

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

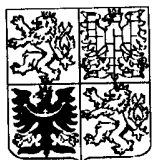
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

113-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.07.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9609137**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 05. 99**
(Věstník č. 5/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR97/01256**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/02562**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/82
C 12 N	15/53
C 12 N	15/54
C 12 N	15/55
C 12 N	5/10
A 01 H	5/00

(71) Přihlašovatel:

RHONE-POULENC AGRO, Lyon, FR;

(72) Původce:

Pallett Ken, Ongar, GB;

Derosé Richard, Lyon, FR;

**Pelissier Bernard, Saint Didier au Mont d
Or, FR;**

Sailland Alain, Lyon, FR;

(74) Zástupce:

**Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Chimérické geny s několika geny rezistence k herbicidům, rostlinné buňky a rostliny rezistentní k herbicidům a způsob přípravy takových rostlin

(57) Anotace:

Řešení se týká: 1. Chimérických genů s několika geny rezistence k herbicidům, rostlinné buňky a rostliny rezistentní k herbicidům. 2. Rostlin rezistentních najednou k více herbicidům, zejména k inhibitorům HPPD a k inhibitorům EPSPS nebo/a k dihalogenhydroxybenzonitrilům. 3. Jejich použití pro odplevelování rostlin několika herbicidy.

CZ 113-99 A3

01.03.99

176 760/HK

1

PV/113-99

~~11178~~

Chimérické geny s několika geny rezistence k herbicidům, rostlinné buňky a rostliny rezistentní k herbicidům a způsob přípravy takových rostlin

Oblast techniky

Předložený vynález se týká chimérického genu s několika geny rezistence k herbicidům, rostlinné buňky a rostliny rezistentní k několika herbicidům.

V následujícím popisu, herbicidy budou označeny podle běžného názvu zejména tak, jak jsou uvedeny v "The Pesticide Manual" v desátém vydání British Crop Protection Council.

Dosavadní stav techniky

Jsou známy rostliny, které byly transformovány proto, aby byly rezistentní k určitým herbicidům, například k dihalogenhydroxybenzonitrilům, zejména k bromoxynilu díky genu kódujícímu nitrilasu, která degraduje tyto herbicidy nebo jsou také známy rostliny tolerující inhibiční herbicidy EPSPS zejména glyphosat, sulfosat nebo fosametin nebo tolerantní k inhibitorům acetolaktatsynthasy (ALS) typu sulfonylmočovina nebo také tolerantní k inhibitorům dihydropteroatsynthasy takovým, jako asulam nebo také k inhibitorům glutaminsynthasy takovým, jako glufosinat.

Jsou známy určité herbicidy takové, jako isoxazoly popsané zejména ve francouzských přihláškách vynálezů 95 06800 a 95 13570 a zejména isoxaflutol, selektivní herbicid kukuřice, diketonitrily takové, které jsou popsány evropských přihláškách vynálezů 0 496 630, 0 496 631, zejména 2-kyano-3-cyklopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenyl)propan-1,3-dion a 2-kyano-3-cyklopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3-Cl₂fenyl)propan-1,3-

-dion, triketony popsané v evropských přihláškách vynálezů 0 625 505 a 0 625 508, zejména sulcotrinon nebo také ty, které jsou popsány v USP 5 506 195, nebo také pyrazolinaty. Byl izolován gen kódující HPPD vyjadřující toleranci k těmto posledně jmenovaným herbicidům a získané transgenní rostliny ho obsahující vykazují významnou toleranci a tvoří tak předmět nepublikovaných francouzských přihlášek vynálezů N°95/06800, 95/13570 a 96/05944.

Ačkoliv zemědělská praxe ukazuje, že zemědělci rádi používají pro ošetření rostlin, zejména kulturních, spojení herbicidů zejména pro vyřešení různých problémů odplevelení, které jsou zaviněné omezením spektra herbicidů použitých izolovaně. Mimo jiné může být zajímavé disponovat značeným genem selekce spojeným s genem tolerantním k herbicidům. Ukazuje se, že je tedy potřeba rostlin a zejména kultur, které vyjadřují rezistenci k více herbicidům, přednostně alespoň ke dvěma nebo třem.

Nyní se ukázalo, že by se mohla udělit rostlinným buňkám a rostlinám několikanásobná tolerance k herbicidům.

Podstata vynálezu

Předložený vynález má za předmět vynálezu chimérický gen obsahující alespoň dva základní chimérické geny, které obsahují každý ve směru transkripce elementy regulace nezbytné pro transkripci v rostlinách, totiž obsahující alespoň regulační sekvenci promotoru, alespoň heterologní kódovanou část obsahující kódovanou sekvenci, která kóduje enzym udělující rostlinám toleranci k herbicidům a alespoň sekvenci regulace terminace nebo polyadenylace.

Jako kódovaná sekvence se může zejména použít každá známá sekvence pro udělení rostlinám tolerance k určitým inhibitorům, zejména:

-sekvence EPSPS pro toleranci ke glyphosatu, k sulfosatu nebo k fosametinu, zejména sekvence mutovaných nebo nemutovaných proteinů, sekvence uvedené v následujících dokumentech;

-USP 4 535060, EP 115 673, USP 4 769 061, USP 5 094 945; USP 4 971 908, USP 5 145 783, EP 293 358; EP 378 985, WO 91/04323; WO 91/04323; WO 92 044 449; WO 92 06201. Později tento typ genu bude označen sekvencí nebo genem "EPSPS".

Může se také uvést glyphosatoxydoreduktasa (viz WO 92/000 377) enzym detoxifikace glyphosatu.

-sekvence genu nitrilasy *Klebsiella* sp. pro toleranci k dihalogenbenzonitrilům popsány v USP 4 810 648, zejména sekvence pocházející z *Klebsiella ozanae*, která bude dále označena genem nebo sekvencí "OXY",

-sekvence HPPD popsaná v nepublikovaných francouzských přihláškách vynálezů N°95/06800, 95/13570 a 96/05944 uvedených dále. Tento HPPD může být přírodní.

Tato sekvence může být zejména bakteriálního původu, zejména rodu *Pseudomonas* nebo také rostlinného původu, zejména jednoděložných nebo dvouděložných rostlin, zejména *Arabidopsis* nebo okoličnatých rostlin jako je například karotka (*Daucus carota*). Mohou být přírodní, divoké nebo případně mutované při zachování rezistence k herbicidům proti inhibitorům HPPD takovým, jako jsou herbicidy skupiny isoxazolů nebo herbicidy skupiny triketonů nebo pyrazolinátů.

Mohou být použity další sekvence:

-sekvence fosphinotrycinacetyltransferasy nebo sekvence glutaminsynthasy pro toleranci ke glufosinatu (viz EP 0 242 236)

-sekvence dihydropteroatsynthasy pro toleranci k asulam (viz EP 0 369 367)

-sekvence ALS pro toleranci k sulfonylmočovině

-sekvence Protoporphyrigenoxydasy ("protox") pro toleranci k herbicidům skupiny difenyletherů takových, jako je acifluorfen nebo oxyfluorfen nebo skupiny oxadiazolů takových, jako je oxadiazon nebo oxadiargyl nebo skupiny cyklických imidů takových, jako je chlorophthalim nebo skupiny fenylypyrrazolů takových, jako je TNP nebo skupiny pyridinů a fenopylatů a karbamátových analogů (viz WO 95/34659).

Jeden z chimérických genů přednostně obsahuje sekvenci kódující HPPD. V tom případě druhá nebo druhé sekvence mohou být jakékoliv, zejména vybrané z množiny sekvencí, která je uvedena dále. Druhé sekvence jsou přednostně vybrané ze skupiny zahrnující gen nitrilasy tolerantní k dihalogenhydroxybenzonitrilům a gen EPSPS.

Chimérické geny podle vynálezu mohou mimo jiné obsahovat geny kódující vlastnosti jiné než je herbicidní tolerance, například geny rezistence ke hmyzu, například geny typu *Bacillus thuringensis* udělující rezistenci k různým představitelům čeledi Coleoptera a Lepidoptera nebo také geny rezistence ke hlístům, geny rezistence k fungicidním a mikrobiálním nemocem nebo také geny udělující agronomické vlastnosti a to geny různých desaturas působících při tvorbě mastných kyselin. Mohou se uvést zejména geny delta-6desaturasy popsané v mezinárodní přihlášce vynálezu WO 93/06712.

Jako sekvence regulace promotoru se může použít každá sekvence promotoru genu, který se exprimuje přirozeně v rostlinách, zejména se může uvést promotor bakteriálního, virového nebo rostlinného původu, jako například promotor genu malých podjednotek ribulosbiskarboxylasy (RuBisCO) nebo promotor genu α -tubulinu (Evropská přihláška vynálezu EP n° 0 652 286), nebo také genu rostlinného viru, například promotor

mozaiky kvěťáku (CaMV 19S nebo 356S), ale může být použit i každý jiný vhodný známý promotor. Zejména se obracíme k na sekvenci regulace promotoru, který upřednostňuje silnou expresi kódující sekvence takové, jako například sekvence, která obsahuje alespoň histonový promotor takový, jako je popsán v evropské přihlášce vynálezu EP 0507698.

Podle předloženého vynálezu se mohou také použít ve spojení se sekvencí regulace promotoru další sekvence regulace, které jsou umístěny mezi promotorem a kódující sekvencí takové jako jsou aktivátory transkripce "enhancer", například aktivátor translace viru etch tabáku (TEV) popsáný v přihlášce vynálezu WO87/07644 nebo tranzitní peptidy, buď jednoduché nebo dvojité, v tom případě případně oddělené intermediární sekvencí, totiž sekvencí obsahující ve směru transkripce sekvenci kódující tranzitní peptid rostlinného genu, který kóduje enzym v plastidiální lokalizaci, část sekvence vyvráté části N-konce rostlinného genu, který kóduje enzym v plastidiální lokalizaci a potom sekvenci, která kóduje druhý tranzitní peptid rostlinného genu, který kóduje enzym v plastidiální lokalizaci, tvořený částí sekvence vyvráté části N-konce rostlinného genu, který kóduje enzym v plastidiální lokalizaci takový, jaký je popsán v evropské přihlášce vynálezu n°0 508 909.

Jako sekvence regulace terminace nebo polyadenylace se může uvést každá odpovídající sekvence bakteriálního původu, jako například terminátor nos *Agrobacterium tumefaciens* nebo také sekvence rostlinného původu jako například histonový terminátor takový, jaký je popsán v evropské přihlášce vynálezu EP n°0 633 317.

Předložený vynález má také za předmět rostlinnou buňku jednoděložných a dvouděložných rostlin, zejména kulturních tolerantních alespoň ke dvěma herbicidům, z nichž alespoň jeden je inhibitor HPPD. Tato buňka může obsahovat alespoň dva chimérické geny obsahující každou sekvenci, která kóduje

toleranci k jednomu herbicidu a z kterých alespoň jeden obsahuje sekvenci kódující HPPD. Tyto dva chimérické geny mohou být nesený stejným vektorem nebo každý může být nesen jiným vektorem nebo také mohou být nesený takové, jako jsou a mohou být vloženy do buňky fyzikálně nebo chemickofyzikálně například mikroinjekcí, elektroporací nebo bombardováním podle známých metod.

Předložený vynález se také týká rostliny transformované pro toleranci alespoň ke dvěma herbicidům, z nichž jeden je inhibitor HPPD. Tato rostlina může být získána buď křížením alespoň dvou rostlin, které obsahují gen kódující toleranci k herbicidu nebo regenerací buňky podle vynálezu tak, jak je dále popsáno. Rostliny mohou být jednoděložné nebo dvouděložné, zejména kulturní, zejména velké kulturní rostliny takové, jako například, neomezeně pro dvouděložné, tabák, bavlna, řepka, soja, řepa a pro jednoděložné jako je kukuřice a slámové obiloviny nebo také zelinářské rostliny nebo květiny.

Předložený vynález se také týká metody získání rostlin tolerantních k herbicidům několikanásobnou rostlinnou transgenezí, vyznačenou tím, že:

- v první etapě se vloží do několika buněk jeden ze základních genů, který obsahuje element regulace nezbytný pro transkripci v rostlinách a kódovanou sekvenci kódující enzym, který uděluje toleranci k herbicidu,

- potom jsou rostliny kříženy, aby se získaly rostliny s několikanásobnou tolerancí.

Předložený vynález se také týká jiné metody získání rostlin s několikanásobnou herbicidní tolerancí rostlinnou transgenezí, týká se první etapy zahrnující integraci alespoň dvou genů tolerantních k herbicidu do rostlinné buňky, z nichž alespoň jeden je inhibitor HPPD a druhé etapy zahrnující regeneraci rostliny z transformovaných buněk podle

vynálezu.

Transformace může být získána prostřednictvím vhodných známých metod důkladně popsaných ve specializované literatuře a zejména v přihláškách vynálezů a v nárocích v předloženém vynálezu.

Série metod spočívá v bombardování buněk nebo protoplastů částicemi, ve kterých jsou zachyceny sekvence DNA. Podle předloženého vynálezu tyto DNA mohou být nesený stejnými částicemi nebo různými částicemi. Jiná série metod spočívá v použití jako prostředníka přenosu chimérického genu vloženého do plazmidu Ti *Agrobacterium tumefaciens* nebo Ri *Agrobacterium rhizogenes* do rostliny.

Mohou být použity další metody, a to metody, jako je mikroinjekce nebo elektroporace.

Odborník vybírá vhodnou metodu s ohledem na vlastnosti rostliny, zejména s ohledem na její charakter, zda se jedná o jednoděložnou nebo dvouděložnou rostlinu.

Bylo pozorováno, že rostliny transformované podle vynálezu mají významnou toleranci k inhibitorům hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy takovým, jako jsou nejnovější herbicidy například isoxazoly popsané zejména v francouzských přihláškách vynálezů 9506800 a 95 13570 a zejména 4-[4-CF₃-2-(methylsulfonyl)benzoyl]-5-cyklopropyl-izoxazol nebo "izoxaflutol" selektivní herbicid kukuřice, diketonitrily takové, jako jsou popsány evropských přihláškách vynálezů 0 496 630, 0496 631 zejména 2-kyano-3-cyklopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃fenyl)propan-1,3-dion a 2-kyano-3-cyklopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3-Cl₂fenyl)propan-1,3-dion, triketony popsané v evropských přihláškách vynálezů 0 625 505 a 0 625 508, zejména sulcotrinon a pyranosilaty. Rostliny podle vynálezu představují významnou toleranci k dalším herbicidům takovým, jako jsou například dihalogenodinitrily, zejména bromoxynil a ioxynil, glyphosat a jejich analogy a

glufosinat.

Předložený vynález se také týká rostlin regenerovaných z transformovaných buněk. Regenerace se získá všemi vhodnými metodami, které odpovídají povaze vzorku jako například metodou popsanou v předloženém vynálezu. Rostliny podle vynálezu mohou být také získány křížením rodičovských rostlin, které nesou jeden z popsaných genů herbicidní tolerance.

Předložený vynález se týká metody odplevelení rostlin, zejména kulturních rostlin, pomocí herbicidu tohoto typu vyznačeného tím, že se tento herbicid aplikuje na rostliny transformované podle vynálezu, jak v době po vysetí, před vzklíčením, tak po vzklíčení kultury. Herbicidem ve smyslu předloženého vynálezu se rozumí samotný aktivní herbicid nebo herbicid spojený s přísávkem, který modifikuje jeho účinnost jako například přísávek zvyšující aktivitu (synergizmus) nebo omezující aktivitu (anglicky safener).

Pro praktickou aplikaci herbicidů jsou dále uvedené herbicidy spojené známým způsobem s přísávkem obvykle používajícím se pro agrochemickou formulaci.

Podle předloženého vynálezu může být použit jeden z genů herbicidní tolerance vyjadřené v rostlinách jako mákr selekce buď in vitro nebo in vivo.

Následující obrázky a příklady blíže ilustrují vynález, aniž by však v jakémkoliv směru omezovaly jeho rozsah.

Příklady

Příklad 1: Izolace genu HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32

Od sekvence aminokyselin HPPD *Pseudomonas* sp. P.J. 874 (publikované Rüetschi U. et al., 1992. Eur. J. Biochem. 205: 459-466) se ovozuje sekvence kódující HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32 (izolována McKellarem, R.C. 1982 J. Appl. Bacteriol. 53: 305-316). Amplifikační fragment genu tohoto HPPD se použije pro křížení genomické banky *Pseudomonas fluorescens* A32 a také pro izolaci genu kódujícího tento enzym.

A) Příprava genomické DNA *P. fluorescens* A32.

Bakterie se kultivuje ve 40 ml minimální kultivační půdy M63 (13,6 g/l KH_2PO_4 , 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/l MgSO_4 , 0,005 g/l FeSO_4 pH 7 a 10 mM L-tyrosinu jako jediný zdroj uhlíku) při teplotě okolo 28°C po dobu 48 hodin.

Po promytí se buňky vloží do 1 ml lyzovacího pufru (100 mM tris HCl pH 8,3, 1,4 M NaCl a 10 mM EDTA) a inkubují po dobu 10 minut při teplotě 65°C. Po působení směsi fenol/chloroform (24/1) a působení chloroformu se nukleové kyseliny sráží přidavkem objemu isopropanolu, potom se vnesou do 300 μl sterilní vody a nakonec ošetří 10 mg/ml RNAasy. DNA se znovu vystaví působení směsi fenol/chloroform a působení chloroformu a znovu sráží přidavkem desetinného objemu 3M octanu sodného pH 5 a dvěma objemy ethanolu. DNA se potom vloží do sterilní vody a změní.

B) Výběr oligonukleotidů a syntéz

Ze sekvence aminokyselin HPPD *Pseudomonas* sp. P.J. 874 se vybere pět oligonukleotidů, dva řízené ve směru NH₂-konce k COOH-konci proteinu a tři řízené ve směru obráceném (viz Obrázek 1). Výběr se řídí následujícími dvěma pravidly:

- 3' konec stabilního nukleotidu, to znamená alespoň dvě base bez dvoujsmyslnosti.
- co možná nejmenší degenerace.

Vybrané oligonukleotidy mají následující sekvenci:

P1: 5' TA(C/T)GA(G/A)AA(C/T)CCATGGG3'

P2: 5' GA(G/A)ACIGGICCIATGGA3'

P3: 5' AA(C/T)TGCATIA(G/A)(G/A)AA(C/T)TC(C/T)TC3'

P4: 5' AAIGCIAC(G/A)TG(C/T)TG(T/G/A)ATICC3'

P5: 5' GC(C/T)TT(A/G)AA(A/G)TTICC(C/T)TCICC3'

Tyto oligonukleotidy se syntetizují na syntetizátoru "Cyclone plus DNA Synthesizer" značky MILLIPORE.

S těmito pěti oligonukleotidy pomocí metody PCR amplifikační fragmenty, které se musely teoreticky získat podle sekvence SEQ ID N°1, měly následující velikost.

se sekvencemi P1 a P3 -----> okolo 690 bp

se sekvencemi P1 a P4 -----> okolo 720 bp

se sekvencemi P1 a P5 -----> okolo 1000 bp

se sekvencemi P2 a P3 -----> okolo 390 bp

se sekvencemi P2 a P4 -----> okolo 420 bp

se sekvencemi P2 a P5 -----> okolo 700 bp

C) Amplifikace kódující části HPPD bakterie *Pseudomonas fluorescens* A32.

Amplifikace byla provedena na přístroji PCR PERKIN ELMER 9600 a s enzymem Taq-polymerase PERKIN ELMER, s vlastním pufrem za standartních podmínek, to znamená, že pro 50 μ l reakce je to 200 μ M NTP, 2,5 jednotek Taq-polymerasy a 5 μ g DNA bakterie *Pseudomonas fluorescens* A32.

Použitý amplifikační program byl následující: 5 minut při teplotě 95°C, potom 35 cyklů <45 sekund při teplotě 95°C, 45 sekund při teplotě 49°C, 1 minuta při teplotě 72°C> následovaných 5 minutami při teplotě 72°C.

Za těchto podmínek všechny získané fragmenty amplifikace měly velikost srovnatelnou s teoretickou velikostí uvedenou dále, což naznačuje dobrou specificitu amplifikací.

Fragmenty amplifikace získané kombinací sekvencí P1/P4, P1/P5 a P2/P4 jsou spojeny v pBSII SK(-) po digesci tohoto plazmidu působením Eco RV a nakonec působením transferasy v přítomnosti ddTTP, jak je popsáno v HOLTON T.A. a GRAHAM M.W. 1991 N.A.R. vol 19, n°5 p1156.

Klon všech těchto třech typů je částečně sekvenován; to umožňuje potvrdit, že byla dobře amplifikována ve všech třech případech část kódující oblasti HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32. Fragment P1/P4 se získá jako sonda pro křížení doplňkové genomické banky *Pseudomonas fluorescens* A32 a pro izolování úplného genu HPPD.

D) Izolace genu

Southernovým přenosem se ukazuje, že fragment o 7 Kbp po digesci DNA *Pseudomonas fluorescens* A32 restriktivním

enzymem BamHI se hybriduje se sondou HPPD P1/P4. Digeruje se 400 µg DNA *Pseudomonas fluorescens* A32 restriční enzymem BamHI a na agarosovém gelu se purifikují fragmenty DNA, které mají okolo 7 Kbp.

Tyto fragmenty jsou ligovány v pBSII SK(-), který je digеровán Bam HI a defosforylován působením alkalické fosfatasy. Po transformaci do *Escherichia coli* DH10b doplňková genomická banka se kříží se sondou HPPD P1/P4.

Izoloval se pozitivní klon a nazval se pRP A. Jeho zjednodušená mapa je uvedena na Obrázku 2. Na této mapě je naznačena pozice kódující části genu HPPD. Je tvořena 1077 nukleotidy, které kódují 358 nukleových kyselin (viz SEQ ID N°1). HPPD bakterie *Pseudomonas fluorescens* A32 představuje homologii aminokyselin s aminokyselinami *Pseudomonas* sp. druh P.J. 874, je zde až 92% identických kyselin mezi těmito dvěma proteiny (viz Obrázek 3).

Příklad 2: Konstrukce dvou chimérických genů se sekvencí HPPD.

Aby byla udělena rostlinám tolerance k herbicidům inhibujícím HPPD byly konstruovány dva chimérické geny:

První gen spočívá ve vložení kódující části genu HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32 pod řízení dvojitého histonového promotoru (Evropská přihláška vynálezu N°0 507 698) následující Tabacco etch virus translační enhancer (TEV) (pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597)) s terminátorem genu nopalinsynthasy. HPPD bude tedy umístěna v cytoplazmě.

Druhý gen bude identický k prvnímu genu až na to, že mezi aktivátor translace TEV a kódující část HPPD se vkládá optimální tranzitní peptid (OPT) (Evropská přihláška vynálezu

N°0 508 909). HPPD bude tedy umístěna v chloroplastu.

A) Konstrukce vektoru pRPA-RD-153;

- pRPA-RD-11:

Derivát pBS-II SK(-) (Stratagen katalog #212206) obsahující místo polyadenylace nopalinsynthasy (NOS polyA) (Evropská přihláška vynálezu N°0 652 286) se klonuje mezi místy *KpnI* a *SallI*. Místo *KpnI* se transformuje v místě *NotI* působením T4 DNA-polymerasy za přítomnosti 150 μ M deoxynukleotidtrifosfátů potom liguje s linkerem *NotI* (Stratagen katalog #1029). Tak se získá kazeta klonování NOS polyA.

- pRPA-RD-127:

Derivát pRPA-BL-466 (Evropská přihláška vynálezu N°0 0337 899) klonován v pRPA-RD-11 vytvářející kazetu exprese genu *oxy* a obsahující promotor peptidové podjednotky ribulosobikarboxylasy:

"promotor (SSU) - *oxy* gen - NOS polyA"

Aby se vytvořil tento plazmid byl pRPA-BL-488 digerován *XbaI* a *HindIII*, aby se izoloval fragment o 1,9 kpb obsahující promotor SSU a gen *oxy*, který byl ligován v plazmidu pRPA-RD-11 řízený kompatibilními enzymy.

-pRPA-RD-132:

Je to derivát pRPA-BL-488 (Evropská přihláška vynálezu N°0 507 698) klonován v pRPA-RD-127 s vytvořením kazety exprese genu *oxy* s dvojitým histonovým promotorem:

"dvojitý histonový histone - *oxy* gen - NOS polyA"

Pro vytvoření tohoto plazmidu byl pRPA-BL-466 digerován pomocí *HindIII*, ošetřený Klenowem, potom znovu digerován pomocí *NcoI*. Purifikovaný fragment o 1,35 kbp obsahující

dvojitý histonový promotor H3A748 byl ligován s plazmidem pRPA-RD-127, který by mohl být digеровán pomocí XbaI, ošetřen Klenowem a znovu digеровán pomocí NcoI.

-pRPA-RD-153:

Je to derivát pRPA-BL-132 obsahující aktivátor translace tabákového viru etch (TEV). pRTL-GUS (Carrington and Freed, 1990; J. Virol. 64: 1590-1597) byl digеровán pomocí NcoI a EcoRI a fragment o 150 bp byl ligován v pRPA-RD-132 digеровaném stejnými enzymy. Tak byla vytvořena kazeta exprese obsahující promotor:

"dvojitý histonový promotor - TEV - oxy u - NOS polyA"

B) Konstrukce vektoru pRPA-RD-185

- pUC19/GECA:

Je to derivát pUC-19 (Gibco katalog #15364-011) obsahující počet klonovacích míst. pUC-19 byl digеровán EcoRI a ligován s oligonukleotidovým linkerem 1:

Linker 1: AATTGGGCCA GTCAGGCCGT TTAAACCCTA GGGGGCCCG

CCCGGT CAGTCCGGCA AATTTGGGAT CCCCCGGC

TTAA

Vybraný klon obsahuje místo EcoRI následované polylinkerem, který obsahuje následující místa: *EciRI*, *ApaI*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI*, *SphI* a *HindIII*.

- pRPA-RD-185:

je to derivát pUC19/GECA obsahující modifikovaný polylinker. pUC19/GECA je digеровán pomocí *HindIII* a ligován s oligonukleotidovým linkerem 2:

Linker 2: AGCTTTTAAT TAAGGCGCGC CCTCGAGCCT GGTTCAGGG

AAATTA ATTCCGCGCG GGAGCTCGGA CCAAGTCCC

TCGA

Vybraný klon obsahuje místo HindIII, místo v prostředí polylinkeru, který obsahuje zejména následující místa: *EciRI*, *ApaI*, *AvrII*, *PmeI*, *SfiI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*, *PacI*, *AscI* *XhoI* a *EcoNI*.

C) Konstrukce vektoru pRP T:

- pRP O:

je to derivát pRPA-RD-153 obsahující kazetu exprese HPPD, dvojitý histonový promotor - TEV - gen HPPD - terminátor NOS. Aby se vytvořil pRP O byl pRPA-RD153 digеровán pomocí Hind III, ošetřený Klenowem potom opět digеровán pomocí NcoI, aby se odstranil gen oxy a nahradil genem HPPD vzniklým z plazmidu pRP A digescí BstEII, působením Klenowa a opětnou digescí pomocí NcoI.

- pRP R:

pro jeho získání byl plazmid pRP O digеровán pomocí PvuII a SacI, chimérický gen byl purifikován potom ligován v pRPA-RD, který byl digеровán pomocí PvuII a SacI.

- pRP T:

byl získán ligací chimérického genu vzniklého z pRP R po digesci pomocí SacI a HindIII v plazmidu pRPA-BL 150 alpha2 digеровaný stejnými enzymy (Evropská přihláška vynálezu EP N° 0 508 909).

Chimérický gen vektoru má následující strukturu:

dvojitý histonový promotor	TEV	kódující oblast HPPD	terminátor nos
----------------------------------	-----	-------------------------	----------------

D) Konstrukce vektoru pRP V

- pRP P:

je to derivát pRPA-RD-7 (Evropská přihláška vynálezu EP n°0 652 286) obsahující optimalizovaný tranzitní peptid následovaný genem HPPD. Byl získán ligací kódující části HPPD vzniklé z pRP A digescí BstEII a NcoI působením Klenowa a plazmidu pRPA-RD-7, který byl digеровán SphI a AccI a ošetřen DNA-polymerasou T4.

- pRP Q:

pRP Q byl odvozen od pRPA-RD-153 obsahující optimální kazetu exprese HPPD, dvojitý histonový promotor - TEV - OTP - gen HPPD - terminátor NOS. Aby se vytvořil pRP Q byl pRPA-RD-153 digеровán pomocí Sal I ošetřený Klenowem potom opět digеровán pomocí NcoI, aby se odstranil gen oxy a nahradil genem HPPD vzniklým z plazmidu pRP A digescí BstEII, působením Klenowa a opětnou digescí pomocí NcoI.

- pRP S:

pro jeho získání byl plazmid pRP Q digеровán pomocí PvuII a SacI, aby vznikl chimérický gen, který byl ligován v pRPA-RD-185, který byl digеровán pomocí PvuII a SacI.

- pRP V:

byl získán ligací chimérického genu vzniklého z pRP S po digesci pomocí SacI a HindIII v plazmidu pRPA-BL 150 alpha2 (Evropská přihláška vynálezu EP N°0 508 909).

Chimérický gen vektoru má následující strukturu:

dvojitý histonový promotor	TEV	OTP	kódující oblast HPPD	terminátor nos
----------------------------------	-----	-----	-------------------------	----------------

Příklad 3: Transformace průmyslového tabáku PBD6

Aby se určil účinek těchto dvou chimérických genů, byly tyto geny transformovány do průmyslového tabáku PBD6 podle transformačních postupů a podle postupů regenerace již popsáných v evropské přihlášce vynálezu EP N°0 508 909.

1) Transformace:

Vektor byl vložen do neonkogenního kmene *Agrobacterium* EHA 101 (Hood et al., 1987) nesoucího kosmid pTVK 29 (Komari et al., 1986). Technika transformace je založena na metodě popsané Horshem et al., (1985) v Science, 227, 1229-1231°.

2) Regenerace:

Regenerace tabáku PBD6 (pochází z SEITA France) z listových fragmentů byla provedena v kultivačním prostředí Murashige et Skoog (MS) obsahujícím 30 g/l sacharosy stejně jako 100 µg/ml kanamycinu. Listové části rostlin byly přeneseny na rostliny ve skleníku nebo in vitro a transformovány podle techniky listových terčů (Science 1985, Vol 227, p. 1229-1231) ve třech následných etapách: První etapa zahrnuje indukci výhonků na kultivační půdě MS obohacené o 30 g/l sacharosy obsahující 0,05 mg/l naftyloctové kyseliny (ANA) a 2 mg/l benzylaminopurinu (BAP) po dobu 15 dní. Výhonky vytvořené v průběhu této etapy byly

potom podrobeny kultivaci v mediu MS, které bylo obohaceno o 30 g/l sacharosy, ale neobsahovalo žádný hormon, po dobu 10 dní. Potom byly vyvinuté výhonky odebrány a kultivovány v kultivační půdě pro zakoření MS s polovičním obsahem solí, vitamínů a cukrů a s žádným obsahem hormonů. Po 15 dnech byly zakořené výhonky vloženy do půdy. Získané rostliny byly nazvány Co 17.

Transformované rostliny tabáku byly aklimatizovány ve skleníku (60% relativní vlhkost; teplota: 20°C přes noc a 23°C během dne) po dobu pěti týdnů a pak ošetřeny 4-[4-CF₃-2-(methylsulfonyl)benzoyl]-5-cyklopropyl-izoxazolem.

Kontrolní tabák, netransformovaný a ošetřený 4-[4-CF₃-2-(methylsulfonyl)benzoyl]-5-cyklopropyl-izoxazolem v dávkách od 50 do 400 g/ha vyvinul během 72 hodin chlorózy, které se zvětšily, aby se vyvinuly velmi výrazné nekrózy v jednom týdnu (pokrývající okolo 80% listů).

Po transformaci tohoto tabáku, který silně exprimuje HPPD *P. fluoresces* je tato rostlina velmi dobře ochráněna proti ošetření 4-[4-CF₃-2-(methylsulfonyl)benzoyl]-5-cyklopropyl-izoxazolem v dávce 400 g/ha.

Jestliže je tento silně exprimovaný enzym v chloroplastu, totiž je-li jeho transformace provedena s genem neseným vektorem pRP V, tak je rostlina úplně ochráněna a nevyjadřuje žádný symptom.

Příklad 4: Transformace průmyslového tabáku PBD6 s genem EPSPS pro => konstrukce 173

Izolace cDNA kódující EPSPS kukuřice:

Byly popsány různé etapy, které vedly k získání cDNA EPSPS kukuřice, které sloužily substrátu k vložení dvou

mutací. Každá tato operace popsaná dále je uvedená v příkladech a odpovídá výběru mezi účinnými metodami vhodnými pro získání stejných výsledků. Tento výběr nemá žádný vliv na kvalitu výsledků a naopak, každá přizpůsobená metoda může být odborníky použita pro získání stejných výsledků. Většina metod komplexních projektových studií fragmentů DNA je popsána v "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 a 2, Ausubel F.M. et al., publikovaný Greene Publishing Associates et Wiley - Interscience (1989) (V další části práce budou odkazy citovány jako "ref. CPMB"). Operace zahrnující DNA, které byly provedeny podle protokolů popsanych v této práci jsou zejména následující: ligace fragmentů DNA, působení DNA-polymerasy podle Klenowa a působení T4 DNA-polymerasy, příprava DNA plazmidu a bakteriofágů λ buď minipreparací nebo maxipreparací, analýza DNA a RNA podle technik Southern a Northern. V této práci byly popsány i jiné metody a jejich modifikace nebo významné úpravy těchto metod v protokolech.

1. Získání fragmentu EPSPS *Arabidopsis thaliana*

a) dva oligonukleotidy 20 mer následujících sekvencí

5'-GCTCTGCTCATGCTGCTCC-3'

5'-GCCCCFCCCTTGACAAAGAAA-3'

se syntetizují od sekvence genu EPSPS *Arabidopsis thaliana* (Klee H.J. et al., (1987) Mol. Gen. Genet., 210, 437-442). Tyto dva oligonukleotidy jsou v poloze 1523 až 1543 a 1737 až 1717 publikované sekvence a v konvergentní orientaci.

b) úplná DNA *Arabidopsis thaliana* (var. *columbia*) se získá od Clontech (katalogový odkaz: 6970-1)

c) Smíchá se 50 nanogramů (ng) DNA s 300 ng každého

oligonukleotidu a podrobí se 35 amplifikačním cyklům pomocí přístroje Perkin-Elmer 9600 za podmínek standardního prostředí pro amplifikaci podle doporučení výrobce. Výsledný fragment o 204 pb obsahuje fragment EPSPS *Arobidopsis thaliana*.

2. Konstrukce knihovny cDNA od buněčné linie kukuřice BMS.

a) Rozmačká se 5g filtrovaných buněk do kapalného dusíku a nukleové kyseliny se extrahují podle metody popsané Shure et al., s následujícími modifikacemi:

- pH lyzovacího pufru je udržováno na hodnotě 9,0
- po srážení isopropanolem, sraženina se vloží do vody a po rozpuštění se koncentrace upraví na 2,5 M LiCl. Po inkubaci po dobu 12 hodin při °C se sraženina po odstředování po dobu 15 minut při 30000g při teplotě 4°C se znovu rozpuští. Opakuje se srážení pomocí LiCl. Znovu rozpuštěná sraženina obsahuje frakci RNA nukleových kyselin.

b) Frakce RNA-polyA+ frakce RNA se získá chromatograficky na celulosové koloně oligo-dT takové, jaká je popsána v "Current Protocols in Molecular Biology".

c) Syntéza dvouvláknové cDNA se syntetickým koncem EcoRI: se provede podle protokolu dodavatele nezbytných reagentů pro tuto syntézu ve formě soupravy: "copy kit" společnosti In Vitrogen.

Dva jednovláknové oligonukleotidy komplementární sekvencím:

5'-AATCCCGGG-3'

5'-CCCGGG-3' (tato sekvence byla fosforylována)

se ligují s dvouvláknovou cDNA s přesahujícími konci.

Tato ligace adaptorů vytvoří místo Sma I spojené s dvouvláknovou cDNA a EcoRI v kohezní formě ke každému konci dvouvláknové cDNA.

d) Vytvoření knihovny:

cDNA, které mají na svých koncích umělá kohezní místa EcoRI se ligují s cDNA bakteriofága λ gt10 štěpeného EcoRI a defosforylovaného podle protokolu dodavatele New England Biolabs.

Alikvotní část ligační reakce se enkapsiduje in vitro s extrakty enkapsidace.: Gigapak Gold podle doporučení dodavatele, tato knihovna se označí za použití bakterie *E. coli* C600hfl. Takto získaná knihovna se amplifikuje a skladuje podle doporučení výrobce a tvořila knihovnu cDNA buněčné suspenze kukuřice BMS.

3. Třídění knihovny cDNA buněčné suspenze kukuřice BMS se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana*:

Následující protokol je protokol "Current Protocols in Molecular Biology" Vol. 1 a 2, Ausubel F.M. et al., publikován Greene Publishing Associates a S (1989) (CPMB). Ve zkratce: okolo 10^6 rekombinantních fágů se rozprostře na kultivační misce LB s průměrnou denzitou 100 fágů / cm^2 . Fágy po lyse se replikují dvojnásobně na membráně Hybond N Amersham.

h) DNA se fixuje na filtrech působením UV 1600kJ (Stratalinker Stratagene). Iontové filtry se předem hydridují v 6xSSC/0,1% SDS/0,25 odtučeného mléka po dobu 2 hodin při teplotě 65°C. Sonda EPSPS *Arabidopsis thaliana* se značí 32p-dCTP "random-priming" podle doporučení výrobce (Kit Ready to Go Pharmacia). Získaná specifická aktivita se upraví na hodnotu 10^8 cpm na μg fragmentu. Po denaturaci během 5 minut při teplotě 100°C, se sonda přidá do prostředí

prehybridace, hybridace se sleduje po dobu 14 hodin při teplotě 55°C. Filtry se fluorografují 48 hodin při teplotě -80°C filmem Kodak XAR5 a zesilovačem Hyperscreen RPN Amersham. Postavení pozitivních bodů na filtru s miskami, kde vznikly umožňuje odebrat na misce zónu odpovídající fágům, které vyjadřují pozitivní hybridační odpověď se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana*. Tato etapa rozložení, přenos, hybridace, získání je opakována až do doby, kdy všechny body fágů na kultivační misce postupně purifikované se ukazují pozitivní ve 100% hybridace. Plak lysy samostatným fágem se vloží do rozředěné půdy λ (Tris-Cl pH=7,5; 10 mM $MgSO_4$; 0,1 M NaCl; 0,1% želatiny), tyto fágy v roztoku tvoří pozitivní klony EPSP buněčné suspenze kukuřice BMS.

4. Příprava a analýza DNA klonů EPSPS buněčné suspenze kukuřice BMS.

Přibližně $5 \cdot 10^8$ fágů se přidá ke 20 ml bakterií C600hfl o 2 OD 600 nm/ml a inkubuje po dobu 15 minut při teplotě 37°C. Tato suspenze se rozředí v 200 ml bakteriální kultivační půdy v Erlenmayerově baňce o obsahu 1 litr a míchá na rotačním míchadle při 250 rpm. Lysa se zjišťuje vyčeřením půdy, což odpovídá lyse bakteriálního zákalu a objevuje se po 4 hodinách míchání. Supernatant se zpracuje tak, jak je popsáno v "Current Protocols in Molecular Biology". Získaná DNA odpovídá klonům EPSP buněčné suspenze kukuřice BMS.

Jeden až dva μg této DNA se štěpí pomocí EcoRI a separuje na 0,8% agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPMB). Poslední ověření spočívá v ujištění, že purifikovaná DNA představuje signál hybridizace se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana*. Po elektroforéze se fragmenty DNA přenesou na membránu Hybond N Amersham podle protokolu Southern popsaného v "Current Protocols in Molecular Biology". Filtr se hybriduje se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana* podle podmínek

popsaných v paragrafu 3. Klon představující signál hybridizace se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana* a obsahující nejdelší fragment EcoRI má velikost stanovenou na gelu okolo 1,7 kpb.

5. Získání klonu pRPA-ML-711

Deset μ g DNA fágového klonu obsahujícího inzert o 1,7 kpb se digeruje pomocí EcoRI a separuje na 0,8% agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPMB). Fragment gelu, který obsahuje inzert o 1,7 kpb se vyřízne z gelu zbarveného BET a fragment se ošetří β -agarosou podle doporučení dodavatele New a Biolabs. Purifikovaná DNA fragmentu o 1,7 kpb se liguje při teplotě 12°C po dobu 14 hodin s DNA plazmidu pUC 19 (New England Biolabs), štěpí pomocí EcoRI podle protokolu ligace popsaného v "Current Protocols in Molecular Biology". Dva μ l ligační směsi se použije pro transformaci alikvotní části *E. coli* DH10B elektrokompetentní; transformace se provádí elektroporací za použití následujících podmínek: směs příslušných bakterií a ligační půda se vloží do kyvety pro elektroporaci o tloušťce 0,2 cm (Biorad) předem zchlazené na 0°C. Fyzikální podmínky elektroporace využívající elektroporátor značky Biorad jsou: 2500 Voltů, 25 μ g Faradů a 200 Ω . Za těchto podmínek čas výboje kondenzátoru je okolo 4,2 milisekund. Bakterie se vloží do 1 ml půdy SOC (ref. CPMB) a míchají se po dobu jedné hodiny při 200 rpm na rotačním míchadle ve zkumavkách Corning o objemu 15 ml. Po rozložení na půdě LB/agar doplněné 100 μ g/ml carbenicilinu, se provede minipreparace bakteriálních klonů po noci při teplotě 37°C podle protokolu popsaného v "Current Protocols in Molecular Biology". Po digesci pomocí EcoRI DNA a separaci pomocí elektroforézy na 0,8 % agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPMB) jsou klony představující inzert o 1,7 kpb konzervovány. Poslední ověření spočívá v ujištění, že purifikovaná DNA

představuje signál hybridizace se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana*. Po elektroforéze se fragmenty DNA přenesou na membránu Hybond N Amersham podle protokolu Southern popsaného v "Current Protocols in Molecular Biology". Filtr se hybriduje se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana* podle podmínek popsanych v paragrafu 3. Plazmidový klon představující inzert o 1,7 kpb se sondou EPSPS *Arabidopsis thaliana* se připraví v největším množství a výsledná DNA pocházející z lysy bakterií se purifikuje v gradientu CsCl tak, jak je popsáno v "Current Protocols in Molecular Biology". Purifikovaná DNA se částečně sekvenuje soupravou Pharmacia za dodržení doporučení dodavatele a za použití jako nástrojů univerzálních nástrojů M13, přímých a inverzních, objednaných od stejného dodavatele. Vytvořená částečná sekvence pokrývá okolo 0,5 kpb. Aminokyseliny odvozené sekvence v oblasti vyzrálého proteinu (okolo 50 zbytkových aminokyselin) představují 100% identitu s aminovou sekvencí odpovídající vyzrálé EPSPS kukuřice popsané v americké přihlášce vynálezu USP 4 971 908). Tento klon odpovídající fragmentu EcoRI o 1,7 kpb kyseliny DNA EPSP kukuřičné buněčné susupenze BMS byl nazván pRPA-ML-711. Úplná sekvence tohoto klonu se provádí na dvou vláknech za použití protokolu soupravy Pharmacia a za syntézy komplementárních oligonukleotidů a všech opačných směrů o 250 pb. Získaná úplná sekvence klonu o 1713 pb je vyjádřena SEQ ID N°2.

6. Získání klonu pRPA-ML-715:

Analýza sekvence klonu pRPA-ML-711 a zejména porovnání odvozených sekvence aminokyselin se sekvencí aminokyselin kukuřice ukazuje rozšíření sekvence o 92 pb proti směru kodonu GCG kódujícího Alanin NH₂-konce části zralého EPSPS kukuřice (americká přihláška vynálezu USP 4 971 908). Lze dokonce pozorovat rozšíření o 288 pb po směru kodonu AAT

kódujícího asparagin COOH-konce vyzrálé části EPSPS kukuřice (americká přihláška vynálezu USP 4 971 908). Tyto dvě části by měly odpovídat pro rozšíření HN_2 -konce části sekvence tranzitního peptidu plastidiální lokalizaci a pro extenzi 3'oblasti COOH-konce nepřeložené cDNA.

Aby se získala cDNA kódující vyzrálou část cDNA EPSPS kukuřice tak, jak je popsáno v USP 4 971 908, byly provedeny následující operace:

a) Eliminace nepřeložené 3'oblasti: konstrukce pRPA-ML-712:

Klon pRPA-ML-711 se štěpí restriční enzymem AseI a vzniklé konce tohoto štěpení se zbaví přesahů působením Klenowa fragmentu DNA-polymerasy I podle protokolu popsaného v CPMB. Potom se provede štěpení restriční enzymem SacII. Výsledná DNA pocházející z těchto operací se separuje elektroforeticky na 1% agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPBM).

Fragment gelu obsahující inzert "AseI-přesahující konce/SacII" o 0,4 kpb se vyřízne z gelu a purifikuje podle protokolu popsaného v paragrafu 5. DNA klonu pRPA-ML-711 se štěpí restriční enzymem HindIII umístěným v polylinkeru vektoru klonovaném pUC19 a výsledné konce tohoto štěpení se zbaví přesahů působením Klenowa fragmentu DNA-polymerasy I. Potom se provede štěpení restriční enzymem SacII. Výsledná DNA pocházející z těchto operací se separuje elektroforeticky na 0,7 % agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPBM).

Fragment gelu obsahující inzert HindIII-přesahující konce/SacII o 3,7 kpb se vyřízne z gelu a purifikuje podle protokolu popsaného v paragrafu 5.

Ligují se dva inzerty a 2 μl ligační směsi pak slouží k transformaci *E. coli* DHIOB tak, jak je výše popsáno v paragrafu 5.

Analyzoval se obsah plazmidové DNA různých klonů podle

protokolu popsaného pro pRPA-ML-711. Jeden z plazmidových klonů obsahuje inzert EcoRI-HindIII o 1,45 kpb. Konce sekvence tohoto klonu prozrazují, že 5'konec inzertu přesně odpovídá konci odpovídajícímu pRPA-ML-711 a že 3'konec je vyjádřen následující sekvencí:

"5'-AATTAAGCTCTAGAGTCCTGCAGGCATGCAAGCTT-3'".

Podtržená sekvence odpovídá kodonu aminokyseliny COOH-konce asparaginu, následující kodon odpovídá terminačnímu kodonu translace. Nukleotidy po směru odpovídají elementům sekvence polylinkeru pUC19. Tento klon obsahující sekvenci pRPAML-711 až k místu terminace translace vyzrálého EPSPS kukuřice a následné sekvence polylinkeru pUC19 až k místu HindIII byl pojmenován pRPA-ML-712.

b) Modifikace 5'konce pRPA-ML-712: konstrukce pRPA-ML-715

Klon pRPA-ML-712 se štěpí restričními enzymy PstI a HindIII. DNA pocházející z této manipulace se separuje elektroforeticky na 0,8 % agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPBM). Fragment gelu obsahující inzert PstI/EcoRI o 1,3 kpb se vyřízne z gelu a purifikuje podle protokolu popsaného v paragrafu 5. Tento inzert se podrobí ligaci za přítomnosti ekvimolárního množství každého oligonukletidu částečně komplementárního následující sekvence:

Oligo 1:

5'-GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGCA-3'

Oligo 2:

5'-GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCCATGGAGCTCGGCTC-3'

stejně jako v přítomnosti DNA plazmidu pUC19 digerovaného restričními enzymy BamHI a HindIII.

Dva μ l ligační směsi se podrobí transformaci *E. coli*

DHIOB tak, jak je popsáno výše v paragrafu 5. Po analýze obsahu plazmidové DNA různých klonů, podle postupu popsaného v paragrafu 5, klony vyjádřené v inzertu o 1,3 kpb se konzervují pro pozdější analýzu. Sekvence 5'konce zachovaného klonu odhaluje, že sekvence DNA v této oblasti je následující: sekvence polylinkeru pUC19 míst EcoRI až BamHI následovaná sekvencí oligonukleotidů použitých ke klonování a následovaná zbytkem sekvence přítomné v pRPAML-712. Tento klon byl pojmenován pRPA-ML-713. Tento klon vyjadřuje kodon methioninu ATG obsažený v místě NcoI proti směru kodonu alaninu N-konce vyzrálé EPSPSsynthasy. Navíc kodony alaninu a glycinu N-konce se zachovávají s modifikací na třetí proměnlivé basi: počáteční GCGGGT dává modifikovaný GCCGGC.

Klon pRPA-ML-713 se štěpí restriční enzymem HindIII a přesahující konce tohoto štěpení se odstraní působením Klenowovou DNA polymerasou I. Potom se provede štěpení restriční enzymem SacI. DNA, která vznikla těmito operacemi se separuje elektroforeticky na 0,8% agarosovém gelu LGTA/TBE (ref. CPBM). Fragment gelu obsahující inzert "HindIII-přesahující konce/SacI" o 1,3 kpb se vyřízne z gelu a purifikuje podle protokolu popsaného v paragrafu 5. Tento inzert se podrobí ligaci za přítomnosti DNA plazmidu pUC19 digerovaného restriční enzymem XbaI a přesahující konce se odstraní tímto štěpením působením Klenowovou DNA polymerasou I. Potom se provede štěpení restriční enzymem SacI. Dva µl ligační směsi se podrobí transformaci *E. coli* DHIOB tak, jak je popsáno výše v paragrafu 5, klony vyjádřené v inzertu o 1,3 kpb se konzervují pro pozdější analýzu. Sekvence konců zachovaného klonu naznačuje, že sekvence DNA je následující: sekvence polylinkeru pUC19 míst EcoRI až SacI následovaná sekvencí oligonukleotidů použitých ke klonování deletovaných 4 pb GATCC popsaného oligonukleotidu 1 následovaná zbytkem sekvence přítomné v pRPAML-712 až k místu HindIII a sekvencí polylinkeru pUC19 XbaI až HindIII. Tento klon byl pojmenován

pRPA-ML-715.

7) Získání cDNA kódující mutovaný EPSPS kukuřice

Všechny etapy mutagenese se provedou s USE mutagenní soupravou Pharmacia za dodržení podmínek určených dodavatelem. Princip systému mutagenese je následující: plazmidová DNA se denaturuje teplem a znovu spojí v přítomnosti molárního nadbytku části oligonukleotidu mutagenese a další části oligonukleotidu umožňujícího eliminovat místo restrikčního enzymu přítomného v polylinkeru. Po této etapě opětného spojení se provede syntéza komplementárního vlákna působením T4 DNA-polymerasy v přítomnosti T4 DNA-ligasy a proteinu genu 32 v pufru doporučeném dodavatelem. Produkt syntézy se inkubuje v přítomnosti restrikčního enzymu, jehož místo se předpokládá odstranit mutagenesí. Kmen *E. coli* vyjadřující zejména mutaci *mutS* se použije jako hostitel pro transformaci této DNA. Po růstu v kapalně kultivační půdě je plazmidová DNA připravena a inkubovaná v přítomnosti restrikčního enzymu použitého předem. Po tomto ošetření kmen *E. coli* DH10B se použije jako hostitel pro transformaci. Plazmidová DNA izolovaných klonů je připravena a přítomnost mutace se ověří sekvenováním.

A) modifikace míst nebo sekvence bez vlivu na vlastnosti rezistence EPSPS kukuřice ke kompetitivním inhibitorům aktivity EPSP synthasy: eliminace místa *NcoI* interního pRPA-ML-715.

Sekvence pRPA-ML-715 se očísluje arabskými číslicemi při umístění první base kodonu alaninu N-konce GCC v poloze 1. Tato sekvence vyjadřuje *NcoI* v poloze 1217. Modifikovaný oligonukleotid místa představuje sekvence:

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Po sekvenování podle odkazů na odbornou literaturu uvedenou dále sekvence lue po mutagenezi odpovídá sekvenci použitého oligonukleotidu. Místo NcoI se eliminuje a translace nukleových kyselin v této oblasti zachovává počáteční sekvenci přítomnou v pRPA-ML-715.

Tento klon je pojmenován jako pRPA-ML-716.

Sekvence o 1340 bp tohoto klonu je vyjádřena sekvencí SEQ ID N°3 a SEQ ID N°4.

B) modifikace sekvence umožňující zlepšení rezistenčních vlastností EPSPS kukuřice k kompetitivním inhibitorům aktivity EPSP-synthasy.

Použily se následující oligonukleotidy:

a) mutace Thr 102 => Ile.

5'-GAATGCCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) mutace Pro 106 => Ser.

5'-GAATGCCTGGAAGTCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

c) mutace Gly 101 => Ala a Thr 102 => Ile.

5'-CTTGGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

d) mutace Thr 102 => Ile a Pro 106 => Ser.

5'-GGGGAATGATCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

Po sekvenování sekvence lue po mutagenezi na třech mutovaných fragmentech je identická rodičovské sekvenci DNA pRPA-ML-716 kromě mutagenizované oblasti, která odpovídá sekvenci použité oligonukleotidové oblasti. Tyto klony jsou nazvány: pRPA-ML-717 pro mutaci Thr 102 => Ile, pRPA-ML-718 pro mutaci Pro 106 => Ser, pRPA-ML-719 pro mutace Gly 101 => Ala a Thr 102 => Ile, pRPA-ML-720 pro mutace Thr 102 => Ile a Pro 106 => Ser.

Sekvence o 1340 bp pRPA-ML-720 je vyjádřena SEQ ID N°5

a SEQ ID N°6.

Inzert NcoI-HindIII o 1395 pb je základem všech konstrukcí použitých pro transformaci rostlin pro vložení rezistence ke kompetitivním herbicidním inhibitorům EPSPS a zejména rezistence ke glyphosatu. Tento inzert bude dále pojmenován jako "dvounásobný mutant EPSPS kukuřice".

B. Tolerance ke glyphosatu různých mutantů in vitro.

2a: Extrakce EPSP-synthasy

Do plazmidového vektoru pTrc99a (Pharmacia, ref. 27-5007-01) štěpeného NcoI a HindIII se vloží se různé geny EPSP-synthasy ve formě kazety NcoI-HindIII. Rekombinantní *E. coli* DH10B silně exprimující různé EPSP-synthasy se sonifikují ve 40 ml pufru pomocí 10 g usazených buněk a promyjí stejným pufrem (200 mM tris HCl pH 7,8, 50 mM merkaptoethanol, 5 mM EDTA a 1 mM PMSF), ke kterému se přidá 1 g polyvinylpyrolidonu. Suspenze se míchá po dobu 15 minut při teplotě 4°C a potom se odstřeďuje po dobu 20 minut při 27000 g a teplotě 4°C.

Supernatant se přidá k síranu amonnému až po dosažení 40% nasycenosti síranu amonného. Směs se odstředí po dobu 20 minut při 27000 g a teplotě 4°C.

Nový supernatant se přidá k síranu amonnému až po dosažení 70% nasycenosti roztoku síranu amonného. Směs se odstředí po dobu 30 minut při 27000 g a teplotě 4°C. EPSP-synthasa přítomná v proteinové usazenině se vloží do 1 ml pufru (200 mM tris HCl pH 7,8, 50 mM merkaptoethanol). Tento roztok se dialyzuje přes noc proti dvěma litrům tohoto pufru při teplotě 4°C.

2b: Enzymová aktivita

Aktivita každého enzymu stejně, jako jeho rezistence ke glyphosatu se měří in vitro po dobu 10 minut při teplotě 37°C

v následující reakční směsi: 100 mM kyselina maleinová pH 5,6, 1 mM fosfoenolpyruvát, 3 mM šikimát-3-fosfát (připravený podle Knowles P. F. et Sprinson D. B. 1970. Methods in Enzymol 17A, 351-352 od *Aerobacter aerogenes* druh ATCC 25597) a 10 mM fluorid vápenatý. Enzymový extrakt se přidá na poslední chvíli po přidání glyphosatu, jehož konečná koncentrace se pohybuje od 0 do 20 mM.

Aktivita se měří množstvím uvolněného fosfátu podle techniky Tausky H. A. et Shorr E. 1953. J. Biol. Chem. 202, 675-685. Za těchto podmínek divoký enzym (WT) se inhibuje 85 % při koncentraci 0,12 mM glyphosatu. V této koncentraci mutovaný enzym známý jako Ser106 se inhibuje jen z 50% a tři další mutanti Ile 102, Ile 102/Ser106, Ala101/Ile102 nejsou nebo jsou málo inhibované.

Je tedy potřeba znásobit koncentraci glyphosatu desetkrát, a to až na 1,2 mM, pro 50% inhibici mutovaného enzymu Ile102 u třech dalších mutantů Ile102, Ile102/Ser106 a Ala101/Ile102 a nebyla nikdy inhibice pozorována.

Je potřeba poznamenat, že aktivita mutantů Ala/Ile a Ala nebyla inhibována až do koncentrace 10 mM glyphosatu, a že aktivita mutantu Ile102/Ser106 se nesnížila dokonce ani byla-li koncentrace glyphosatu násobena dvakrát, tedy na 20 mM.

C. Rezistence transformovaných tabákových rostlin

0-1 Konstrukce plazmidů:

pRPA-RD-124:

K předem získanému pRPA-ML-720 se přidá polyadenylační signál "nos" za vytvoření kazety klonování obsahující gen EPSPS dvojnásobného mutantu kukuřice (Thr 102 -> Ile a Pro 106 -> Ser). pRPA-ML-720 se digeruje pomocí HindIII

ošetřeného Klenowovým fragmentem DNA-polymerasy I *E. coli*, aby se vytvořil přesahující konec. Proveďte se druhá digesce pomocí Nco I a fragment EPSPS se purifikuje. Gen EPSPS se potom liguje s purifikovaným pRPA-RD-12 (kazeta klonování obsahující polyadenylační signál nopalin-synthasy), aby se vytvořil pRPA-RD-124. Aby se získal purifikovaný vektor pRPA-RD-12, bylo potřeba, aby tento vektor byl předem digerován pomocí SalI, ošetřen pomocí DNA-polymerasou podle Klenowa, potom podruhé digerován pomocí NcoI.

pRPA-RD-125:

Přídavek optimalizovaného transportního peptidu (OTP) k pRPA-RD-124 za vytvoření kazety klonování obsahující cílový gen EPSPS na plazmidech.

pRPA-RD-7 (evropská přihláška vynálezu EP 652 286) se digeruje pomocí Sph I, ošetří pomocí T4 DNA-polymerasou potom digeruje pomocí Spe I a fragment OTP se purifikuje. Fragment OTP se klonuje v pRPA-RD-124, který se předem digeruje pomocí NcoI, ošetří DNA-polymerasou podle Klenowa, aby se zvýšila protuberance 3', potom digeruje pomocí Spe I. Tento klon se tedy sekvenuje, aby se zajistila přesná překladová fúze mezi OTP a genem EPSPS. Takto se získá pRPA-RD-125.

pRPA-RD-159:

Přídavek dvounásobného promotoru histonu *arabinopsis* H4A748 (přihláška vynálezu EP 507 698) k pRPA-RD-125, aby se vytvořila kazeta exprese v rostlinách pro expresi genu "OTP-gen EPSPS dvounásobný mutant" ve tkáni dvouděložných rostlin. pRPA-RD-132 (kazeta obsahující promotor dvounásobný H4A748 (přihláška vynálezu EP 507 698) se digeruje pomocí NcoI a Sac I. Purifikovaný fragment promotoru se potom klonuje a digeruje se pomocí Eco I a Sac I.

pRPA-RD-173:

Přídavek genu "promotor H4A748-OTP-gen EPSPS

dvounásobný mutant" pRPA-RD-159 do plazmidu pRPA-BL-150A (evropská přihláška vynálezu EP 508 909), aby se vytvořil vektor transformace *Agrobacterium tumefaciens*. pRPA-RD-159 se potom digeruje pomocí Not I a ošetří pomocí polymerasy podle Klenowa. Tento fragment se potom klonuje v pRPA-BL-150A pomocí Sma I.

1-1 Transformace

Vektor pRPA-RD-173 se vloží do kmene *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (Hood et al., 1987) nosiče kosmidu pTVK291 (Komari et al., 1986). Metoda transformace je založena na postupu Horshe et al. (1985).

1-2 Regenerace

Regenerace tabáku PBD6 (SEITA France) z listových částí rostlin se provádí na základním médiu Murashige et Skoog (MS) obsahujícím 30 g/l sacharosy stejně jako 200 µg/ml kanamycinu. Listnaté části rostlin jsou odebrány z rostlin kultivovaných ve skleníku nebo in vivo a transformovány podle techniky listových disků (Science, 1985, Vol 227, 1229-1231) ve třech následných etapách: první etapa zahrnuje indukci výhonků na médiu s přídavkem 30 g/l sacharosy obsahující 0,05 mg/l kyseliny naftyloctové (ANA) a 2 mg /l benzylaminopurinu (BAP) po dobu 15 dnů. Výhonky vytvořené v průběhu této etapy se vyvíjejí po dobu 10 dnů kultivací na kultivační půdě MS obohacené 30 g/l sacharosy, ale bez obsahu hormonu. Vytvořené výhonky se potom odeberou a kultivují na půdě MS pro zakořenění s polovičním obsahem solí, vitamínů a cukrů a neobsahující hormon. Po 15 dnech se zakořeněné výhonky vloží do země.

1-3 Rezistence ke glyphosatu

Dvacet transformovaných rostlin se regeneruje a vloží do skleníku, aby se vytvořila konstrukce pRPA-RD-173. Tyto rostliny se ve skleníku ošetří ve stádiu pěti listů vodnou suspenzí RoundUp v dávce 0,8 kg aktivního glyphosatu na hektar.

Výsledky odpovídají pozorování indexu fytotoxicity zvýšeného tři týdny po ošetření. Za těchto podmínek lze konstatovat, že rostliny transformované konstrukcí pRPA-RD-173 vyjadřují velmi dobrou toleranci a to takovou, že kontrolní netransformované rostliny jsou úplně zničeny.

Tyto výsledky jasně ukazují zlepšení, které přináší použití chimérického genu podle vynálezu pro stejný gen kódující rezistenci ke glyphosatu.

Příklad 5: Transformace průmyslového tabáku PBD6 genem nitrilasy (pro =>konstrukce 238):

Tento tabák se získá podle evropské přihlášky vynálezu n°0 337 899 na straně 6, řádku 50 a od konstrukce 238, která je popsána pod jménem pRPA-BL238.

Příklad 6: Křížení opylením

Křížení linií Co 17, 173 a 238 se provádí opylením ve skleníku:

- Co 17 se kříží s 238, aby se získaly tabákové rostliny PBD6 pro testování na dvounásobnou toleranci k isoxaflutolu a ke bromoxynilu ("rostliny HPPD + OXY") a

- Co 17 se kříží s 173, aby se získaly tabákové rostliny PBD6 pro testování na dvounásobnou toleranci k

isoxaflutolu a ke glyphosatu ("rostliny HPPD + EPSPS").

Tyto tři linie jsou homozygoty oproti původnímu genu: potomstvo je hemizygota pro každý ze dvou genů vložených křížením.

Křížené rostliny se získají na konci šesti týdnů.

Příklad 7: Měření tolerance tabáku po vzklíčení při ošetření isoxaflutolem a bromoxynilem nebo glyphosatem

V této zkoušce každý test se provádí na vzorku deseti rostlin, deset rostlin zůstane neošetřeno.

Všechna ošetření se provádějí rozstříkáním v dávce 500 l přípravku na hektar.

Pro ošetření v době po vzklíčení se provádí setí a potom se rostliny přepichují do květináčků o rozměrech 9 cm x 9 cm.

Ošetření po vzklíčení se provádí ve stádiu dobře vyvinutých třech až čtyřech lístků. Podíl divokých rostlin a rostlin získaných geneticky transformovaných se dělí na více částí:

a) neošetřený podíl

b) další podíly, které jsou ošetřeny samotnými herbicidy,

-isoxaflutolem po vzklíčení ve dvou dávkách (200 a 400 g/ha),

-bromoxynilem po vzklíčení ve dvou dávkách (400 a 800 g/ha),

-glyphosatem po vzklíčení ve dvou dávkách (800 a 1200 g/ha),

c) další podíly, které jsou ošetřeny dvěma herbicidy, po vzklíčení v připravené směsi:

-isoxaflutol a bromoxynil ve dvou dávkách (200/400 a 400/800 g/ha),

-isoxaflutol a glyphosat ve dvou dávkách (200/800 a 400/1200 g/ha).

Ošetření se provádí s následujícími formulacemi látek: 75% isoxaflutol, bromoxynil (komerční produkt PARDNER) v koncentrované emulgované formě 225 g/l a glyphosat (Roud-UP).

Za těchto podmínek lze pozorovat v následující tabulce 17 dní po ošetření následujícími fytotoxiny vyvolanou destrukci v procentech, stejně jako počet rostlin na podíl a dávku herbicidu či herbicidů vyjádřených v gramech aktivní hmoty na hektar:

Ošetření po vzklíčení isoxaflutolem a bromoxynilem nebo glyphosatem

Herbicid v g/l	Rostliny s tolerantními geny					
	*	HPPD + OXY	*	HPPD + EPSPS	*	bez genu = divoké
Kontroly	10		10		10	
isoxaflutol 200	20	4%	20	2%	10	75%
samotný 400	20	5%	20	3%		85%
bromoxynil 400	10	3%			10	0%
samotný 800	10	0%			10	0%
Glyphosat 800			20	0%	10	100%
samotný 1200			20	0%	10	100%
isoxaflutol 200 + bromoxynil 400	20	20%			10	100% 100%
isoxaflutol 400 + bromoxynil 800	20	30%			10	100%
isoxaflutol 200 + Glyphosat 800			40	5%	10	100%
isoxaflutol 400 + Glyphosat 1200			40	10%	10	100%

*počet rostlin

Příklad 8

Za účelem studie, může-li být gen HPPD *Pseudomonas fluorescens* použit jako značící gen v průběhu cyklu "transformace - regenerace" rostlinného druhu, se tabák transformuje chimérickým genem tvořeným genem HPPD a genem EPSPS dvounásobně mutovaným pro rezistenci ke glyphosatu a transformované rostliny rezistentní současně ke isoxaflutolu

a glyphosatu se získají po selekci na isoxaflutol.

Materiál, metody a výsledky

Chimérický gen pRP2012, popsaný dále, se transformuje do průmyslového tabáku PBD6 podle transformačních a regeneračních postupů již dříve popsaných v evropské přihlášce vynálezu EP n°0 508 909.

Chimérický gen vektoru pRP 2012 má následující strukturu A-B, ve které:

A je:

Dvojitý histonový promotor	TEV	OTP	kódující oblast HPPD	terminátor nos
----------------------------------	-----	-----	-------------------------	-------------------

a B je:

Dvojitý histonový promotor	TEV	OTP	kódující oblast EPSPS	terminátor nos
----------------------------------	-----	-----	-----------------------------	-------------------

jako ve vektoru pRPA-RD-173.

Chimérický gen pRP 2012 se vloží do tabáku.

1) Transformace

Vektor pRPA-RD-173 se vloží do neonkogenního kmene *Agrobacterium* EHA101 (Hood et al., 1987) nosiče kosmidu pTVK291 (Komari et al., 1986). Metoda transformace je založena na postupu Horshe et al. (1985).

1-2 Regenerace

Regenerace tabáku PBD6 (SEITA France) z listových částí rostlin se provádí na základním médiu Murashige et Skoog (MS) obsahujícím 30 g/l sacharosy stejně jako 350 µg/ml cefotaximu a 1 mg/l isoxaflutolu. Listnaté části rostlin jsou odebrány z

rostlin kultivovaných ve skleníku nebo z rostlin kultivovaných in vivo a transformovány podle techniky listových disků (Science, 1985, Vol 227, 1229-1231) ve třech následných etapách: první etapa obsahuje indukci výhonků na médiu s přidavkem 30 g/l sacharosy obsahující 0,05 mg/l kyseliny naftyloctové (ANA) a 2 mg/l benzylaminopurinu (BAP) po dobu 15 dnů. Výhonky vytvořené v průběhu této etapy se vyvíjejí po dobu 10 dnů kultivací na kultivační půdě MS obohacené 30 g/l sacharosy a 1 mg/l isoxaflutolu, ale bez obsahu hormonu. Vytvořené výhonky se potom odeberou a kultivují na půdě MS pro zakořenění s polovičním obsahem solí, vitamínů a cukrů a neobsahující hormon. Po 15 dnech se zakořeněné výhonky vloží do země.

Všechny klíčící rostliny získané podle tohoto protokolu se analyzují pomocí PCR se specifickými nástroji HPPD *P. fluorescens*. Tato PCR analýza umožňuje potvrdit, že všechny takto získané klíčící rostliny dobře začlenily gen HPPD, a že mají toleranci současně k isoxaflutolu a ke glyphosatu za podmínek popsaných v příkladu 7.

Závěrem, tato zkouška potvrzuje, že gen HPPD může být použit jako značící gen, a že spojení tohoto genu s isoxaflutolem může být dobrý činitel selekce.

Příklad 9: Rostlina s genem HPPD a genem bar rezistentní současně k isoxaflutolu a k fosphinothrycinu

1. Konstrukce chimérického genu se sekvencí HPPD:

Plazmid pRPA-RD-1004 vyjádřený na obrázku 4 se získá vložení chimérického genu rezistence k isoxazolu do plazmidu pUC 19 o 2686 pb vytvořeného v New England Biolabs (Yannish-Perron, C. Viera, J. a Massing, J. (1985) Gene 33, 103-119 a obsahujícího rezistenci k ampicilinu.

Různé elementy chimérického genu jsou ve smyslu translace:

- histonový promotor H3C4 kukuřice o 1020 pb popsáný v přihlášce vynálezu EP 0 507 698;

- intron genu alkoholdehydrogenasy 1 kukuřice popsáný Sachsem et al., Genecics 113: 449-467 (1987) a tvořený 536 pb

- optimalizovaný tranzitní peptid (OTP) popsáný v přihlášce vynálezu EP 0 508 909; tento OTP je tvořen 171 pb tranzitního peptidu peptidové podjednotky Ribulosity 1,5 bifosfatkarboxylasy / oxygenasy *Helianthus annuus* (Waksman G. et al., 1987, Nucleic acids Res. 15: 7181) následované 66 pb vyztřálé části malé podjednotky Ribulosity 1,5 bifosfatkarboxylasy / oxygenasy *Zea mays* (Lebrun et al., 1987, Nucleic acids Res. 15: 4360) následované 150 pb tranzitního peptidu peptidové podjednotky Ribulosity 1,5 bifosfatkarboxylasy / oxygenasy *Zea mays* (Lebrun et al., 1987, Nucleic acids Res. 15: 4360); dohromady tvoří tedy 387 pb;

- kódující oblast HPPD *Pseudomonas fluorescens* dále popsáná;

- terminátor genu nopalinsynthasy (nos) (polyadenylační oblast genu nos izolovaného z pTi 37, 250 pb (Bevan M. et al., Nucleic Acids Res. 11: 369-385));

2. Konstrukce chimérického genu rezistence k fosphinothricinu (gen bar):

Phosphinothricinacetyltransferasa (PAT) kódovaná genem bar je enzym, který inaktivuje herbicid phosphinothricin (PPT). PPT inhibuje syntézu glutaminu a vyvolává rychlou akumulaci amoniaku v buňkách, což vede k jejich smrti

(Tachibana et al., 1986).

Plazmid použitý pro vložení tolerance k phosphinothricinu jako činiteli selekce se získá vložním chimérického genu pDM 302 do vektoru pSP72 o 2462 pb vyrobeného firmou Promega Corp. (Genbank/DDBJ database číslo X65332) a obsahujícího gen rezistence k ampicilinu.

Plazmid pDM 302 o 4700 pb byl popsán odborníky Cao, J. et al., Plant Cell Report 11: 586-591 (1992).

Různé elementy toho plazmidu jsou:

- promotor genu aktinu rýže popsáný Mc Elroy D. et al., Plant Molecular Biology 15: 257-268 (1990) tvořený 840 pb;
- první exon genu aktinu rýže tvořený 80 pb;
- první intron genu aktinu rýže tvořený 450 pb;
- kódovaná oblast genu bar o 600 pb vyříznutá z plazmidu pIJ41404 popsaná odborníky White et al., Nuc. Acids res. 18: 1862 (1990);
- terminátor genu nopalinsynthasy (nos) (polyadenylační oblast genu nos izolovaného z pTi 37, 250 pb (Bevan M. et al., Nucleic Acids Res. 11: 369-385).

3. Transformace:

Pro vložení genetické konstrukce se použije technika bombardování. Plazmidy se purifikují na koloně Qiagen a společně srážejí na wolframové částice M10 podle metody popsané Kleinem (Nature 327: 70-73, 1987).

Směs kovových částic a dvou plazmidů popsáných dále se potom bombarduje na embryogenních buňkách kukuřice podle protokolu.

4. Regenerace a použití genu bar jako činitele selekce

Bombardované podíly se selekují na glufosinat až do objevení zeleného sekretu.

Pozitivní podíly jsou tedy obrácené v somatických embryonálních buňkách a jsou uloženy za upřednostňovaných podmínek klíčení. Mladé rostliny se přenesou do skleníku za účelem vytvoření semen.

Molekulární analýza provedená na rostlinách ukazuje, že:

- alespoň 4 kalusy selekované na phosphinothricin byly vyvolány na rostlinách prozrazujících přítomnost genu HPPD pomocí PCR;

- alespoň 5 kalusů selekovaných na phosphinothricin byly vyvolány na rostlinách prozrazujících přítomnost genu HPPD pomocí Southern blot;

- alespoň 5 kalusů selekovaných na phosphinothricin byly vyvolány na rostlinách prozrazujících přítomnost rekombinantního proteinu pomocí Western blot;

- chimérický gen HPPD a heterologní gen nejsou přítomny v transformovaných kalusech.

Tyto výsledky ukazují účinek chimérického genu bar pro selekci transformovaných kalusů obsahujících jiný gen agronomického zájmu.

5. Analýza potomků transformovaných rostlin

Transformované rostliny získané dále byly vytvořeny z pilu zčásti transgenního, který oplodnil ovule netransgenní divoké kukuřice. Získaná semena se selektují na písku po ošetření isoxaflutolem. Protokol selekce je následující:

800 ml písku z Fontainebleau se umístí do lodičky o stranách 15 x 20 cm. Tyto lodičky se zalévají vodou a hydratují zejména přiváděním živného roztoku tvořeného 5 ml Quinoligo (La Quinoléine) na litr vody. Dvacet kukuřičných semen se umístí na lodičky, které jsou ošetřeny isoxaflutolem rozprašováním v dávce 100 až 200 g aktivního materiálu na hektar (300 nebo 600 μ g aktivního materiálu na lodičku). Lodičky se potom umístí do skleníku ke kultivaci.

Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

genotypy	isoxaflutol (g/l)	počet vyšetřých semen	počet vzklíče- ných rostlin	počet uhynulých rostlin	počet přežitých rostlin
ne- transgenní	0	20	20	0	20
	100	20	20	20	0
261 2B 459	100	10	10	5	5
	200	10	9	4	5
261 2D2	100	10	9	6	3
	200	10	10	7	3
261 2A2	100	10	5	3	2
	200	10	7	7	0

Tyto výsledky ukazují účinnost genu HPPD pro selekci kukuřičných rezistentních rostlin. Ukazují také, že silná exprese HPPD *Pseudomonas* v kukuřičné tkáni potvrzuje toleranci k isoxafluolu.

Seznam sekvencí

SEQ ID N°1:

sekvence genu HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32

SEQ ID N°2:

sekvence cDNA EPSPS *Arabidopsis thalia*

SEQ ID N°3 a 4:

sekvence genu a proteinu EPSPS mutované kukuřice, část
1340 pb klonu pRPA-ML-716

SEQ ID N°5 a SEQ ID N°6:

sekvence genu a proteinu EPSPS mutované kukuřice, část
1340 pb klonu pRPA-ML-720Legenda k obrázkům

Obrázek 1: Proteinová sekvence HPPD *Pseudomonas* sp. druhu P.J. 874 a teoretická nukleotidová sekvence odpovídající kódované části; pět oligonukleotidů vybraných pro provedení amplifikace části této kódované oblasti je naznačeno pěti šipkami.

Obrázek 2: Mapa plazmidu s fragmentem genomické DNA o 7 kb kódující gen HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32.

Obrázek 3: Porovnání dvojitého histonového aminokyselinového sekvencí HPPD *Pseudomonas fluorescens* A32 a HPPD *Pseudomonas* sp. druhu P.J. 874 (jedině divergentní aminokyseliny mezi dvěma sekvencemi jsou identické) stejně jako konsenzuální sekvence.

Seznam sekvenci

SEQ ID NO: 1:

ATGGCAGATC TATACGAAAA CCCAATGGGC CTGATGGGCT TTGAATTCAT CGAATTCGCG	60
TCGCCGACGC CGGGTACCCT GGAGCCGATC TTCGAGATCA TGGGCTTCAC CAAAGTCGCG	120
ACCCACCGTT CCAAGAACGT GCACCTGTAC CGCCAGGGCG AGATCAACCT GATCCTCAAC	180
AACGAGCCCA ACAGCATCGC CTCCTACTTT GCGGCCGAAC ACGGCCCGTC GGTGTGCGGC	240
ATGGCGTTCC GCGTGAAGGA CTCGCAAAAG GCCTACAACC GCGCCCTGGA ACTCGGCGCC	300
CAGCCGATCC ATATTGACAC CGGGCCGATG GAATTGAACC TGCCGGCGAT CAAGGGCATC	360
GGCGGCGCGC CGTTGTACCT GATCGACCGT TTCGGCGAAG GCAGCTCGAT CTACGACATC	420
GACTTCGTGT ACCTCGAAGG TGTGGAGCGC AATCCGGTCG GTGCAGGTCT CAAAGTCATC	480
GACCACCTGA CCCACAACGT CTATCGCGGC CGCATGGTCT ACTGGGCCAA CTTCTACGAG	540
AAATTGTTCA ACTTCCGTGA AGCGCGTTAC TTCGATATCA AGGGCGAGTA CACCGGCCTG	600
ACTTCCAAGG CCATGAGTGC GCCGGACGGC ATGATCCGCA TCCCGCTGAA CGAAGAGTCG	660
TCCAAGGGCG CGGGGCAGAT CGAAGAGTTC CTGATGCAGT TCAACGGCGA AGGCATCCAG	720
CACGTGGCGT TCCTCACC GAACCTGGTC AAGACCTGGG ACGCGTTGAA GAAAATCGGC	780
ATGCGCTTCA TGACCGCGCC GCCAGACACT TATTACGAAA TGCTCGAAGG CCGCCTGCCT	840
GACCACGGCG AGCCGGTGGA TCAACTGCAG GCACGCGGTA TCCTGCTGGA CGGATCTTCC	900
GTGGAAGGCG ACAAACGCCT GCTGCTGCAG ATCTTCTCGG AAACCCTGAT GGGCCCGGTG	960
TTCTTCGAAT TCATCCAGCG CAAGGGCGAC GATGGGTTTG GCGAGGGCAA CTTCAAGGCG	1020
CTGTTTCGAGT CCATCGAACG TGACCAGGTG CGTCGTGGTG TATTGACCGC CGATTAA	1077

01.03.99

46

SEQ ID NO: 2:

AATCAATTTC ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG AATTCGGGCC CGGGCGCGTG	60
ATCCGGCGGC GGCAGCGGCG GCGGCGGTGC AGGCGGGTGC CGAGGAGATC GTGCTGCAGC	120
CCATCAAGGA GATCTCCGGC ACCGTCAAGC TGCCGGGGTC CAAGTCGCTT TCCAACCGGA	180
TCCTCCTACT CGCCGCCCTG TCCGAGGGGA CAACAGTGGT TGATAACCTG CTGAACAGTG	240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCCTTGA GGA CTCTTG TCTCTCTGTC GAAGCGGACA	300
AAGCTGCCAA AAGAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTT GAGGATGCTA	360
AAGAGGAAGT GCAGCTCTTC TTGGGAATG CTGGAAGTGC AATGCGGCCA TTGACAGCAG	420
CTGTTACTGC TGCTGGTGA AATGCAACTT ACGTGCTTGA TGGAGTACCA AGAATGAGGG	480
AGAGACCCAT TGGCGACTTG GTTGTGGAT TGAAGCAGCT TGGTGCAGAT GTTGATTGTT	540
TCCTTGCCAC TGA CTGCCCA CCTGTTCTG TCAATGGAAT CGGAGGGCTA CCTGGTGGCA	600
AGGTCAAGCT GTCTGGCTCC ATCAGCAGTC AGTACTTGAG TGCCTTGCTG ATGGCTGCTC	660
CTTTGGCTCT TGGGGATGTG GAGATTGAAA TCATTGATAA ATTAATCTCC ATTCCGTACG	720
TCGAAATGAC ATTGAGATTG ATGGAGCGTT TTGGTGTGAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT	780
GGGACAGATT CTACATTAAG GGAGGTCAAA AATACAAGTC CCCTAAAAAT GCCTATGTTG	840
AAGGTGATGC CTCAAGCGCA AGCTATTTCT TGGCTGGTGC TGCAATTACT GGAGGGACTG	900
TGACTGTGGA AGGTTGTGGC ACCACCAGTT TGCAGGTGA TGTGAAGTTT GCTGAGGTAC	960
TGGAGATGAT GGGAGCGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CGTAACTGTT ACTGGCCAC	1020
CGCGGGAGCC ATTTGGGAGG AAACACCTCA AGGCGATTGA TGTCAACATG AACAAGATGC	1080
CTGATGTCGC CATGACTCTT GCTGTGGTTG CCCTCTTTGC CGATGGCCCG ACAGCCATCA	1140
GAGACGTGGC TTCCTGGAGA GTAAAGGAGA CCGAGAGGAT GGTGCGATC CGGACGGAGC	1200
TAACCAAGCT GGGAGCATCT GTTGAGGAAG GGCCGGACTA CTGCATCATC ACGCCGCCGG	1260
AGAAGCTGAA CGTGACGGCG ATCGACACGT ACGACGACCA CAGGATGGCC ATGGCCTTCT	1320
CCCTTGCCGC CTGTGCCGAG GTCCCCGTCA CCATCCGGGA CCCTGGGTGC ACCCGGAAGA	1380
CCTTCCCCGA CTACTTCGAT GTGCTGAGCA CTTTCGTCAA GAATTAATAA AGCGTGCGAT	1440
ACTACCACGC AGCTTGATTG AAGTGATAGG CTTGTGCTGA GGAAATACAT TTCTTTTGTT	1500
CTGTTTTTCT CTTTCACGGG ATTAAGTTTT GAGTCTGTAA CGTTAGTTGT TTGTAGCAAG	1560
TTCTATTTT GATCTTAAG TTTGTGCACT GTAAGCCAAA TTTCATTTC AAGAGTGGTTC	1620
GTTGGAATAA TAAGAATAAT AAATTACGTT TCAGTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1680
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCCGGGAA TTC	1713

010399

47

SEQ ID NO: 3:

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30	95
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CGG CCA TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767

SEQ ID NO: 3 (pokračování)

AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCC ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

01.03.99

49

SEQ ID NO: 4:

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350

01.03.99

50

SEQ ID NO: 4 (pokračování)

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

01.03.99

51

SEQ ID NO: 5:

CCATG GCC GGC GCC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10	47
TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CGG ATC Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30	95
CTC CTA CTC GCC GCC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45	143
CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AGG ACT CTT Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60	191
GGT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT GCC AAA AGA GCT GTA GTT GTT Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75	239
GGC TGT GGT GGA AAG TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTG CAG Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90	287
CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ATC GCA ATG CGG TCC TTG ACA GCA GCT Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110	335
GTT ACT GCT GCT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125	383
AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140	431
CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TGC CCA CCT GTT Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155	479
CGT GTC AAT GGA ATC GGA GGG CTA CCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170	527
GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CCT Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190	575
TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205	623
ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TTG AGA TTG ATG GAG CGT TTT GGT GTG Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220	671
AAA GCA GAG CAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GGA GGT Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235	719
CAA AAA TAC AAG TCC CCT AAA AAT GCC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250	767

SEQ ID NO: 5 (pokračování)

AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 265 270	815
ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 270 275 280 285	863
GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT Ala Glu Val Thr Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300	911
AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG CGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315	959
CTC AAG GCG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG CCT GAT GTC GCC ATG Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330	1007
ACT CTT GCT GTG GTT GCC CTC TTT GCC GAT GGC CCG ACA GCC ATC AGA Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350	1055
GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365	1103
CGG ACG GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380	1151
TAC TGC ATC ATC ACG CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACG GCG ATC GAC Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395	1199
ACG TAC GAC GAC CAC AGG ATG GCG ATG GCC TTC TCC CTT GCC GCC TGT Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 400 405 410	1247
GCC GAG GTC CCC GTC ACC ATC CGG GAC CCT GGG TGC ACC CGG AAG ACC Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 415 420 425 430	1295
TTC CCC GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440	1337
TAA	1340

01.03.99

53

SEQ ID NO: 6:

Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu
 50 55 60
 Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr
 100 105 110
 Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met
 115 120 125
 Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly
 130 135 140
 Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala
 180 185 190
 Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro
 195 200 205
 Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala
 210 215 220
 Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys
 225 230 235 240
 Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val
 260 265 270
 Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu
 275 280 285
 Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
 290 295 300
 Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
 325 330 335
 Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
 340 345 350

01.03.99

54

SEQ ID NO: 6 (pokračování)

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

Patentové nároky

1. Chimérický gen obsahující alespoň dva základní chimérické geny obsahující elementy regulace nezbytné pro replikaci v rostlinách a sekvenci kódující enzym udělující rezistenci k herbicidům v y z n a č e n ý t í m, že jedna kódující sekvence kóduje hydroxyfenylpyruvat- dioxxygenasu (HPPD).

2. Chimérický gen podle nároku 1 v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje mimo jiné třetí chimérický gen obsahující sekvenci kódující enzym udělující rostlinám rezistenci k herbicidům.

3. Chimérický gen podle nároku 1 a 2 v y z n a č e n ý t í m, že druhá kódující sekvence pochází z genu nitrilasy *Klebsiella* sp. udělující rezistenci k herbicidům druhu dihalogenhydroxybenzonitrily.

4. Chimérický gen podle nároku 3 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid je bromoxynil.

5. Chimérický gen podle nároku 3 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid je oxynil.

6. Chimérický gen podle nároků 2 až 5 v y z n a č e n ý t í m, že druhá kódující sekvence kóduje rezistenci ke glyphosatu.

7. Chimérický gen podle jednoho z nároků 2 až 6 v y-
z n a ě n ý t í m, že druhá kódující sekvenec kóduje EPSPS
udělující rezistenci herbicidu inhibitoru EPSPS.

8. Chimérický gen podle nároku 7 v y z n a ě n ý
t í m, že druhá kódující sekvenec kóduje EPSPS udělující
rezistenci k glyphosatu.

9. Chimérický gen podle nároku 6 v y z n a ě n ý
t í m, že druhá kódující sekvenec kóduje
glyphosatoxydoreduktasu, enzym detoxifikace glyphosatu.

10. Chimérický gen podle jednoho z nároků 1 až 9 v y-
z n a ě n ý t í m, že sekvenec kódující HPPD pochází z
Pseudomonas sp.

11. Chimérický gen podle nároku 10 v y z n a ě n ý
t í m, že sekvenec kódující HPPD pochází z *Pseudomonas
fluorescens*.

12. Chimérický gen podle nároků 1 až 9 v y z n a ě-
n ý t í m, že sekvenec kódující HPPD je rostlinného původu.

13. Chimérický gen podle nároku 12 v y z n a ě n ý
t í m, že sekvenec kódující HPPD pochází z *Arabidopsis
thaliana*.

14. Chimérický gen podle nároku 11 v y z n a ě n ý

t í m, že sekvence kódující HPPD pochází z *Daucus carota*.

15. Vektor v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje chimérický gen podle jednoho z nároků 1 až 14.

16. Vektor podle nároku 15 v y z n a č e n ý t í m, že je tvořen plazmidem.

17. Rostlinná buňka v y z n a č e n á t í m, že obsahuje alespoň dva geny obsahující každý sekвени kódující enzym udělující rostlinám rezistenci k herbicidům, z nichž jeden je inhibitor hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasy (HPPD).

18. Rostlinná buňka podle nároku 17 v y z n a č e n ý t í m, že obsahuje tři základní chimérické geny obsahující každý elementy regulace a sekвени kódující enzym udělující rostlinám rezistenci k herbicidu.

19. Rostlinná buňka podle jednoho z nároků 17 a 18 v y z n a č e n á t í m, že obsahuje alespoň chimérický gen podle jednoho z nároků 1 až 14.

20. Rostlina v y z n a č e n á t í m, že obsahuje rostlinnou buňku podle jednoho z nároků 17 až 19.

21. Postup transformace rostlin, aby získaly rezistenci k herbicidům v y z n a č e n ý t í m, že se vloží do rostlinné buňky gen podle nároků 1 až 14, a tím že

transformované buňky se podrobí regeneraci.

22. Postup získání rostlin s několikanásobnou rezistencí k herbicidům v y z n a č e n ý t í m, že:

- v první etapě se vloží do více buněk jeden ze základních genů obsahující elementy regulace nezbytné k transkripci v rostlinách a sekvenci kódující enzym udělující rostlinám rezistenci k herbicidům, a že

- potom se rostliny kříží, aby se získaly rostlin s několikanásobnou rezistencí.

23. Postup herbicidního ošetření rostlin podle nároku 20 v y z n a č e n ý t í m, že se aplikují alespoň dva herbicidy.

24. Postup podle nároku 23 v y z n a č e n ý t í m, že se aplikují alespoň tři herbicidy.

25. Postup podle jednoho z nároků 21 až 24 v y z n a č e n ý t í m, že jeden z herbicidů je inhibitor HPPD.

26. Postup podle jednoho z nároků 21 až 25 v y z n a č e n ý t í m, že jsou dva herbicidy aplikovány současně.

27. Postup podle nároku 26 v y z n a č e n ý t í m, že dva herbicidy jsou aplikovány ve formě kompozice připravené k použití.

28. Postup podle nároku 25 v y z n a č e n ý t í m, že dva herbicidy jsou aplikovány ve formě připravené směsi.

29. Postup podle nároků 22 až 24 v y z n a č e n ý t í m, že dva herbicidy jsou aplikovány postupně.

30. Postup podle nároků 22 až 29 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid inhibitor HPPD je isoxaflutol.

31. Postup podle nároků 22 až 29 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid inhibitor HPPD je sulcotrion.

32. Postup podle jednoho z nároků 22 až 31 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid patří do skupiny dihalogenhydroxynitrilů.

33. Postup podle nároku 32 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid je vybrán z množiny herbicidů zahrnující bromoxyl a ioxynil.

34. Postup podle nároků 22 až 33 v y z n a č e n ý t í m, že herbicid inhibitor HPPD je glyphosat nebo sulphosat.

010000

75 GCNGAYTTTAYGARAAYCCNATGG GNYTNAITGGGNTTYGARTTYATHGA RYTNCGNWSNCCNACHCCNAAAYACH
A D L Y E N P M G L M G F E F I E L A S P T P N T
150 YTNARGCCNATHITTYGARATHATGG GNTTYACUAARGTNGCNACNCAYNIG NWSUAARGAYGTNCAYTTNTAYNGN
L E P I F E I M G F T K V A T H R S K D V H L Y R
225 CARGGNCNATHAAYTTNATHYTNA AYAAYGARCNCAYNSGTNGCNWS NTAYTTGCGNGCGARCAAYGGNCCN
Q G A I N L I L N N E P H S V A S Y F A A E H G P
300 WSNGTNTGYGGNATGGGNTTYNGNG TNAARGAYNSKARAARGCNTAYAA RUGNGCNTNGARYTTNGGNGCNCAR
S V C G M A F R V K D S Q K A Y K R A L E L G A Q
375 CCNATHCAYATHGARACNGGNCNA TGGARYTNAAYTTNCCNGCNATHAA RGGNATHGGGNGGNCNCNTTNTAY
P I H I E T G P M E L N L P A I K G I G G A P L Y
450 YTNATHGAYNGNTTYGGNGARGGNW SNWSNATHITAYGAYATHGAYTTTGT NTYYTNGARGGNGTNGAYHGNCA
K I D R F G E G S S I Y D I D F V F L E G V D R H
525 CCNGTNGGNGCGGNTTNAARATHA THGAYCAYTTNACNCAAYGTNTA YMGNGMGNATGGCNTAYTGGCN
P V G A G L K I I D H L T H N V Y R G R M A Y W A
600 AAYTTTAYGARAARYTTHTTYAAT TYNGNGARATHNGTAYTTTYGAYAT HAARGGNGARTAYACNGGNTTNA
N F Y E X L F N F R E I R Y F D I K G E Y T G L T
675 WSNARGCNATGACNGCNCNGAYG GNATGATHGNATHCCNTTNAAYGA RGARWSNWSNARGGNGCGNCNCAR
S K A M T A P D G M I R I P L N E E S S K G A G Q

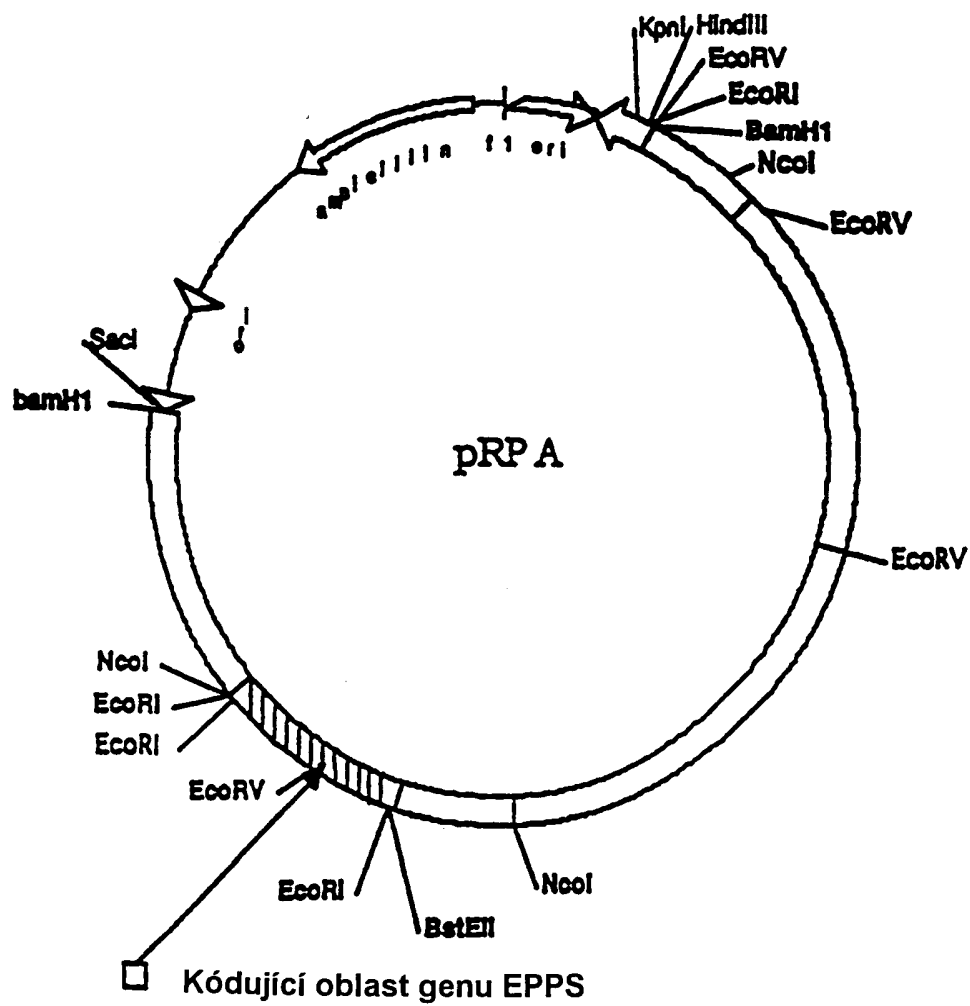
OBR. 1

750	ATHGARGARTTYTNA TGCA RTTYA	AYGGNGARGGNATHCARCAYGTNGC	NTTYTNWSNGAYGAYYTNATHAAR
	I E E F L M Q F N	G E G I Q H V A F L S D D L I K	
825	ACNTGGGAYCAYYTNAA RWSNATHG	GNATGNGHTTYATGACNGCNCNC	NGAYACHTAYTAYGARATGYTNGAR
	T W D H L K S I G M R F M T A P P D T Y Y E M L E		
900	GGNMGHTTNCNAA YCAYGGNGARC	CNGTNGGNGARYTNCARGCNHNGGG	NATHYTNNGAYGGHNSNWSNGAR
	G R L P N H G E P V G E L Q A R G I L L D G S S E		
975	WSNGNGAYAA RUGNTYTNNTNC	ARATHTTYWSNGARACHTYTNATGGG	NCCNGTNTTYTTCARTTYATHCAR
	S G D K R L L L Q I F S E T L M G P V F F E F I Q		
1050	HGNAJRGNGAYGAYGGHTTYGGNG	ARGGNAAYTTAARGCNYTNTTYGA	RWSNATHGARHNGAYCARGTNHGN
	R K G D D G F G E	G N F K A L F E S I E R D Q V R	
1071	MNGNGGNTYTNWSNACNGAY		
	R G V L S T D		

01.03.99

01.03.99

3/5



OBR. 2

sekvence konvenční	.ADLYENPMG	LMGFEFIE.A	SPTP.TLEPI	FEIMGFTKVA	THRSK.VHLY	50
<i>P. fluorescens</i>	M.....	F.	G.....		N....	50
<i>Pseudomonas sp.</i>	-.....	L.	N.....		D....	49
sekvence konvenční	RQG.INLILN	NEP.S.ASYF	AAEHGPSVCG	MAFRVKDSQK	AY.RALELGA	100
<i>P. fluorescens</i>	...E.....	...N.I....			...N.....	100
<i>Pseudomonas sp.</i>	...A.....	...H.V....			...K.....	99
sekvence konvenční	QPIHI.TGPM	ELMLPAINGI	GGAPLYLIDR	FGEGSSIYDI	DFV.LEGV.R	150
<i>P. fluorescens</i>	D....				...Y....E.	150
<i>Pseudomonas sp.</i>	E....				...F....D.	149
sekvence konvenční	.PVGAGLK.I	DHLTHNVYRG	RH.YMANFYE	KLFNFRE.RY	FDIKGETTGL	200
<i>P. fluorescens</i>	N.....V.		..V.....	A..		200
<i>Pseudomonas sp.</i>	H.....I.		..A.....	I..		199
sekvence konvenční	TSKAM.APDG	WIRIPLNEES	SKGAGQIEEF	LMQFNAGEIQ	HVAFL.DDL.	250
<i>P. fluorescens</i>	S....				T...V	250
<i>Pseudomonas sp.</i>	T....				S...I	249

OBR. 3

010000

01.03.99

5/5

sekvence konvenční	KTWD.LK.IG	HRFNTAPPDT	YYEHLEGRLP	.HGEPV...LQ	ARGILLDGSS	300
P. fluorescens	A..K..			D.....DQ..		300
Pseudomonas sp.	H..S..			N.....GE..		299
sekvence konvenční	..GDKRLLQ	IFSETLMGPV	FFEFIQRKGD	DGFGEGNFKA	LFESTERDQV	350
P. fluorescens	VE.....					350
Pseudomonas sp.	ES.....					349
sekvence konvenční	RRGVL...D					358
P. fluorescens	TÁ.					358
Pseudomonas sp.	ST.					357

OBR. 3 (pokračování)