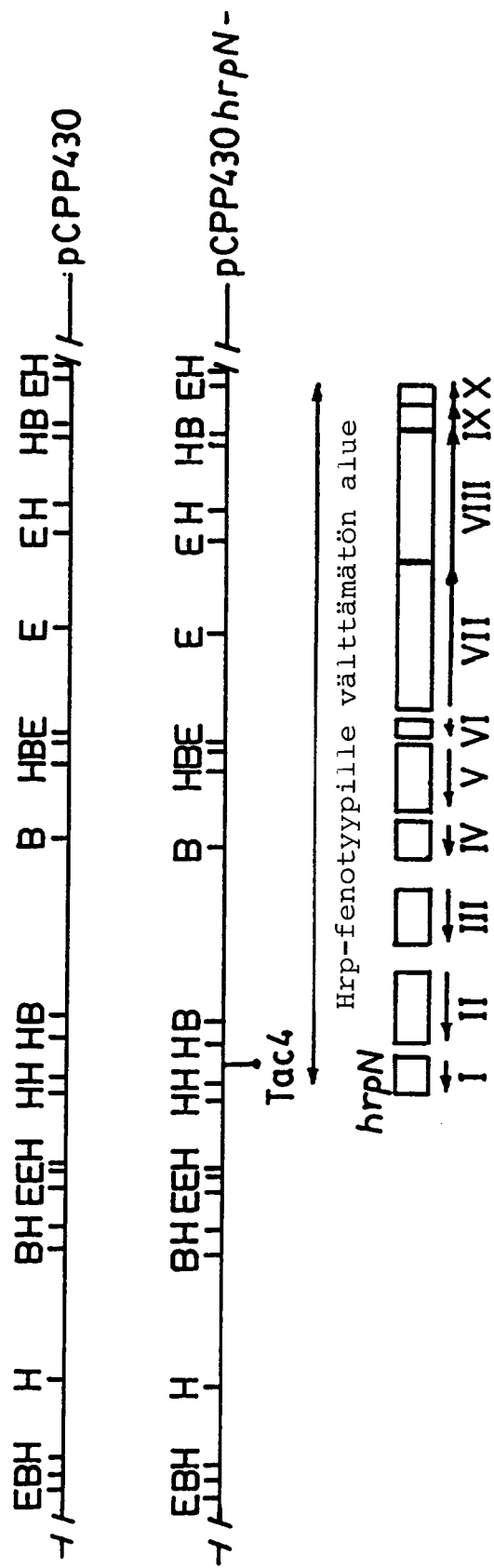


FIG. 1

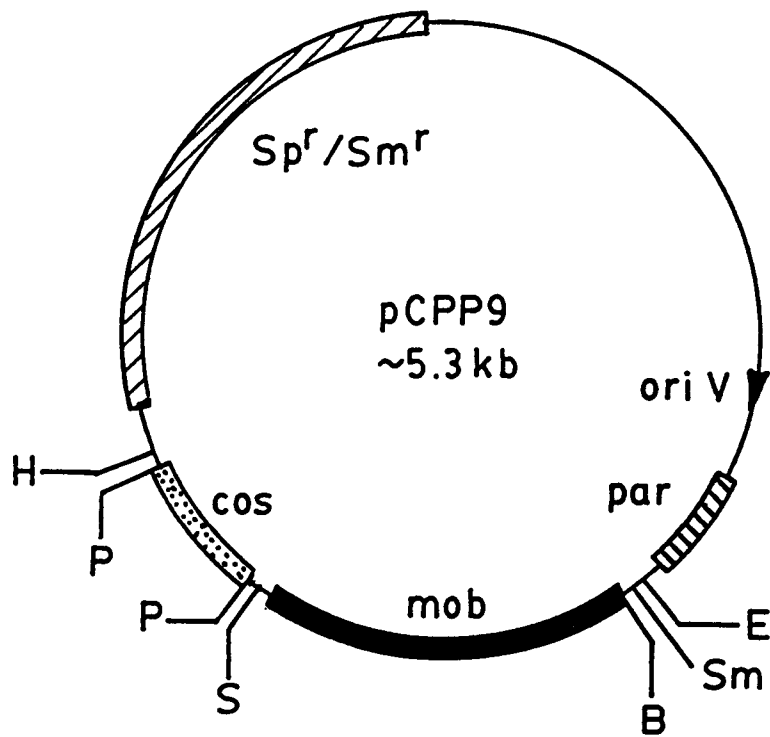


FIG. 2