



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900644864
Data Deposito	18/12/1997
Data Pubblicazione	18/06/1999

Priorità	08/770.097
Nazione Priorità	US
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	01	N		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

METODI PER CONFERIRE RESISTENZA NEI CONFRONTI DEGLI INSETTI AD UNA PIANTA MONOCOTILEDONE IMPIEGANDO UNA SEQUENZA CHE CODIFICA LA PEROSSIDASI

dai substrati disponibili nella pianta specifica. Pertanto, i prodotti finali ottenuti mediante espressione di perossidasi possono differire da pianta a pianta.

Inoltre, la resistenza nei confronti dei bruchi delle spighe di mais è correlata in modo negativo ad un imbrunimento 'silk', il che sta ad indicare che un aumento nella perossidasi farebbe diminuire la resistenza (Byrne et al., *Environ. Entomol.* 18:356-360 (1989). Ciò indica che non è possibile utilizzare perossidasi per controllare insetti in piante monocotiledoni.

Inoltre, una produzione di lignina alterata in mais (in mutanti *bm*) provoca una aumentata sensibilità nei confronti degli insetti (Barriere e Argillier, *Agronomie* 13:865-876 (1993)). Così, non ci si potrebbe aspettare che una perossidasi estranea che altera la lignificazione faccia diminuire la sensibilità nei confronti degli insetti. Inoltre, dal punto di vista degli insegnamenti di Bergvinson et al., *The Canadian Entomologist* 127: 111-122, 1995, era inaspettato il fatto che la resistenza agli insetti fosse conferita alle piante mediante ispessimento di tessuti a causa dell'attività della perossidasi negli stadi precoci della crescita.

Pertanto, prima della presente invenzione, non era prevedibile l'effetto della espressione di una perossidasi ricombinante in monocotiledoni.

Vengono messi a disposizione metodi per controllare insetti e vengono messe a disposizione piante monocotiledoni resistenti agli insetti.

L'invenzione più in particolare mette a disposizione un metodo per controllare insetti che consiste nell'alimentare oppure nel porre a contatto un insetto con una quantità insetticida di cellule di una pianta monocotiledone transgenica che contiene DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica la perossidasi in cui l'espressione della perossidasi conferisce una resistenza nei confronti degli insetti nelle cellule della pianta monocotiledone transgenica.

L'invenzione mette a disposizione anche una pianta monocotiledone transgenica fertile almeno una parte della quale contiene cellule con un DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica la perossidasi per cui l'espressione della perossidasi conferisce alla pianta monocotiledone una caratteristica fenotipica.

L'invenzione mette a disposizione anche una cellula, un tessuto oppure un seme di una pianta

transgenica ottenuti dalla pianta descritta sopra.

L'invenzione inoltre mette a disposizione discendenti transgenici della pianta descritta sopra.

L'invenzione inoltre mette a disposizione una cellula, un tessuto oppure un seme della pianta transgenica ottenuti dai discendenti descritti sopra.

Ulteriori oggetti e vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla descrizione che segue.

FIGURA 1. Viene mostrato il plasmide, pJS20293 che contiene una perossidasi anionica di tabacco inserita tra (1) il promotore 35S di CaMV collegato ad un introne ristretto e (2) il terminatore 35S di CaMV.

FIGURA 2. Viene mostrato il plasmide pUBIAC.

Le seguenti definizioni favoriranno la comprensione della presente invenzione.

Cellula di una pianta: l'unità strutturale e fisiologica di piante, costituita da un protoplasto e da una parete cellulare. L'espressione 'cellula di una pianta' si riferisce a qualsiasi cellula che è parte di una pianta oppure è derivata da una pianta. Certi esempi di cellule comprendono cellule differenziate che sono parte di una pianta vivente; cellule differenziate in coltura; cellule non differenziate in coltura; le cellule di un tessuto

non differenziato come callo oppure tumori, cellule differenziate di semi, embrioni, propaguli e polline.

Tessuto vegetale: un gruppo di cellule vegetali organizzato in una unità strutturale e funzionale. È incluso qualsiasi tessuto di una pianta nella pianta oppure in coltura. Questo termine comprende, senza essere limitato, piante intere, organi di piante, semi di piante, una coltura di tessuti e qualsiasi gruppo di cellule vegetali organizzate in unità strutturali e/o funzionali. Si intende che l'impiego di questo termine in combinazione con qualsiasi tipo specifico oppure in assenza di qualsiasi tipo specifico di tessuto vegetale come elencato sopra oppure altrimenti compreso da questa definizione non esclude qualsiasi altro tipo di tessuto della pianta.

Protoplasto: una cellula vegetale senza parete cellulare.

Pianta discendente: una pianta della generazione futura derivata in modo sessuale oppure asessuale che comprende, senza limitazione, piante della progenie.

Pianta transgenica: una pianta nella quale è incorporato in modo stabile DNA ricombinante nel suo genoma.

DNA ricombinante: qualsiasi molecola di DNA ottenuta collegando segmenti di DNA di differenti

origini e prodotto adottando la tecnologia del DNA ricombinante.

Tecnologia del DNA ricombinante: tecnologia che produce DNA ricombinante in vitro e trasferisce il DNA ricombinante in cellule dove esso può venire espresso oppure propagato (vedere Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Ed. Juo, CRC Press, Boca Raton (1996)), per esempio il trasferimento di DNA in un protoplasto oppure in una cellula (in protoplasti o in cellule) in diverse forme, ivi compreso per esempio (1) DNA semplice in forma circolare, lineare oppure superavvolta, (2) DNA contenuto in nucleosomi o cromosomi oppure nuclei o parti di essi, (3) DNA legato sotto forma di complesso oppure associato con altre molecole, (4) DNA incluso in liposomi, sferoplasti, cellule oppure protoplasti oppure (5) DNA trasferito da organismi diversi dall'organismo ospite (da *Agrobacterium tumefaciens*). Questi ed altri diversi metodi per l'introduzione del DNA ricombinante in cellule sono noti nel settore e possono venire utilizzati per produrre le cellule transgeniche oppure le piante transgeniche della presente invenzione.

La tecnologia del DNA ricombinante comprende anche i metodi di ricombinazione omologa descritti in

Treco et al., WO 94/12650 e Treco et al., WO 95/31560 che possono venire applicati per fare aumentare una attività di perossidasi in una monocotiledone. In particolare, nel genoma della pianta si possono introdurre regioni regolatrici (da promotori) per fare aumentare l'espressione della perossidasi endogena.

Come tecnologia del DNA ricombinante è compreso anche l'inserimento di una sequenza che codifica la perossidasi che è priva di segnali di espressione selezionati in una monocotiledone e la valutazione della pianta monocotiledone transgenica per stabilire l'espressione aumentata della perossidasi dovuta a sequenze di controllo endogene nella monocotiledone. Ciò porterebbe come risultato ad un aumento nel numero delle copie di sequenze che codificano perossidasi all'interno della pianta.

L'inserimento iniziale del DNA ricombinante nel genoma della pianta R^0 non viene definito come realizzato mediante metodi di allevamento di piante tradizionali ma piuttosto mediante metodi tecnici qui descritti. Dopo l'inserimento iniziale, i discendenti transgenici possono venire fatti propagare adottando essenzialmente metodi di allevamento tradizionale.

Gene chimerico: una molecola di DNA che contiene almeno due parti eterologhe, per esempio parti derivate da sequenze di DNA pre-esistenti che non sono associate nel loro stato pre-esistente, queste sequenze essendo state generate preferibilmente mediante la tecnologia del DNA ricombinante.

Cassetta di espressione: una molecola di DNA che contiene un promotore ed un terminatore tra i quali può venire inserita una sequenza codificante.

Sequenza codificante: una molecola di DNA che quando viene trascritta e tradotta, porta come risultato alla formazione di un polipeptide oppure di una proteina.

Gene: una regione cromosomica separata che contiene una sequenza del DNA regolatore responsabile per il controllo di espressione, ossia trascrizione e traduzione di una sequenza codificante che viene trascritta e tradotta in modo da ottenere un polipeptide definito oppure una proteina definita.

Caratteristica fenotipica: una proprietà osservabile che deriva dalla espressione di uno o più geni.

La presente invenzione riguarda metodi per controllare insetti come Coleotteri, Ditteri, Imenotteri, Lepidotteri, Mallofagi, Omotteri, Emitteri,

Ortotteri, Tisanotteri, Dermatteri, Isotteri, Anopluri, Sifonatteri, e Tricotteri. Esempi particolari di tali organismi nocivi costituiti da insetti sono piralide del mais europeo, piralide degli steli di mais, bruco nero, verme delle spighe del mais, verme dell'armata del sud, piralide del mais sud-occidentale, piralide degli steli di mais inferiori, piralide della canna da zucchero, verme della radice del mais occidentale, verme delle radici del mais settentrionale, verme delle radici del mais meridionale, millepiedi, coleottero piatto settentrionale, coleottero piatto meridionale, coleottero giapponese, pulicaria del mais, cimice del mais, afide delle foglie di mais, afide della radici di mais, cimice, cavalletta dalle zampe rosse, cavalletta migratoria, larva dei semi di mais, 'miner' delle macchie del mais, tripide dei cereali, formiche e acaro ragno a due macchie. Nella presente invenzione è compreso qualsiasi metodo in cui una espressione di perossidasi conferisce una resistenza agli insetti in cellule di piante monocotiledoni.

In una forma di realizzazione preferita, la presente invenzione riguarda un metodo per controllare insetti alimentando un insetto oppure ponendo a contatto un insetto con una quantità insetticida di

cellule di piante monocotiledoni transgeniche in cui il genoma di dette cellule di piante codifica un enzima dotato di attività di perossidasi. Dopo l'espressione, la perossidasi conferisce una resistenza nei confronti degli insetti alle cellule di piante transgeniche. Il transgene che codifica le perossidasi costituisce un ulteriore gene inserito nel genoma di una pianta progenitrice che in modo naturale non codifica detta perossidasi.

In una ulteriore forma di realizzazione preferita, si usano i metodi di ricombinazione omologa descritti in Treco et al., WO 94/12650 e Treco et al., WO 95/31560 per fare aumentare l'attività di perossidasi in una monocotiledone e così fare aumentare la resistenza nei confronti degli insetti. In modo specifico, le regioni regolatrici (provenienti da promotori) vengono introdotte nel genoma della pianta in modo da fare aumentare l'espressione della perossidasi endogena che fa aumentare la resistenza della pianta nei confronti degli insetti.

In un'altra forma di realizzazione preferita, la presente invenzione riguarda l'inserimento di una sequenza che codifica perossidasi mancante dei segnali di espressione scelti in una monocotiledone e

nel valutare la pianta monocotiledone transgenica per una espressione aumentata della perossidasi dovuta alle sequenze di controllo endogene nella monocotiledone. Ciò porta come risultato ad un aumento nel numero di copie di sequenze che codificano perossidasi all'interno della pianta.

In una ulteriore forma di realizzazione preferita, la presente invenzione riguarda un metodo per fare aumentare il numero di copie del gene della perossidasi endogena in cui alla pianta monocotiledone viene conferita una resistenza nei confronti degli insetti. Un tale metodo preferibilmente viene realizzato utilizzando metodi di allevamento delle piante tradizionali oppure impiegando tecniche di coltura dei tessuti.

Le piante resistenti agli insetti presentano una resistenza aumentata nei confronti degli insetti rispetto a quella che si trova in piante naturali non manipolate, tale resistenza aumentata essendo dovuta a livelli aumentati di perossidasi.

L'invenzione inoltre riguarda un sacchetto commerciale che contiene semi di una pianta monocotiledone trasformata con il DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica perossidasi, in cui l'espressione della perossidasi

conferisce a detta pianta una caratteristica fenotipica. Entro l'ambito di questa invenzione si preferisce un sacchetto commerciale che contiene semi di una pianta transgenica in cui l'espressione della perossidasi conferisce a detta pianta resistenza o capacità di resistere agli insetti. Un ulteriore oggetto preferito dell'invenzione è un tale sacchetto commerciale insieme con fogli di istruzione per l'impiego dei semi contenuti in esso.

Resistenza nei confronti degli insetti

Preferibilmente, le piante monocotiledoni transgeniche della presente invenzione sono resistenti agli insetti scelti dagli ordini che comprendono, senza essere limitati Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, particolarmente a Coleoptera e Lepidoptera. Per gli scopi della presente invenzione si nota che le piante transgeniche dell'invenzione possono essere resistenti non soltanto a insetti ma anche a funghi, batteri, nematodi, acari e simili.

Le piante di mais della presente invenzione preferibilmente sono resistenti ad un insetto oppure agli insetti scelti dal gruppo che comprende, senza limitazione, *Ostrinia nubilalis*, *Sesemia none-*

grioides, *Agrotis* *Ipsilon*, *Helicoverpa* *zea*,
Spodoptera *frugiperda*, *Diatraea* *grandiosella*,
Elasmopalpus *linosellus*, *Diatraea* *saccharalis*,
Diabrotica *virgifera* *virgifera*, *Diabrotica* *longi-*
cornis *barberi*, *Diabrotica* *undecimpunctata* *howardi*,
Melanotus *spp.*, *Cyclocephala* *borealis*, *Cyclocephala*
immaculata, *Popillia* *japonica*, (larve e adulti),
Chaetocnema *pulicaria*, *Sphenophorus* *maidis*,
Rhopalosiphum *maidis*, *Anuraphis* *maidiradicis*, *Blissus*
leucopterus *leucopterus*, *Melanoplus* *femurrubrum*,
Melanoplus *sanguinipes*, *Hylemya* *platura*, *Agromyza*
parvicornis, *Anaphothrips* *obscurus*, *Solenopsis*
milesta, *Tetranychus* *urticae*.

Le piante di sorgo della presente invenzione preferibilmente sono resistenti ad un insetto oppure ad insetti scelti dal gruppo che comprende, senza limitazione *Chilo* *partellus*, *Spodoptera* *frugiperda*, *Helicoverpa* *zea*, *Elasmopalpus* *linosellus*, *Feltia* *subterranean*, *Phyllophaga* *crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus* *spp.*, *Oulema* *melanopus*, *Chaetocnema* *pulicaria*, *Sphenophorus* *maidis*, *Rhopalosiphum* *maidis*, *Sipha* *flara*, *Blissus* *leucopterus* *leucopterus*, *Contarinia* *sorghicola*, *Tetranychus* *cinnabarinus* e *Tetranychus* *urticae*.

Le piante di frumento della presente invenzione

preferibilmente sono resistenti ad un insetto oppure a insetti scelti dal gruppo che comprende, senza limitazione *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis orthogonia*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, afide del frumento russo; *schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Melanoplus sanguinipes*, *Mayetiola destructor*, Hessian fly; *Sitodiplosis mosellana*, *Meromyza americana*, *Hylemya coarctata*, *Frankliniella fusca*, *Cephus cinctus*, e *Aceria tulipae*.

Le piante di riso della presente invenzione preferibilmente sono resistenti ad un insetto oppure a insetti scelti dal gruppo che comprende senza limitazione *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Colaspis brunnea*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Sitophilus oryzae*, *Nephotettix nigropictus*, *Blissus leucopterus leucopterus* e *Acrosternum hilare*.

Le piante di orzo della presente invenzione preferibilmente sono resistenti ad un insetto oppure a insetti scelti dal gruppo che comprende, senza alcuna limitazione, *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus*

leucopterus, *Acrosternum hilare*, *Euschistus servos*,
Hylemya platura, *Mayetiola destructor*, Hessian fly;
Thysanoptera, Trips; e *Petrobia latens*.

In una forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda una pianta monocotiledone transgenica fertile (monocot) che contiene un DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica la perossidasi.

Le monocotiledoni sono piante il cui embrione ha un solo cotilendone. Le monocotiledoni appartengono ad una delle due grandi classi di angiosperme (le dicotiledoni essendo l'altra classe grande).

Famiglie preferite che rientrano nella classe delle monocotiledoni comprendono: graminacee (famiglia graminacee; membri preferiti delle graminacee comprendono erbe da foraggio (ex *Festuca* (fescue grass)), *Hordeum* (orzo), *Avena* (avena) *Zea mays* (mais), *Triticum* (frumento), *Secale* (segale) *Sorghum vulgare* (sorgo), e *Oryza sativa* (riso)); liliaceae (famiglia Lily, preferibilmente *Allium* (aglio) e *Asparagus*); e Dioscoreaceae (famiglia Yam), le quali tutte sono comprese nella presente invenzione. La presente invenzione comprende inoltre senza limitazione le specie monocotiledoni, per esempio le linee preferite di *Zea mays* comprendono

Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 211D, Funk 2N217A, B73, A632, CM105, B37, B84, B14, Mo17, A188, CG00526, CG00615 e CG00714.

Le proprietà genetiche introdotte mediante ingegneria genetica nei semi transgenici e nelle piante transgeniche citate sopra vengono trasmessi in seguito a riproduzione sessuata oppure mediante crescita vegetativa e così possono venire mantenute e propagate nelle piante discendenti. In generale, tale mantenimento e tale propagazione avviene mediante l'impiego di metodi noti in agricoltura sviluppati per adattarsi a scopi specifici per esempio aratura, semina oppure raccolta. Si possono anche applicare i processi specializzati come tecniche idroponiche oppure tecnologia in serra. Poiché la coltura in fase di crescita è vulnerabile nei confronti dell'attacco e dei danni provocati da insetti oppure da infezioni ed anche è vulnerabile nei confronti di una competizione da parte di piante infestanti, si devono prendere delle precauzioni per controllare erbe infestanti, malattie delle piante, insetti, nematodi e altre condizioni negative in modo da fare migliorare la resa. Queste precauzioni comprendono misure meccaniche come aratura del terreno oppure allontanamento delle erbacce e delle piante

infestate, e anche l'applicazione di composti chimici per l'agricoltura come erbicidi, fungicidi, gametocidi, nematocidi, regolatori della crescita, agenti di maturazione e insetticidi.

L'impiego delle proprietà genetiche vantaggiose delle piante transgeniche e dei semi transgenici secondo l'invenzione può venire ulteriormente realizzato nell'allevamento di piante che tende allo sviluppo di piante con proprietà migliorate come resistenza nei confronti di organismi nocivi, di erbicidi oppure di sollecitazione, valore nutrizionale migliorato, resa aumentata oppure struttura migliorata che provoca una minore perdita dovuta a ripiegamento oppure a distruzione. I diversi stadi di coltivazione sono caratterizzati da un intervento umano ben definito come la selezione di linee da incrociare, la direzione della impollinazione delle linee parentali oppure la selezione di opportune piante discendenti. A seconda delle proprietà desiderate si devono prendere differenti misure di coltivazione. Le tecniche relative sono ben note nel settore e comprendono senza alcuna limitazione, una ibridazione, un incrocio tra piante affini, un retroincrocio, una coltura di linee multiple, una miscelazione di varietà, una ibridazione inter-

specifica, tecniche aneuploidi, ecc. Le tecniche di ibridazione comprendono anche la sterilizzazione di piante per rendere sterili le piante maschi oppure femmine mediante i mezzi meccanici, chimici oppure biochimici. Una impollinazione incrociata di una pianta maschio sterile con polline proveniente da una linea differente assicura che il genoma della pianta maschio sterile però della pianta femmina fertile riceverà in modo uniforme proprietà delle due linee parentali. Così, i semi transgenici e le piante transgeniche secondo l'invenzione possono venire usate per la coltura di linee di piante migliorate che per esempio presentano una efficacia aumentata nei confronti di metodi tradizionali come trattamento con erbicidi oppure con pesticidi oppure consentono di fare a meno di detti metodi a causa delle loro proprietà genetiche modificate. Come alternativa, si possono ottenere colture nuove con una migliorata resistenza nei confronti di sollecitazioni, le quali a causa del loro 'corredo' genetico ottimizzato danno un raccolto di migliore qualità rispetto ai raccolti di piante che non erano in grado di sopportare condizioni di sviluppo avverse paragonabili.

Nella produzione dei semi la qualità e la uniformità di germinazione dei semi sono caratteri-

stiche del prodotto essenziali, mentre la qualità e la uniformità di germinazione di semi raccolti e posti in commercio dal contadino non è importante. Poiché è difficile mantenere libera una coltura da un'altra coltura e da semi di erbe infestanti, per controllare malattie dei semi e per produrre semi dotati di una buona germinazione, si sono sviluppate pratiche di produzione dei semi abbastanza estese e ben definite da parte dei produttori dei semi che sono state sperimentate nel settore della crescita, del condizionamento e della vendita di semi puri. Così, è pratica comune per l'agricoltore acquistare semi dotati di certificato che soddisfano a standard di qualità specifici invece di usare semi raccolti dal suo campo. Un materiale di propagazione da usare come seme viene trattato usualmente con un rivestimento protettivo che comprende erbicidi, insetticidi, fungicidi, battericidi, nematocidi, molluschi-cidi oppure loro miscele. Rivestimenti di protezione normalmente usati comprendono composti come captan, carboxin, thiram (TMTD®), methalaxyl (Apron®) e pirimiphos-methyl (actellic®). Se si desidera, questi composti vengono formulati insieme con ulteriori sostanze-veicolo, tensioattivi oppure sostanze che favoriscono l'applicazione impiegati usualmente nel

settore della formulazione in modo da ottenere una protezione contro un danno provocato da organismi nocivi costituiti da batteri, funghi oppure animali. I rivestimenti protettivi possono venire applicati impregnando il materiale di propagazione con una formulazione liquida oppure rivestendolo con una formulazione combinata umida oppure secca. Sono possibili anche altri metodi di applicazione come trattamento diretto in corrispondenza dei germogli oppure dei frutti.

Un ulteriore aspetto della presente invenzione consiste nel mettere a disposizione nuovi metodi di agricoltura come i metodi esemplificati sopra che sono caratterizzati dall'impiego di piante transgeniche, di un materiale vegetale transgenico oppure di semi transgenici secondo la presente invenzione.

In un'altra forma di realizzazione, la presente invenzione riguarda una cellula, un tessuto, un organo, un seme oppure una parte di una pianta transgenici ottenuti dalla pianta transgenica. Entro l'ambito della invenzione sono compresi anche discendenti transgenici della pianta e anche cellule, tessuti, organi, semi e parti vegetali di piante transgeniche ottenuti dai discendenti.

Come qui descritto, la presente invenzione

riguarda una pianta monocotiledone transgenica fertile trasformata con una sequenza che codifica la perossidasi. Preferibilmente, la sequenza che codifica la perossidasi conferisce alla pianta monocotiledone una caratteristica fenotipica che non si trova in una pianta di origine che manca della sequenza che codifica la perossidasi oppure che manca di una sua iperespressione. Le caratteristiche fenotipiche che possono venire prodotte comprendono resistenza agli insetti e stabilità aumentata.

Più preferibilmente, la sequenza che codifica la perossidasi nella pianta transgenica viene trasmessa per via sessuale. In una forma di realizzazione preferita, la sequenza che codifica la perossidasi viene trasmessa in modo sessuale attraverso un ciclo sessuale normale completo della pianta R0 alla generazione R1. In modo ulteriormente preferito, la sequenza che codifica la perossidasi viene espressa in modo che il livello della perossidasi nelle cellule, nei tessuti, nei semi oppure nella pianta viene aumentato al di sopra del livello contenuto nelle cellule, nei tessuti, nei semi oppure nella pianta di una pianta monocotiledone che differisce soltanto per il fatto che è assente la sequenza che codifica la perossidasi.

In una forma di realizzazione preferita, la sequenza che codifica la perossidasi è una sequenza che codifica una perossidasi anionica, cationica oppure neutra. In un'altra forma di realizzazione preferita, la perossidasi è guaiacol perossidasi, NADH perossidasi, citocromo-C perossidasi, catalasi, glutatione perossidasi, L-ascorbato perossidasi, manganese perossidasi, perossidasi che genera perossido di idrogeno e/o perossidasi che forma lignina.

Nel settore sono disponibili svariate sequenze che codificano la perossidasi e tali sequenze sono disponibili per l'impiego nella presente invenzione. Per esempio, perossidasi sono state clonate da tabacco (Lagrimini, M. *Et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7542-7546 (1987), patata (Roberts *et al.*, *Plant Molecular Biology* 11:5-26 (1988)); rafano (Fujiyama *et al.*, *European Journal of Biochemistry*, 173, 681-687 (1988); Fujiyama *et al.*, *Gene* 89: 163-169 (1990); e Welinder, K.G., *European Journal of Biochemistry* 96:483-502 (1979)), pomodoro (Roberts, E. e Kolattukudy. P.E., *Molecular Genes and Genetics*, 217, 223-232 (1989)); arachide (Buffard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8874-8878 (1990)); cetriolo (Morgens *et al.*, *Plant Molecular Biology* 14:715-725 (1990)), *Arabidopsis* (Intrapruk *et al.*, *Gene* 98:237-

241 (1991)); frumento (Hertig et al., *Plant Molecular Biology* 16:171-174 (1991)); e Rebmann et al., *Plant Molecular Biology* 16:329-331 (1991)), orzo (Rasmussen et al., *Plant Molecular Biology* 16:317-327 (1991)); e Theilade, B. e Rasmussen, S.K., *Gene* 118:261-266 (1992)), riso (Reimman et al., *Plant Physiology* 100:1611-1612 (1992)), mais (Hwang, Ph.D. thesis, Ohio State University), e rapa (Mazza e Welinder, *European Journal of Biochemistry* 108:481-489 (1980)).

Le sequenze che codificano la perossidasi usate nella presente invenzione non devono essere limitate alle sequenze che codificano la perossidasi note. Le nuove sequenze che codificano perossidasi per l'impiego nell'invenzione possono venire isolate per identità oppure somiglianza con sequenze note. La perossidasi anionica del tabacco presenta identità oppure somiglianza con le sequenze di amminoacidi della perossidasi cationica del rafano e con la perossidasi cationica della rapa. L'identità completa oppure la somiglianza tra tabacco e rafano è 52%; per tabacco e rapa, le perossidasi hanno una identità o somiglianza del 46%. Inoltre, vi sono regioni nella sequenza che codifica perossidasi, in cui l'identità oppure la somiglianza si avvicina a 100%. Quattro di queste regioni conservate corrispondono ai settori

critici per l'attività generale della perossidasi. Pertanto, le sequenze di DNA provenienti dalle zone conservate possono venire utilizzate per clonare in generale sequenze che codificano perossidasi da qualsiasi specie di pianta adottando metodi ben noti nel settore (vedere per esempio *Current Protocols in Molecular Biology*, ed.: Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (Spring 1996)).

Parimenti, si possono isolare nuove sequenze che codificano perossidasi impiegando anticorpi prodotti contro un enzima perossidasi in modo da isolare altri enzimi costituiti da perossidasi. L'omologia tra i diversi isozimi di perossidasi è stata dimostrata con anticorpi prodotti contro la perossidasi anionica del tabacco. Mediante analisi immunoblot questi anticorpi hanno reagito in modo incrociato fortemente con gli isozimi di rafano e di rapa ed inoltre hanno reagito in modo incrociato con la massima parte degli altri isozimi di tabacco. Vedere Lagrimini, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7542-7546 (1987). I nuovi enzimi costituiti da perossidasi possono venire sequenziati adottando metodi ben noti nel settore e le loro corrispondenti sequenze codificanti possono venire isolate adottando metodi ben noti nel settore (vedere per esempio Sanbrook et al.,

Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2° edizione, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA (1988)).

L'espressione transgenica in piante di sequenze che codificano perossidasi derivate da origini diverse della pianta ospite (per esempio derivate da batteri) può richiedere la modificazione di queste sequenze codificanti in modo da realizzare e ottimizzare la loro espressione nella pianta ospite. In certi casi sarà necessaria una modificazione delle sequenze codificanti e di una sequenza adiacente. È sufficiente isolare un frammento che contiene la sequenza codificante che interessa e inserirla a valle di un promotore della pianta. Per esempio vedere Gaffney et al., *Science* 261:754-756 (1993). Preferibilmente, una sequenza microbica adiacente piccola deve venire lasciata collegata a monte del ATG e a valle del codone di arresto.

La sequenza che codifica perossidasi può venire ottimizzata per una espressione aumentata nella pianta monocotiledone ospite. Per esempio, poiché l'impiego del codone preferito e la frequenza del codone nella pianta ospite può differire dall'impiego e dalla frequenza della sequenza codificante la perossidasi che interessa, un confronto dell'impiego e della frequenza di codoni all'interno di una

sequenza codificante clonata con l'impiego e la frequenza in sequenze codificanti di piante (e in particolare sequenze codificanti provenienti dalla pianta bersaglio) consente una identificazione dei codoni all'interno della sequenza codificante che preferibilmente possono venire cambiati. I codoni preferiti possono venire determinati dai codoni di massima frequenza nelle proteine espresse nella massima quantità nella pianta oppure dai codoni più preferiti nella pianta. Vedere per esempio Adang et al., EP-A-359 472; Fischhoff et al., EP-A-385 962; Cornelissen et al., WO 91/16432; Koziel et al., WO 93/07278; Perlak et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3324-3328 (1991); e Murray et al., *Nucleic Acids Research* 17:477-498 (1989).

In questo modo le sequenze di nucleotidi possono venire rese ottimali per l'espressione nella pianta specifica che interessa. È noto che tutta la sequenza codificante oppure qualsiasi parte della sequenza codificante può venire resa ottimale oppure può essere sintetica. Ossia, si possono usare anche sequenze sintetiche oppure parzialmente ottimizzate.

Le piante differiscono dai microrganismi per il fatto che i loro messaggi non possiedono un sito di legame del ribosoma definito. Piuttosto, i ribosomi

si collegano alla estremità 5' del messaggio e esplorano il primo ATG disponibile in corrispondenza del quale deve iniziare la traduzione. In piante, vi è una preferenza per certi nucleotidi adiacenti al ATG e così l'espressione di geni microbici può venire aumentata mediante inclusione di un iniziatore di traduzione consensus eucariotico in corrispondenza di ATG. Clontech (catalogo 1993/1994, pg. 210) hanno suggerito una sequenza come iniziatore di traduzione consensus per l'espressione del gene *uidA* di *E. coli* in piante. Inoltre, Joshi, *Nucl. Acid Res.* 15:6643-6653 (1987) ha confrontato molte sequenze di piante adiacenti al ATG e suggerisce inoltre una sequenza consensus. In situazioni in cui si incontrano difficoltà nella espressione di sequenza codificanti microbiche in piante, si preferisce l'inclusione di una di queste sequenze in corrispondenza del ATG di inizio.

Sequenze codificanti clonate da sorgenti non vegetali possono inoltre contenere unità ricorrenti che possono venire riconosciute in piante in corrispondenza dei siti splice 5' oppure 3', generando così messaggi troncati oppure cancellati. Questi siti possono venire rimossi adottando tecniche ben note nel settore (vedere per esempio Current

Protocols in Molecular Biology, ed.: Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc., New York NY (Spring 1996)).

Un DNA ricombinante che contiene una sequenza codificante che codifica una perossidasi può venire usato per produrre tessuti di piante transgeniche. Preferibilmente, una pianta viene trasformata con almeno un DNA ricombinante che inoltre può contenere una regione di inizio della trascrizione ed un promotore entrambi essendo collegati in modo operativo con la sequenza che codifica la perossidasi.

Le regioni di inizio della trascrizione possono essere naturali oppure possono essere estranee per l'ospite. Con il termine estraneo si intende che la regione di inizio della trascrizione non si trova nell'ospite di tipo selvaggio nel quale viene introdotta la regione di inizio della trascrizione.

La regione di terminazione può venire ottenuta (1) dal medesimo gene dal quale è stata ottenuta la regione di inizio della trascrizione, (2) dal gene della perossidasi usato oppure (3) può essere derivato da un'altra sorgente.

La sequenza che codifica la perossidasi preferibilmente è fusa in modo operativo con un promotore esprimibile nella pianta, promotori

preferibili comprendono promotori costitutivi, inducibili, temporaneamente regolati, regolati nello sviluppo, chimicamente regolati, promotori tessuto-preferiti e/o tessuto-specifici. In una forma di realizzazione preferita, la sequenza che codifica la perossidasi è collegata in modo operativo con un suo promotore che si trova in modo naturale e/o con una sequenza del segnale di poliadenilazione.

Promotori costitutivi preferiti comprendono i promotori 35S e 19S di CaMV (Fraley et al., brevetto U.S. NO. 5.352.605). Un promotore ulteriormente preferito è derivato da uno qualsiasi di parecchi dei geni di actina che sono noti per il fatto che vengono espressi nella massima parte dei tipi di cellule. Le cassette di espressione del promotore descritte da McElroy et al., *Mol. Gen. Genet.* 231:150-160 (1991) possono venire facilmente modificate per l'espressione della sequenza che codifica la perossidasi e sono particolarmente adatte per l'impiego in piante ospiti monocotiledoni.

Ancora un altro promotore costituito preferito è derivato da ubiquitina che è un altro prodotto del gene noto per il fatto che si accumula in molti tipi di cellule. Il promotore della ubiquitina è stato clonato da diverse specie per l'impiego in piante

transgeniche (per esempio girasole - Binet et al., Plant Science 79: 87-94 (1991), mais - Christensen et al., Plant Molec. Biol. 12:619-632 (1989)). Il promotore della ubiquitina di mais è stato sviluppato in sistemi monocotiledoni transgenici e la sua sequenza e i vettori costruiti per la trasformazione di monocotiledoni vengono descritti in Christiansen et al., EP-A-342.926. Il promotore della ubiquitina è adatto per l'espressione della sequenza che codifica la perossidasi in piante transgeniche, in particolare monocotiledoni.

I promotori tessuto-specifici oppure tessuto-prefenziali utili per l'espressione della sequenza che codifica la perossidasi in piante, in particolare mais sono quelli che dirigono una espressione in radici, midollo, foglia oppure polline. Tali promotori vengono descritti in Koziel et al., WO 93/07278. Si preferiscono inoltre promotori chimicamente inducibili utili per dirigere l'espressione della sequenza che codifica la perossidasi in piante (vedere Alexander et al., WO 95/19443).

Oltre ai promotori, sono inoltre disponibili svariati terminatori della trascrizione per l'impiego nella costruzione di un gene chimerico impiegando una sequenza che codifica la perossidasi. I terminatori

della trascrizione sono responsabili della terminazione della trascrizione al di là del transgene e della sua poliadenilazione corretta. Adatti terminatori di trascrizione e quelli che sono noti perché agiscono nelle piante comprendono il terminatore 35S di CaMV, il terminatore *tml*, il terminatore *rbcS* E9 dei piselli e altri noti nel settore. Le regioni di terminazione adatte sono disponibili dal plasmide Ti di *A. tumefaciens* come le regioni di terminazione della octopina sintasi e della nopalina sintasi. Vedere anche Rosenberg et al., *Gene*, 56:125 (1987); Guerineau et al., *Mol. Gen. Genet.*, 262:141-144 (1991); Proudfoot, *Cell*, 64:671-674 (1991); Sanfacon et al., *Genes Dev.*, 5:141-149; Mogen et al., *Plant Cell*, 2:1261-1272 (1990); Munroe et al., *Gene*, 91:151-158 (1990); Ballas et al., *Nucleic Acids Res.* 17:7891-7903 (1989); Jopshi et al., *Nucleic Acid Res.*, 15:9627-9639 (1987)).

Sono state trovate inoltre numerose sequenze che fanno aumentare l'espressione del gene all'interno dell'unità di trascrizione e queste sequenze possono venire usate insieme con la sequenza che codifica perossidasi per fare aumentare l'espressione in piante transgeniche. Si è dimostrato che diverse sequenze di introni fanno aumentare l'espressione, in

particolare in cellule di piante monocotiledoni. Per esempio, si è trovato che gli introni del gene *Adhl* del mais fanno aumentare in modo significativo l'espressione del gene di tipo selvaggio sotto il suo promotore affine quando vengono introdotti in cellule di mais (Callis et al., *Genes Develop.* 1:1183-1200 (1987)). Le sequenze degli introni sono state incorporate in modo routinario in vettori di trasformazione delle piante, tipicamente all'interno del leader non tradotto.

Il costrutto può anche comprendere un regolatore come un segnale di localizzazione nucleare (Kalderon et al. *Cell* 39:499-509 (1984); e Lassner et al., *Plant Molecular Biology* 17:229-234 (1991)); una sequenza consenso di traduzione nelle piante (Joshi, C.P., *Nucleic Acids Research* 15:6643-6653 (1987)), un introne (Luehrsen e Walbot, *Mol. Gen. Genet.* 225:81-93 (1991)), e simili collegati in modo operativo alla opportuna sequenza del nucleotide.

Preferibilmente, la sequenza leader 5' viene inclusa nel costrutto della cassetta di espressione. Tali sequenze leader possono agire nel senso di fare aumentare la traduzione. Nel settore sono noti leader di traduzione e comprendono: leader di picornavirus, per esempio il leader EMCV (regione non codificante

5' della encefalomiocardite) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., e Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126-6130 (1989)); leader dei potivirus per esempio il leader TEV (virus di attacco del tabacco) (Allison et al., il leader MDMV (virus del mosaico nano del tabacco); *Virology*, 154:9-20 (1986)) e la proteina che si lega alle catene pesanti di una immunoglobulina umana (BiP), (Macejak, D.G., e Samow, P., *Nature* 353:90-94 (1991); il leader non tradotto derivato dal mRNA della proteina di rivestimento del virus del mosaico dell'erba medica (AMV RNA 4) (Jobling, S.A., e Gebrke, L., *Nature*, 325:622-625 (1987)); il leader del virus del mosaico del tabacco (TMV) (Gallie, D.R., et al., *Molecular-Biology of RNA*, pg. 237-256 (1989); e il leader del virus della muffa clorotica del mais (MCMV) (Lommel, S.A. et al., *Virology* 91:382-385 (1991)). Vedi anche Della-Cioppa et al., *Plant Physiology* 84:965-968 (1987).

Nella preparazione del DNA ricombinante, diversi frammenti del DNA possono venire manipolati in modo da ottenere le sequenze del DNA nell'orientamento opportuno e come è opportuno, nello schema di lettura adatto. Per questo scopo, si possono impiegare adattatori oppure linker per collegare i frammenti del DNA oppure si possono effettuare altre manipola-

zioni per ottenere siti di restrizione opportuni, l'allontanamento del DNA superfluo, l'allontanamento di siti di restrizione o simili. Per questo scopo, si adottano preferibilmente una mutagenesi in vitro, una riparazione dell'innesco, una restrizione, una riassociazione, una resezione, una legatura o simili, in cui sono coinvolti inserimenti, delezioni oppure sostituzioni, per esempio transizioni e transversioni.

Per la trasformazione delle piante sono disponibili numerosi vettori di trasformazione e le sequenze che codificano perossidasi possono venire usati in combinazione con uno qualsiasi di tali vettori. La selezione di un vettore da impiegare dipenderà dalla tecnica di trasformazione preferita e dalla specie bersaglio per la trasformazione. Per certe specie bersaglio, si preferiscono differenti marcatori di selezione nei confronti di antibiotici oppure di erbicidi. I marcatori di selezione utilizzati in modo routinario nella trasformazione comprendono il gene *nptII* che conferisce resistenza alla canamicina e antibiotici correlati (Messing & Vierra, *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al., *Nature* 304:184-187 (1983)), il gene *bar* che conferisce resistenza all'erbicida fosfinotricina (White et al., *Nucl.*

Acids Res. 18:1062 (1990), Spencer et al., *Theor. Appl. Genet.* 79: 625-631 (1990), il gene *hph* che conferisce resistenza all'antibiotico igromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol. Cell. Biol.* 4:2929-2931), e il gene *dhfr* che conferisce resistenza al metotrexato (Bourouis et al., *EMBO J.* 2:1099-1104 (1983)).

Sono disponibili molto vettori per la trasformazione impiegando *Agrobacterium tumefaciens*. Questi in modo tipico portano almeno una sequenza 'border' del DNA-T e comprendono vettori come pBIN19 (Bevan, *Nucl. Acids Res.* 12(22):8711-8721 (1984)). In una forma di realizzazione preferita la sequenza che codifica la perossidasi può venire inserita nell'uno o nell'altro dei vettori binari pCIB200 e pCIB2001 per l'impiego con *Agrobacterium*. Queste cassette dei vettori per una trasformazione mediata da *Agrobacterium* possono venire costruite nel modo seguente. pTJS75kan è stato creato mediante digestione con *NarI* di pTJS75 (Schmidhauser & Helinski, *J. Bacteriol.* 164: 446-455 (1985)), e ciò consente la recisione del gene della resistenza alla tetraciclina a cui si fa seguire l'inserimento di un frammento *AccI* derivato da pUC4K che porta un NPTII (Messing & Vierra, *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan et al., *Nature*

304:184-187 (1983); McBride et al., *Plant Molecular Biology*, 14:266-276 (1990)). I linker *XhoI* sono stati sottoposti a legatura al frammento *EcoRV* di pCIB7 che contiene i border sinistro e destro del DNA-T, un gene chimerico *nos/nptII* selezionabile nella pianta e il polilinker pUC (Rothstein et al., *Gene* 53: 153-161 (1987)), e il frammento sottoposto a digestione con *XhoI* è stato clonato in pTJS75kan sottoposto a digestione con *SaII* per creare pCIB200 (vedere anche EP-A-332104, esempio 19). PCIB200 contiene i seguenti siti di restrizione del polilinker unici: *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BgIII*, *XbaI* e *Sall*. pCIB2001 è un derivato di pCIB200 che viene creato mediante inserimento nel polilinker di ulteriori siti di restrizione. Siti di restrizione unici nel polilinker di pCIB2001 sono *EcoRI*, *SstI*, *KpnI*, *BgIII*, *XbaI*, *SaII*, *MluI*, *BclI*, *AvrII*, *ApaI*, *HpaI*, e *StuI*. pCIB2001, che oltre a contenere questi siti unici di restrizione contiene anche una selezione nei confronti della canamicina della pianta e batterica, border di DNA-T sinistro e destro per la trasformazione mediata da *Agrobacterium*, la funzione *trfA* derivata da RK2 per la mobilizzazione tra *E. coli* e altri ospiti, e le funzioni *OriT* e *OriV* derivate anche esse da RK2. Il polilinker pCIB2001 è adatto

per la clonazione di cassette di espressione di piante che contengono i loro propri segnali regolatori.

Un ulteriore vettore utile per la trasformazione mediante da *Agrobacterium*, è il vettore binario pCIB10 che contiene un gene che codifica la resistenza alla canamicina per la selezione in piante, sequenze 'border' destra e sinistra di DNA-T e che contiene incorporate sequenze derivate dal plasmide ad ampio spettro di infettività dell'ospite pRK252 che gli consente di replicarsi sia in *E. coli* che in *Agrobacterium*. La sua costruzione è descritta da Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987). Sono stati costruiti diversi derivati di pCIB10 che contengono incorporato il gene per la igromicina B-fosfotransferasi descritto da Gritz et al., Gene 25: 179-188 (1983). Questi derivati consentono una selezione di cellule di piante transgeniche soltanto su igromicina (pCIB743), oppure su igromicina e canamicina (pCIB715, pCIB717).

Un tale vettore utile per tecniche di trasferimento del gene diretto in combinazione con una selezione con l'erbicida Basta (oppure fosfinotricina) è il pCIB3064. Questo vettore si basa sul plasmide pCIB246 che comprende il promotore 35S

di CaMV in una fusione operativa con il gene GUS di *E. coli* e il terminatore della trascrizione CaMV 35S e viene descritto in Koziel et al., WO 93/07278. Il gene che fornisce la resistenza alla fosfinotricina è il gene *bar* derivato da *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., *EMBO J.* 6:2519-2523 (1987)). Questo vettore è adatto per la clonazione di cassette di espressione di piante che contengono i loro propri segnali regolatori.

Un ulteriore vettore di trasformazione è pSOG35 che utilizza la diidrofolato reduttasi (DHFR) del gene di *E. coli* come marcatore selezionabile che conferisce resistenza al metotrexato. Si utilizza la PCR per amplificare il promotore 35S (~ 800 bp), l'introne 6 proveniente dal gene *Adh1* del mais (~ 550 bp; vedere Dennis et al., *Nucleic Acid Res.* 12: 3983-4000 (1984)) e 18 bp della sequenza leader non tradotta GUS (vedere Jefferson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8447-8451 (1986)). Un frammento da 250 bp che codifica il gene di tipo II di diidrofolato reduttasi di *E. coli* è stato anche amplificato mediante PCR e questi due frammenti ottenuti mediante PCR sono stati combinati con il frammento *SacI-PstI* ottenuto da pBI221 (Clontech) che comprendeva lo scheletro del vettore pUC19 e il terminatore

della nopalina sintasi. La riunione di questi frammenti ha generato pSOG19 che contiene il promotore 35S in fusione con la sequenza dell'introne 6, il leader GUS, il gene DHFR e il terminatore della nopalina sintasi. La sostituzione del leader GUS in pSOG19 con la sequenza leader derivata dal virus della muffa clorotica del mais (MCMV) ha generato il vettore pSOG35. pSOG19 e pSOG35 portano il gene pUC per la resistenza alla ampicillina e hanno siti *HindIII*, *SphI*, *PstI* e *EcoRI* disponibili per la clonazione di sequenze estranee.

Il DNA ricombinante descritto sopra può venire introdotto nella cellula di una pianta in differenti modi noti nel settore. Coloro che sono esperti nel settore comprenderanno che la scelta del metodo dipenderà dal tipo della pianta presa in considerazione per la trasformazione. Adatti metodi di trasformazione di cellule vegetali comprendono microiniezione (Crossway et al., *BioTechniques* 4:320-334 (1986)), elettroporazione (Riggs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606 (1986)), trasformazione mediata da *Agrobacterium* (Hinchee et al., *Biotechnology* 6:915-921 (1988); vedi anche Ishida et al., *Nature Biotechnology* 14:745-750 (giugno 1996) per la trasformazione del mais), trasferimento

diretto del gene (Paszkowski et al., *EMBO J.* 3: 2717-2722 (1984); Hayashimoto et al., *Plant Physiol.* 93: 857-863 (1990)(riso)), e accelerazione balistica di particelle usando dispositivi disponibili da Agracetus Inc., Madison, Wisconsin e Dupont, Inc., Wilmington, Delaware (vedi, per esempio, Sanford et al., brevetto U.S. 4.945.050; e McCabe et al., *Biotechnology* 6:923-926 (1988)). Vedi anche Weissinger et al., *Annual Rev. Genet.* 22:421-477 (1988); Sanford et al., *Particulate Science and Technology* 5:27-37 (1987)(aglio); Svab et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530 (1990) (cloroplasto del tabacco); Christou et al., *Plant Physiol.* 87: 671-674 (1988)(soia); McCabe et al., *Bio/Technology* 6:923-926 (1988)(soia); Klein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4305-4309 (1988)(mais); Klein et al., *Bio/Technology* 6:559-563 (1988)(mais); Klein et al., *Plant Physiol.* 94:440-444 (1988)(mais); Fromm et al., *Bio/Technology* 8:833-839 (1990); e Gordon-Kamm et al., *Plant Cell* 2:603-618 (1990)(mais); Koziel et al., *Biotechnology* 11:194-200 (1993)(mais); Shimamoto et al., *Nature* 338:274-277 (1989)(riso); Christou et al., *Biotechnology* 9:957-962 (1991) (riso); Datta et al., *Bio/Technology* 8:736-740 (1990)(riso); domanda di brevetto europeo EP-A-332 581 (erba da frutteto e

altre *Pooideae*); Vasilet *al.*, *Biotechnology* 11:1553-1558 (1993) (frumento); Weeks *et al.*, *Plant Physiol.* 102:1077-1084 (1993) (frumento); Wan *et al.*, *Plant Physiol.* 104:37-48 (1994) (orzo); Jahne *et al.*, *Theor. Appl. Genet.* 89:525-533 (1994) (orzo); Umbeck *et al.*, *Bio/Technology* 5:263-266 (1987) (cotone); Casas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216 (dicembre 1993) (sorgo); Somers *et al.*, *Bio/Technology* 10:1589-1594 (dicembre 1992) (avena); Torbert *et al.*, *Plant Cell Reports* 14:635-640 (1995) (avena); Weeks *et al.*, *Plant Physiol.* 102: 1077-1084 (1993) (frumento); Chang *et al.*, WO 94/13822 (frumento) e Nehra *et al.*, *The Plant Journal* 5:285-297 (1994) (frumento).

Una serie di forme di realizzazione particolarmente preferite per l'introduzione di molecole di DNA ricombinante in mais mediante bombardamento di microproiettili si può trovare in Koziel *et al.*, *Biotechnology* 11:194-200 (1993), Hill *et al.*, *Euphytica* 85:119-123 (1995) e Koziel *et al.*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 792:164-171 (1996). Un'ulteriore forma di realizzazione preferita riguarda il metodo di trasformazione di protoplasti per il mais come descritto in Shillito *et al.*, EP-A-292 435.

La trasformazione delle piante può venire

realizzata con una singola specie di DNA oppure con specie multiple di DNA (ossia co-trasformazione) ed entrambe queste tecniche sono adatte per venire usate con la sequenza che codifica la perossidasi.

Metodi in cui si usano o una forma di trasferimento del gene, una tecnologia di bombardamento di particelle 'gun' oppure un trasferimento mediato da *Agrobacterium* di solito, ma non necessariamente, vengono realizzati con un marcatore selezionabile oppure valutabile che fornisce una resistenza nei confronti di un antibiotico (per esempio canamicina, igromicina oppure metotrexato) oppure nei confronti di un erbicida (per esempio fosfinotricina). Esempi di tali marcatori sono neomicina fosfotransferasi, igromicina fosfotransferasi, diidrofolato reduttasi, fosfinotricina acetiltransferasi, acido 2,2-dicloro-propionico dealogenasi, acetoidrossiacido sintasi, 5-enolpiruvil-scichimato-fosfato sintasi, aloaril-nitrilasi, acetil-coenzima A carbossilasi, diidro-pterato sintasi, cloramfenicolo acetil transferasi e β -glucoronidasi. La scelta di un marcatore selezionabile per la trasformazione delle piante tuttavia non è critica per l'invenzione.

La sequenza che codifica la perossidasi preferibilmente viene usata da sola oppure in

combinazione. Ossia, una o più sequenze che codificano perossidasi possono venire inserite in una pianta per controllare organismi nocivi costituiti da insetti differenti. Ciò può venire realizzato (1) trasformando una pianta ospite con una sequenza di DNA che comprende più di una sequenza che codifica perossidasi, (2) trasformando una pianta ospite con una sequenza del DNA che comprende una singola sequenza che codifica perossidasi e che identifica inserimenti multipli della sequenza del DNA nel genoma dell'ospite, oppure (3) una trasformazione ripetuta della pianta ospite con una sequenza che codifica la perossidasi fino a che la pianta ospite contiene il numero desiderato di sequenze che codificano la perossidasi.

Il livello di protezione nei confronti degli insetti di una pianta contro un determinato insetto e/o il suo spettro di attività insetticida possono anche venire aumentati combinando una sequenza che codifica perossidasi con altre sequenze codificanti che codificano proteine in grado di controllare insetti.

Bacillus thuringiensis (Bt) è un batterio gram-positivo che forma spore, che produce un cristallo parasporale durante la sporulazione (per la rassegna vedere Koziel et al., *Biotech. and Gen. Engin.*

Reviews 11:171-228 (1993)). Questi cristalli sono costituiti prevalentemente da una o più proteine, denominate δ -endotossine oppure proteine cristalline insetticide, note perchè possiedono una attività insetticida quando vengono ingerite da certi insetti. Attualmente sono noti numerosi ceppi di Bt. Ciascun ceppo produce numeri differenti di δ -endotossine con attività insetticide differenti. Esempi di endotossine di Bt che possono venire usate in combinazione con le perossidasi comprendono, ma non sono limitate a queste, CryIA(b) (Koziel et al., *Bio/Technology* 11:194-200 (1993)), CryIA(c) (brevetto US 5.530.197), CryIH (denominata anche Cry9C) (Lambert et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:80-86 (1996)), e CryIIIA (Adang et al., *Plant Mol. Biol.* 21:1131-1145 (1993)).

Le proteine pesticide prodotte durante la crescita vegetativa di ceppi di *Bacillus* (proteine insetticide vegetative, VIP) possono anche esse venire usate in combinazione con le perossidasi. Per esempi di VIP, vedere Warren et al., WO 94/21795; Warren et al., WO 96/10083; e Estruch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5389-5394 (1996).

Esempi di altre proteine con proprietà insetticidi che possono venire usate in combinazione

con le perossidasi comprendono, senza essere limitate a queste, colesterolo-ossidasi (brevetto US 5.518.908), inibitori delle proteasi, lectine e α -amilasi.

Le monocotiledoni che esprimono più di una sequenza che codifica una resistenza nei confronti degli insetti possono venire prodotte mediante un qualsiasi metodo noto nel settore. Per esempio, la sequenza che codifica perossidasi può venire usata per trasformare una monocotiledone contemporaneamente con un altro gene 'principle' di insetti (co-trasformazione), il secondo gene 'principle' degli insetti può venire introdotto in una pianta che è già stata trasformata con una sequenza che codifica la perossidasi oppure vice versa oppure come alternativa piante transgeniche, una delle quali esprime una sequenza che codifica la perossidasi e l'altra che esprime un secondo gene degli insetti possono venire incrociate in modo da mettere insieme le sequenze codificanti nella medesima pianta.

La presente invenzione viene descritta più dettagliatamente nei seguenti esempi non limitativi. Negli esempi, i procedimenti per produrre, manipolare e analizzare acidi nucleici vengono effettuati mediante procedimenti standard come descritti in

Sambrook et al. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2° edizione, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA (1988).

ESEMPI

Esempio 1 Pianta di mais transgeniche che contengono una sequenza che codifica una perossidasi

Costruzione del vettore

pPOD_{3,5} (Lagrimini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:438-442 (1987)) contiene il cDNA della perossidasi anionica del tabacco da 1256 bp che contiene l'intera sequenza che codifica la perossidasi, che comprende un peptide da segnale da 22 amminoacidi che facilita la secrezione nello spazio della parete cellulare. pPOD_{3,5} è stato sottoposto a digestione con *BamHI* ed è stato clonato nei siti *BamHI* di pCIB710 (Rothstein et al., Gene 53:153-161 (1987)). Questo nuovo costrutto è stato sottoposto a digestione con *EcoRI* ed è stato subclonato in Bluescript SK+ (Stratagene Catalogue, 1994), il costrutto ottenuto denominato pJS20293 (figura 1) è stato posto in deposito presso Agricultural Research Culture Collection (NRRL) International Depositary Authority, 1815 N. University Street, Peoria IL 61604 U.S.A. il 27 settembre 1996, come NRRL B-21626.pJS20293 contiene il clone cDNA della perossidasi da 1200 bp dietro il

promotore CaMV 35S e l'introne ristretto (Werr et al., EMBO J. 4:1373-1380 (1985)) seguito dal terminatore CaMV 35S in un plasmide BlueScript (Stratagene) (figura 1). pJS20293 è stato trasformato con pUBI/Ac (figura 2), un plasmide che contiene un gene bar chimerico che codifica per la resistenza alla fosfinotricina.

Trasformazione con impiego di embrioni zigotici immaturi

In due esperimenti separati, 600 embrioni immaturi di CG00526, un incrocio di tipo-Lancaster, sono stati recisi in modo asettico 12-13 giorni dopo la impollinazione dalle spighe cresciute in serra sterilizzate in superficie. Gli embrioni aventi dimensioni di 1,5 fino a 20 mm sono stati seminati in piastra con lo scutello verso l'alto sul mezzo di inizio di formazione del callo, 2DG4 + 5 mg/l cloramben. Il mezzo 2DG4 è il mezzo 'D' Duncan's (Duncan et al., *Planta* 165: 322-332 (1985)) modificato in modo da contenere 20 mg/l di glucosio.

Il DNA di pJS20293 è stato fatto precipitare su un microsupporto di oro da 1 mm come descritto dal manuale Dupont Biolistic. Si è preparata la miscela DNA/oro in modo da liberare circa 1 mg di DNA di pJS20293 per bombardamento. Per la trasformazione di embrioni immaturi, si sono usati 6,34 mg di pJS20293

+ 7,21 mg di pUBI/Ac per 50 ml di microsupporto. I due preparati sono stati portati a 85 ml con etanolo e 10 ml di ciascuno sono stati essiccati su macro-supporti.

Quattro ore prima del bombardamento, gli embrioni sono stati trasferiti per il trattamento osmotico su 12DG4 + 5 mg/l di chloramben. Trentasei embrioni su una piastra sono stati bombardati impiegando il dispositivo PDS-1000He Biolistics secondo le direttive del produttore (Dupont). Gli embrioni sono stati disposti su una piastra bersaglio intorno ad un cerchio avente il diametro di 2 cm in corrispondenza del centro della piastra con le estremità della coleorizza dello scutello tutte orientate nella medesima direzione. Le piastre bersaglio sono state quindi disposte verso l'alto secondo un angolo di 30° in modo che le estremità delle coleorizze venissero colpite per prime dallo spruzzo di particelle. Si è usato uno schermo standard da 24 x 24 mm fornito dal produttore Biolistic con dischi di rottura aventi un valore di 1550 psi per i bombardamenti. Tre ore dopo il bombardamento, gli embrioni sono stati riportati nel mezzo 2DG4 + 5 mg/l di cloramben e quindi sono stati sottoposti a coltura al buio a 25°C.

Quattordici giorni dopo il bombardamento, le risposte embriogeniche sono state trasferite in un mezzo per il mantenimento del callo 2DM4 + 0,5 mg/l di acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D). Il mezzo M4 è uguale a G4 meno i casamino acidi. Questo mezzo che conteneva 5 mg/l di Basta® è stato gradualmente aumentato a 20 mg/l.

La rigenerazione è stata fatta iniziare dopo 12 settimane dalla selezione su Basta®. Il callo tipo I è stato sottoposto a subcoltura su un mezzo modificato di Murashige e Skoog (MS) (Murashige e Skoog, *Physiologia Plantarum* 15:473-497 (1962)) contenente 3% di saccarosio, 0,25 mg/l di 2,4-D, 5 mg/l di benzilminopurina e 5 mg/l di Basta® ed è stato sottoposto a coltura con 16 ore di luce (50 mE/m²/s-1), 8 ore di buio a 25°C. Dopo due settimane il tessuto è stato trasferito in un mezzo MS contenente 3% di saccarosio e 5 mg/l di Basta®. Le piante rigenerate sono state fatte crescere sul mezzo MS modificato in modo che contenesse la concentrazione dimezzata di sali e 3% di saccarosio in contenitori GA7.

Trasformazione con l'impiego di callo embriogenico di tipo I

Per la trasformazione del mais con l'impiego del callo embriogenico tipo I, il callo è stato ottenuto da embrioni zigotici immaturi impiegando tecniche di

coltura standard. Per la liberazione del gene, si sono preparati circa 300 mg del callo di tipo I o tagliandolo con una lama a scalpello oppure sottoponendolo a subcoltura 3-5 giorni prima della cessione del gene. Prima della cessione del gene, il callo preparato è stato posto su un mezzo di coltura semisolido contenente ancora 12% di saccarosio. Dopo circa 4 ore, il tessuto è stato bombardato con pJS20293 impiegando il dispositivo PDS-1000/He Biolistic della BioRad. Due mg di pJS20293 sono stati fatti precipitare su particelle di oro da 1 mg usando essenzialmente il protocollo standard ottenuto da BioRad. Circa 16 ore dopo la liberazione del gene, il callo è stato trasferito in un mezzo di coltura standard contenente 2% di saccarosio e 1 mg/l di fosfino tricina. Il callo è stato sottoposto a subcoltura con selezione per 8 settimane, dopo di che il callo sopravvissuto e in fase di crescita è stato trasferito in un mezzo di rigenerazione standard per la produzione di piante. Le piante rigenerate sono state valutate per stabilire la resistenza nei confronti della piralide del mais europeo. Si sono ottenute piante resistenti.

Le piante transgeniche ottenute sono state usate in uno schema di allevamento di piante convenzionale

per produrre un maggior numero di piante transgeniche con proprietà insetticide simili. Le piante transgeniche sono state quindi incrociate con altre varietà della medesima pianta. Le piante transgeniche hanno prodotto inoltre semi che contenevano il gene della perossidasi chimerico stabilmente inserito nel loro genoma.

Le piante di mais transgeniche contenenti la sequenza che codifica la perossidasi sono state identificate mediante analisi Southern blot. Quando il DNA genomico ottenuto da piante transgeniche è stato sottoposto a digestione con l'enzima di restrizione *EcoRI*, una banda di circa 1,3 Kb era rivelabile usando il gene della perossidasi come sonda specifica per segnalare la presenza di un gene della perossidasi intatto.

Le piante di mais transgeniche che esprimono la sequenza che codifica la perossidasi sono state anche identificate mediante analisi northern blot. Si è osservata una banda di circa 1,2 Kb nel blot del RNA quando si è effettuata la ibridazione con una sonda specifica per la perossidasi.

Biosaggio sugli insetti

In totale, inizialmente, si sono valutate 46 piante di mais transgeniche per l'attività insetticida

contro *Ostrinia nubilalis* (ECB). Questo primo gruppo di biosaggi è stato effettuato applicando 10 larve ECB al primo stadio su una sezione di foglia che era stata posta in una piastra di Petri Gelman con un tampone di filtro inumidito per impedire che la sezione della foglia si essiccasse. Le larve sono state lasciate nutrirsi indisturbate per due giorni. Due piante ottenute dalla prova 554 era positive nel biosaggio preliminare. Questi due campioni di piante non presentavano segni dovuti ad una alimentazione dell'insetto e le larve erano morte. Le altre piante in questa prova e in altre prove presentavano insetti sani che si nutrivano.

Osservata questa attività, si sono effettuate più ripetizioni nel successivo biosaggio con ECB. Si sono effettuate quattro ripetizioni con cinque larve per ripetizione. Dopo due giorni si è effettuata una lettura della mortalità percentuale. Poiché risultava ancora che le piante presentavano una attività insetticida, si è deciso di esaminarle contro altri insetti bersaglio.

Le piante di mais transgeniche che esprimono l'enzima perossidasi sono state valutate per l'attività insetticida mediante biosaggi per insetti. Il procedimento è simile per qualsiasi pianta di mais

trasformata con un qualsiasi gene insetticida però il procedimento viene qui descritto impiegando come esempio una sequenza che codifica la perossidasi. Sezioni da uno fino a 4 cm sono state tagliate da una foglia aperta di una pianta di mais trasformata. Ciascun pezzo di foglia è stato posto su un disco di un filtro inumidito in una piastra di petri da 50 x 9 mm. Cinque larve neonate dell'insetto bersaglio (piralide del mais europeo, bruco dell'armata del sud, bruco delle spighe del mais, bruco della barbabietola e bruco nero) sono state poste su ciascun pezzo di foglia. Poichè ciascuna pianta era stata campionata molte volte, ciò porta ad un totale di 5-20 larve per pianta. Le piastre di petri sono state fatte incubare a 30°C e si sono valutati il danno alle foglie dovuto all'alimentazione degli insetti e dati relativi alla mortalità in corrispondenza di 24,48 e 82 ore. Nella tabella I vengono mostrati i dati relativi alla tossicità.

Tabella 1: Valore di mortalità di differenti insetti quando vengono esposti a foglie di mais che esprimono l'enzima perossidasi

	<u>554-1</u>	<u>554-3</u>
Ostrinia nubilalis (ECB)	100%	100%
Spodoptera frugiperda (FAW)	15%	15% *
Spodoptera exigua (BAW)	0%	5%
Heliothis zea (CEW)	100%	100%
Agrotis ipsilon (BCW)	0%	0%

* Queste foglie presentavano un forte effetto anti-nutrizione contro il bruco dell'armata del sud.

Discendenti transgenici

Le piante di mais transgeniche ottenute dalle prove numeri 554 e 755 (che avevano dimostrato di possedere proprietà insetticide contro la piralide del mais europeo in biosaggi in vitro) sono state sottoposte a prove in campo. Quando le piante nel campo hanno raggiunto circa 40 cm di altezza delle foglie aperte, si è iniziata una infestazione con larve di ECB. Circa 300 larve neonate mescolate con graniglia di pannocchia di mais sono state depositate sul verticillo di ciascuna pianta. Le infestazioni sono state fatte proseguire su una base settimanale per quattro settimane in modo da simulare una piralide del mais di prima generazione (ECB1). Iniziando due settimane dopo la infestazione

iniziale, ciascuna pianta è stata valutata una volta alla settimana e si è effettuata una valutazione media del danno provocato da ECB1 (vedere tabelle II e III). Quando le piante di mais hanno raggiunto la fase di antesi, si sono applicate 300 larve neonate/pianta ogni settimana per quattro settimane per simulare una infestazione della seconda generazione (ECB2). Circa 50 giorni dopo l'infestazione iniziale simulata con ECB2, gli steli sono stati aperti e si è valutato il danno costituito da perforazioni (vedere tabelle II e III). Le condizioni sperimentali vengono descritte più dettagliatamente da Koziel et al., *Bio/Technology* 11:194-200 (1993).

TABELLA II		
Incroci di piante Numero delle piante	Valutazione del danno alle foglie da ECB1. ¹	Lunghezza delle perforazio- ni del danno da ECB2 (cm) ²
(CG00526 x 554-3)5 self		
pianta # 10	1	58
pianta # 15	1	15
pianta # 22	1	8
(CG00526 x 554-3)6 self		
pianta # 4	1	0
pianta # 5	2	5
pianta # 9	1	7
pianta # 14	2	5
pianta # 19	1	4
pianta # 20	1	3
pianta # 25	1	0
pianta # 28	1	9
pianta # 29	1	7
pianta # 32	1	0
Numero di positivi valutati		13
Perforazioni totali		121
Media		9,3
Deviazione standard		15
(CG00526 non trasformato)		
1		Piante morte, distrutte da ECB
2		Piante morte, distrutte da ECB
3		Piante morte, distrutte da ECB
NO. di negativi valutati		3
Perforazioni totali		-
Media		-
Deviazione standard		-

¹ Le valutazioni del danno al fogliame sono state effettuate nel modo seguente:

1. Nessun danno alle foglie visibile
2. Segni di un danno fine 'a vetro di finestra' soltanto sulla foglia aperta in cui le larve più la graniglia di pannocchie di mais erano cadute nel verticillo. Nessuna penetrazione a foro di spillo della foglia.
3. Segni di un danno fine 'a vetro di finestra' su due foglie aperte in cui le larve più la graniglia di pannocchie di mais erano cadute del verticillo. Nessuna penetrazione a foro di spillo della foglia.
4. Segni di un danno dovuto ad ingestione a foro di spillo oppure a foro di sparo il quale danno penetrava nella foglia su due o più foglie che erano emerse dal verticillo (una qualsiasi lesione con lunghezza inferiore a 0,25").
5. Lesioni allungate e/o segni di ingestione nella nervatura mediana su più di tre foglie che erano emerse dal verticillo. Lesioni con lunghezza inferiore a 1,0'.
6. Parecchie foglie con lesioni allungate (lunghezza da 0,75" a 1,5") e/o non più di una foglia con la nervatura mediana rotta.

7. Lesioni lunghe (superiori a 1,0") comuni a circa metà delle foglie e/o 2 oppure 3 foglie con nervature mediane rotte.
 8. Lesioni lunghe (superiori a 1,0") comuni a circa due terzi delle foglie e/o più di 3 foglie con nervature mediane rotte.
 9. Per la massima parte foglie con lesioni lunghe. Parecchie foglie con nervature mediane rotte. Eventuale arresto della crescita di piante a causa della ingestione da parte di ECB.
- ² La misura del danno dovuto a perforazione interna da parte di ECB in una sezione da 92 cm dello stelo, 46 cm al di sopra e al di sotto del nodo primario della spiga è stata effettuata su piante transgeniche e su piante di controllo. Il danno massimo che si è potuto valutare era 92 cm. Le piante di controllo erano completamente distrutte alla fine dell'esperimento e pertanto non è stata possibile alcuna misurazione.

TABELLA III		
Incroci di piante Numero delle piante	Valutazione del danno alle foglie da ECB1 ¹	Lunghezza delle perforazio- ni del danno da ECB2 (cm) ²
(CG00714 x 755-9) segreganti positivi		
pianta # 6	3	15
pianta # 12	3	31
pianta # 16	3	19
pianta # 20	4	24
pianta # 24	3	18
pianta # 25	1	26
(CG00714 x 755-9) segreganti negativi		
pianta # 7	7	pianta morta
pianta # 8	pianta morta	pianta morta
pianta # 9	7	pianta morta
pianta # 10	7	pianta morta
pianta # 11	9	pianta morta
Numero di positivi valutati		6
Perforazioni totali		133
Media		22,17
Deviazione standard		5,91
NO. di negativi valutati		5
Perforazioni totali		-
Media		-
Deviazione standard		-

¹ Le valutazioni del danno al fogliame sono state effettuate come descritto per la tabella II:

1. Nessun danno alle foglie visibile

2. Segni di un danno fine 'a vetro di finestra' soltanto sulla foglia aperta in cui larve più la graniglia di pannocchie di mais erano cadute nel verticillo. Nessuna penetrazione a foro di spillo della foglia.
3. Segni di un danno fine 'a vetro di finestra' su due foglie aperte in cui le larve più la graniglia di pannocchie di mais erano cadute del verticillo. Nessuna penetrazione a foro di spillo della foglia.
4. Segni di un danno dovuto ad ingestione a foro di spillo oppure a foro di sparo che penetrava nella foglia su due o più foglie che erano emerse dal verticillo (eventuale lesione con lunghezza inferiore a 0,25").
5. Lesioni allungate e/o segni di ingestione nella nervatura mediana su più di tre foglie che erano emerse dal verticillo. Lesioni con lunghezza inferiore a 1,0".
6. Parecchie foglie con lesioni allungate (lunghezza da 0,75" a 1,5") e/o non più di una foglia con la nervatura mediana rotta.
7. Lesioni lunghe (superiori a 1,0") comuni a circa metà delle foglie e/o 2 oppure 3 foglie con nervature mediane rotte.

8. Lesioni lunghe (superiori a 1,0") comuni a circa due terzi delle foglie e/o più di 3 foglie con nervature mediane rotte.
9. Per la massima parte foglie con lesioni lunghe. Parecchie foglie con nervature mediane rotte. Eventuale arresto della crescita di piante a causa della ingestione da parte di ECB.

² L'entità del danno dovuto a perforazione interna da parte di ECB in una sezione da 92 cm dello stelo, 46 cm al di sopra e al di sotto del nodo primario della spiga è stata misurata su piante transgeniche e su piante di controllo. Il danno massimo che si è potuto valutare era 92 cm. Le piante di controllo erano completamente distrutte alla fine dell'esperimento e pertanto non è stata possibile alcuna misurazione.

Esempio 2: Piante di frumento transgeniche che contengono una sequenza che codifica perossidasi

Si usa pJS20293 (figura 1) e pUBIAc (figura 2) per trasformare il frumento adottando i metodi di Chang et al., WO 94/13822, Weeks et al., *Plant Physiol.* 102:1077-1084 (1993) o Nehra et al., *The Plant Journal* 5(2):285-297 (1994).

La trasformazione del frumento adottando un metodo di Chang et al., WO 94/13822 viene riportato

in breve di seguito (si possono anche adottare altri metodi riportati in Chang et al.):

Preparazione di callo di frumento, genotipo UC703

Piante di frumento con genotipo UC703 vengono fatte crescere fino alla fioritura e vengono sottoposte ad autoimpollinazione. Le spighe contenenti embrioni aventi una lunghezza di 1 fino a 2,5 mm vengono rimosse dalle piante e vengono sterilizzate con una soluzione di Clorox al 10% per 10 minuti. Gli embrioni vengono separati dai semi immaturi e vengono posti con l'asse dell'embrione verso il basso sul mezzo di Murashige e Skoog contenente 5 oppure 10 mg/l di 2,4-D, 13,7% p/v di maltosio, 100 mg/l di prolina e 100 mg/l di mioinositolo, solidificato con 0,7-0,8% v/v di fitoagar o con 0,1-0,2% di gelrite (mezzo di inizio). Dopo una coltura di tre settimane al buio a 27°C un callo preferito viene riconosciuto in base alla presenza di embrioni somatici globulari ben formati (callo tipo M) che si sviluppa sullo scutello di certi espianti. Questi calli vengono rimossi e vengono posti o in un mezzo MS contenente 1,0 fino a 5,0 mg/l di 2,4-D e 2-3% di saccarosio oppure in un mezzo contenente una quantità ridotta (5%) di maltosio prima di venire posti sul mezzo di saccarosio. Il materiale viene quindi sottoposto

a subcoltura ogni settimana su un mezzo MS fresco contenente 3% di saccarosio.

Preparazione delle cellule per il bombardamento

Le cellule per il bombardamento vengono sottoposte ad un trattamento di plasmolisi prima e dopo il bombardamento. Il volume di cellule sedimentate viene misurato e le cellule vengono diluite in un mezzo liquido 1 MS con aggiunta di sostanza osmotica: sorbitolo 0,4 M per le cellule in sospensione e sorbitolo 0,6 M per le cellule del callo. Le cellule vengono diluite in modo che il volume finale delle cellule sedimentate per bersaglio sia 1/30 ml per una sospensione fine e 1/10 ml per il callo. Le cellule diluite vengono poste in un pallone da 250 ml contenente una barra di agitazione e vengono sottoposte ad agitazione per un tempo minimo di 30 minuti fino a poche ore. Per seminare le cellule, dal pallone si prelevano 2 ml e si pipettano nella parte superiore di un pallone da vuoto sul quale è posto un filtro GFA da 2,5 cm Whatman. Si applica il vuoto fino a che le cellule sono essiccate sul filtro. I filtri vengono posti su piastre di petri di 60 x 15 mm contenenti 5 ml di mezzo di plasmolisi solido da usare dopo il bombardamento che è un mezzo 1 MS contenente sorbitolo 0,2 M per le cellule in

sospensione oppure sorbitolo 0,4 M per le cellule del callo. Su ciascuna piastra si pongono due filtri.

Vettori usati per il bombardamento

I seguenti vettori nei quali è inserita una cassetta di espressione contenente perossidasi, possono venire usati per il bombardamento di particelle (oltre alla co-trasformazione di pJS20293 (figura 1) e pUBIAC (figura 2) impiegando quantità uguali di DNA):

il pSOG30 è un vettore di espressione della β -glucoronidasi (Gus) derivato dal plasmide pBI121, acquistato dalla Clontech Laboratories, Palo Alto, California. L'introne 6 del gene Adh 1 del mais viene amplificato mediante PCR dal plasmide pB428, descritto in Bennetzen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4125-4128 (1987) e viene sottoposto a legatura nel sito BamHI di pBI121 che è situato tra il promotore CaMV 35S e il gene Gus. Un leader del virus della muffa clorotica del mais da 17 bp (MCMV) descritto in Lommel et al., *Virology* 181:382-385 (1991) viene inserito nel leader non tradotto del gene Gus-35S. La fusione finale del gene contiene la struttura: promotore 35S-introne 6 di Adh1-leader MCMV-terminatore Gus-Nos, tutti nello scheletro del vettore pUC19.

pSOG35 è un vettore di espressione della diidrofolato reduttasi (dhfr). Questo costrutto è derivato mediante fusione del promotore 35S, dell'introne 6 di Adh 1 e del leader MCMV descritti sopra con il gene dhfr ottenuto dal plasmide pHCO, descritto in Bourouis e Jarry, *EMBO, J.* 2:1099-1104 (1983). La fusione finale del gene contiene la struttura: promotore 35S-introne 6 di Adh 1-leader MCMV-terminatore dhfr-Nos, tutti nello scheletro del vettore pUC19.

Il pTG48 contiene il gene Gus sotto il controllo del promotore ant43D specifico di antere e un gene dhfr in uno scheletro di pUC19. Questo è il risultato ottenuto dalla combinazione di 4 differenti frammenti del DNA. Il frammento 1 viene ottenuto da pSOG35 dopo taglio di restrizione con HindIII e con EcoRI. L'estremità EcoRI del frammento isolato contenente il gene dhfr è adattato ad una estremità di restrizione SaII. Il frammento 2 è costituito dal promotore ant43D specifico di antere isolato da un plasmide pCIB 3178 dopo taglio di restrizione con HindIII e XbaI. Il plasmide pCIB 3178 viene descritto dettagliatamente in EP-578 611, le cui parti relative vengono incorporate qui come riferimento e che è stato depositato con il numero di accesso NRRL B-

18978. Il frammento 3 viene ottenuto dal plasmide pSOG30 dopo taglio di restrizione con XbaI e EcoRI e conteneva il gene Gus, ed il frammento 4 corrispondeva al vettore disponibile in commercio pUC19 tagliato con SalI e EcoRI.

Preparazione delle particelle

Particelle di oro (1,0 micron; da Bio-Rad) vengono lavate a porzioni in una provetta da microcentrifuga, aggiungendo circa 1 ml di etanolo al 100%, sottoponendo ad agitazione vorticosa, centrifugando, separando il surnatante e ripetendo due volte con acqua sterile. Dopo il lavaggio finale, si allontana la quantità maggiore di acqua possibile e si aggiunge una soluzione di polilisina (0,02% di polilisina + acetato di ammonio 15 mM) in modo da immergere completamente le particelle. Le particelle vengono sottoposte ad agitazione vorticosa, e il surnatante viene allontanato. Le particelle vengono lasciate essiccare durante la notte in una cappa a flusso laminare oppure per 30 minuti sotto un blando flusso di azoto.

Per una preparazione di particelle 'completa' 10 mg di particelle vengono pesati e vengono posti in una provetta da microcentrifuga sterile contenente una barra di agitazione. Si aggiungono 100 ml (1

mg/ml) di ciascun DNA (come alternativa, 50 ml (1 mg/ml) di ciascun DNA) e quindi si sottopone ad agitazione vorticosa. Si aggiungono quindi 10 ml di Na_2HPO_4 100 mM e quindi si sottopone ad agitazione vorticosa. Si aggiungono 10 ml di CaCl_2 100 nM e quindi si effettua una agitazione vorticosa. Alla fine, si aggiungono 380 ml di etanolo al 100% e quindi si sottopone ad agitazione vorticosa. Mentre la sospensione viene sottoposta ad energica agitazione, si pipettano 3 ml su alette 'fliers' di plastica (proiettili). Le particelle vengono lasciate essiccare sulle alette per almeno 15 minuti prima del bombardamento.

Bombardamento di colture di cellule

La piastra di petri contenente i filtri di cellule viene capovolta sulla piattaforma sulla parte superiore del piatto, e viene centrata sulla apertura di passaggio delle particelle. Il coperchio trasparente viene posto sulla parte superiore della piattaforma. Un microproiettile viene posto sul perno della 'culatta' 'breech' e la culatta viene chiusa. Il pulsante 'dell'arma' viene spinto in modo da riempire il serbatoio con una opportuna quantità di elio gassoso (di solido 1800-1900 psi). Il vuoto sulla camera viene spinto fino a circa 27 mm. Dopo

che il vuoto è stato disinnestato, i pulsanti 'dell'arma' e 'del fuoco' vengono spinti. Il pulsante 'dell'arma' viene quindi spinto nella posizione 'off'. Ciascun filtro di solito viene sottoposto a bombardamento due volte.

Coltura e selezione dopo il bombardamento

Dopo il bombardamento le cellule vengono tenute al buio durante la notte. Il giorno successivo, i filtri vengono tolti dal mezzo della plasmolisi e vengono posti su un mezzo 1 MS. La selezione viene effettuata 1-10 giorni dopo il bombardamento per le cellule in sospensione e dopo 14 giorni per le cellule del callo. Le cellule vengono raschiate via dai filtri e vengono seminate sulla superficie di piastre contenenti 1 MS più 2 mg/litro di metotrexato (oppure un opportuno agente di selezione). Le piastre vengono fatte incubare al buio per parecchie settimane. Le colonie resistenti che si sviluppano dopo alcune settimane vengono trasferite in un mezzo 1 MS + 4 mg/l di metotrexato (oppure un opportuno agente di selezione). Le colonie che continuano a proliferare per circa 3-4 settimane vengono quindi trasferite in un mezzo di mantenimento '0,5 MS', che è una soluzione acquosa di sali di MS, vitamine, ferro, saccarosio al 3%, agar allo 0,7%, 0,5 mg/litro

di 2,4-D. Il tessuto viene sottoposto a subcoltura su questo mezzo ogni due settimane fino a che sono comparse strutture embriogeniche oppure tessuti che sembrano adatti per la rigenerazione.

Rigenerazione

Il tessuto viene trasferito in un mezzo MS contenente 3 mg/litro di BAP oppure 1 mg/litro di NAA + 5 mg/litro di GA e le piastre vengono fatte muovere alla luce. Dopo 2-4 settimane, il tessuto viene trasferito nel mezzo MS senza ormoni. I germogli che compaiono vengono posti in contenitori con il mezzo MS senza ormoni oppure con il mezzo MS contenente 0,5 mg/litro di NAA. Quando è avvenuta una crescita sufficiente di radici e germogli, le pianticelle vengono trasferite nel terreno e vengono poste in un fitotrone.

Weeks et al., Plant Physiol. 102:1077-1084 (1993)

La trasformazione di frumento adottando il metodo di Weeks et al., *Plant Physiol.* 102:1077-1084 (1993) viene riportata brevemente di seguito: piante di frumento (*Triticum aestivum* L.) vengono fatte crescere e gli embrioni immaturi aventi una lunghezza di 0,5-1 mm vengono recisi dalle piante cresciute nella serra (10-18 giorni dopo antesi, a seconda del momento dell'anno) e vengono posti, con il lato dello

scutello esposto su un mezzo di mantenimento del callo contenente 1,5 mg/l di 2,4-D. Cinque giorni dopo l'inizio nella coltura dei tessuti, è visibile il tessuto del callo in fase di proliferazione in corrispondenza dei bordi degli embrioni. In corrispondenza di questo stadio, gli embrioni vengono bombardati con le particelle di oro rivestite con 7 mg di pJS20293 e con 7 mg di pUBIAC.

Bombardamento con particelle

Prima del bombardamento, le particelle di oro da 1 µm vengono rivestite con DNA di pJS20293 e pUBIAC mediante il procedimento di Daines, *Biolistic Systems Newsletter* 1:1-4 (1990). Una sospensione di partenza di particelle di oro (Bio-Rad) viene posta in sospensione nella concentrazione di 60 mg/ml in etanolo assoluto. Trentacinque microlitri della sospensione vengono distribuiti in provette da microcentrifuga da 1,5 ml, vengono lavati in acqua distillata sterile e vengono di nuovo posti in sospensione in 25 ml di Tris-EDTA contenente 25 mg di DNA del plasmide superavvolto. Si aggiungono le seguenti soluzioni nell'ordine: 220 µl di acqua sterile, 250 µl di CaCl_2 2,5 M e 50 µl di spermidina 0,2 M (base libera). le provette da microcentrifuga vengono sottoposte a sbattimento con un miscelatore a miscelazione

vorticosa a 4°C per 10 minuti e vengono centrifugate a 16.000 g per 5 minuti. Il surnatante viene rimosso e il sedimento viene lavato con 600 ml di etanolo. I granuli di oro rivestiti con il DNA vengono posti di nuovo in sospensione in 36 ml di etanolo. Per il bombardamento, 10 ml della sospensione oro-DNA vengono posti nel centro di un macroproiettile (foglio di supporto aka).

Circa 25 embrioni vengono posti al centro di una piastra di petri da 15 x 100 mm contenente un mezzo di mantenimento del callo solidificato con 0,35% di Phytigel. Dopo 5 giorni in coltura, i calli derivati dagli embrioni vengono bombardati sotto vuoto con le particelle di oro rivestite con pJS20293 impiegando il sistema di cessione DuPont Biolistic fatto funzionare con elio ed i componenti disponibili forniti dalla Bio-Rad. La distanza dalla piastra di arresto fino al bersaglio è di 13 cm, e la resistenza del disco di rottura è di 1100 p.s.i. Immediatamente dopo il bombardamento, i calli vengono trasferiti in mezzi di selezione MS contenenti la opportuna quantità di agente selettivo come può venire stabilito da chi è esperto nel settore.

Rigenerazione di piante di frumento

per la rigenerazione, i calli embriogenici

vengono trasferiti in un mezzo MS contenente 0,5 mg/l di dicamba come descritto da Hunsinger e Schauz, *Plant Breeding* 98:119-123 (1987). I germogli derivati dai calli vengono trasferiti in provette da coltura Pyrex contenenti mezzi per la formazione di radici costituiti da MS a concentrazione dimezzata senza ormoni. Per la selezione dopo il bombardamento, il mezzo di agar in corrispondenza di ciascuno stadio viene integrato con la opportuna quantità di agente di selezione come può venire determinato da chi è esperto nel settore.

Le pianticelle vengono trasferite dal mezzo di formazione delle radici in vasi contenenti una miscela di terreno e vengono acclimatati con una bassa umidità a 21°C in una camera di condizionamento. Dopo 2 settimane, le piante vengono trasferite nella serra. Questi rigeneranti transgenici primari vengono denominati piante T₀.

Analisi di piante transgeniche

I tessuti transgenici e le piante transgeniche vengono analizzati adottando le tecniche Southern e Northern per dimostrare la presenza rispettivamente della sequenza che codifica perossidasi e del RNA.

Le piante di frumento che hanno dimostrato di contenere la sequenza che codifica la perossidasi

mediante analisi Southern vengono valutate per l'attività insetticida contro *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis arthogonia*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, afide del frumento russo; *Schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Melanoplus sanguinipes*, *Mayetiola destructor*, Hessian fly; *Sitodiplosis mosellana*, *Meromyza americana*, *Hylemya coarctata*, *Frankliniella fusca*, *Cephus cinctus* oppure *Aceria tulipae* adottando tecniche ben note nel settore. Quelle piante di frumento transgeniche dotate di proprietà insetticide vengono sottoposte a prove in campo.

Esempio 3: Piante di sorgo transgeniche che contengono una sequenza che codifica la perossidasi

Si usano pJs20293 (figura 1) e pUBIAc (figura 2) per trasformare il sorgo adottando il metodo di Cacas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216 (dicembre 1993) come viene descritto in breve di seguito.

Bombardamento con microproiettili

Si effettuano gli esperimenti con il sistema Biolistics PDS 1000/He (Sanford et al., *Technique J. Methods Cell Mol. Biol.* 3:3-16 (1991) impiegando

microproiettili di tungsteno (M-25, diametro 1,7 mm DuPont NO.75056) oppure oro (diametro 1,5-3,0 mm, Aldrich NO. 32,658-5). Le particelle di oro (3 mg) oppure di tungsteno (0,75 mg) precedentemente lavate in etanolo in sospensione acquosa (50 ml) vengono rivestite con 5-10 mg del DNA del plasmide come descritto dal produttore (Bio-Rad). Le pressioni e le distanze di bombardamento dalla piastra di lancio vengono determinate sperimentalmente.

Embrioni zigotici immaturi, 10-15 per piastra di petri di plastica (15 x 60 mm) vengono bombardati tra 24 e 72 ore dopo coltura sul mezzo. Gli embrioni vengono trasferiti su carte da filtro (diametro 4,5 cm) che sono state precedentemente inumidite ma non saturate con un mezzo liquido. Le carte da filtro hanno la funzione di assorbire l'acqua dalla superficie degli embrioni e gli embrioni vengono lasciati per 2-3 ore sulle carte da filtro prima del bombardamento. Immediatamente dopo il bombardamento, gli embrioni immaturi vengono tolti dalle carte e vengono trasferiti in un mezzo semisolido.

Rigenerazione di piante transgeniche e valutazione per la resistenza nei confronti degli insetti

I procedimenti per la selezione e per il mantenimento di tessuti embriogenici e per la

formazione di germogli e radici da strutture organizzate vengono realizzati come descritto (Cai & Butler, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 20:101-110 (1990). Si usa l'opportuno agente selettivo come è noto a chi è esperto nel settore.

I tessuti transgenici e le piante transgeniche vengono analizzati adottando le tecniche Southern e Northern per dimostrare la presenza rispettivamente della sequenza che codifica la perossidasi e RNA.

L'attività PAT viene valutata in estratti di callo e di foglie secondo DeBlock et al., *EMBO J.* 6: 2513-2518 (1987).

Le piante di sorgo che hanno dimostrato di contenere la sequenza che codifica la perossidasi mediante analisi Southern vengono valutate per l'attività infestida con *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Elasmopalpus linosellus*, *Feltia subterranean*, *Phyllophaga crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus spp.*, *Oulema melanopus*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Anuraphis maidiradicis*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Contarinia sorghicola*, *Tetranychus cinnabarinus* e *Tetranychus urticae* adottando tecniche ben note nel settore. Quelle piante di

sorgo transgeniche che presentano proprietà insetticide vengono sottoposte a prove in campo.

Esempio 4: Piante di riso transgeniche che contengono una sequenza che codifica la perossidasi

Si usano pJS20293 (figura 1) e pUBIAc (figura 2) per trasformare riso adottando i metodi di Shimamoto et al., *Natura* 338:274-277 (1989) (riso); Christou et al., *Biotechnology* 9:957-962 (1991) (riso); Datta et al., *Bio/Technology* 8:736-740 (1990) (riso) e/o Hayashimoto et al., *Plant Physiol.* 93:857-863 (1990) (riso).

La trasformazione del riso adottando il metodo di Christou et al., *Biotechnology* 9:957-962 (1991) viene riportata di seguito in breve.

Preparazione del DNA

Particelle di oro rivestite con DNA vengono preparate mescolando particelle di oro (10 mg) con una soluzione del DNA (20 mg) in 100 ml di tampone (cloruro di sodio 150 mM), tris-HCl 10 mM, pH 8,0) e vengono sottoposte a blanda agitazione a vortice per 5-10 secondi. Si aggiungono sotto agitazione spermidina (100 ml di una soluzione 0,1 M) e si aggiungono 100 ml di una soluzione di PEG al 25% (PM 1300-1600) e quindi si aggiungono goccia a goccia 100 ml di cloruro di calcio (2,5 M). La miscela viene lasciata

a sè a temperatura ambiente per 10 minuti e quindi viene centrifugata in una microcentrifuga. Il surnatante viene allontanato e l'oro precipitato con il complesso del DNA viene di nuovo posto in sospensione in 10 ml di etanolo al 100%. La sospensione ottenuta viene quindi applicata su un foglio di supporto da 18 x 18 mm in una quantità di 163 ml per foglio di supporto oppure in una quantità calcolata di 0,05 mg/cm².

Isolamento di embrioni immaturi e preparazione per il bombardamento con particelle

Embrioni immaturi di riso aventi da dodici a quindici giorni vengono raccolti da pannocchie espanse e vengono sterilizzati con ipoclorito di sodio al 2% per 5 minuti. Successivamente, questi vengono lavati ripetutamente con acqua distillata sterile e i glumi vengono rimossi sotto microscopio di dissezione. Gli embrioni vengono quindi rimossi in modo asettico e vengono seminati su piastre di agar-acqua con il lato adassiale a contatto con il mezzo.

Bombardamento con particelle

Il foglio di supporto che porta le perline viene caricato sull'acceleratore delle particelle nel quale si impiega la scarica di un condensatore a voltaggio elevato attraverso ad una piccola goccia di acqua

come forza motrice. Un setaccio di ritenzione da 100 mesh viene posto tra il foglio e il tessuto bersaglio sospeso al di sopra della macchina. Il complesso viene quindi posto sotto vuoto fino a 500 mm Hg per ridurre la resistenza aereodinamica. Da dieci fino a sedici Kv provenienti da un condensatore da 2 mF vengono scaricati attraverso ad una goccia di acqua da 10 ml all'interno della camera di espansione. Il foglio così viene rigonfiato contro il setaccio di ritenzione consentendo che le particelle di oro continuino in avanti fino a urtare il tessuto bersaglio sospeso al di sopra del setaccio. Gli embrioni maturi in questione vengono posizionati su una piastra di agar-acqua in modo che quando la piastra viene inserita al di sopra del setaccio, la regione scutellare degli embrioni si trovi nel percorso diretto delle particelle accelerate.

Rigenerazione delle piante

Dopo il bombardamento delle particelle, gli embrioni vengono seminati in piastra su mezzi MS oppure CC integrati con 2,4D alla concentrazione di 0,5 oppure 2 mg/l e il callo embriogenico e le pianticelle embriogeniche vengono recuperate come descritto (Hartke, S. e Lara, H., *Genet. & Breed.* 43: 205-214 (1989); Datta, S.K. et al., *Plant Sci.* 67:85-

88 (1990)).

Isolamento di calli e di piante embriogenici trasformati

I calli e le piante trasformati vengono isolati in condizioni selettive e non selettive. In esperimenti in cui la selezione viene effettuata secondo il protocollo trasformazione/rigenerazione, si usa la quantità appropriata di un agente selettivo come è noto a coloro che sono esperti nel settore. I trasformanti presunti così identificati vengono sottoposti ad una analisi molecolare e genetica per confermare una integrazione e una ereditarietà stabili del gene introdotto.

Analisi di piante transgeniche

Tessuti e piante transgeniche vengono analizzati mediante le tecniche Southern e Northern per dimostrare la presenza rispettivamente della sequenza che codifica perossidasi e del RNA.

L'attività PAT viene valutata in estratti di callo e di foglie secondo DeBlock et al., *EMBO J.* 6: 2513-2518 (1987).

Le piante di riso che hanno dimostrato di contenere la sequenza che codifica la perossidasi mediante analisi Southern vengono valutate per l'attività insetticida contro *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Colaspis*

brunnea, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Sitophilus oryzae*, *Nephotettix nigropictus*, *Blissus leucopterus leucopterus* oppure *Acrosternum hilare* adottando metodi ben noti nel settore.

Esempio 5: Piante di avena transgeniche che contengono una sequenza che codifica la perossidasi

Si usano pJS20293 (figura 1) e pUBIAC (figura 2) per trasformare varietà di avena impiegando i metodi di Somers et al., *Bio/Technology* 10:1589-1594 (dicembre 1992) (avena) e/o Torbert et al., *Plant Cell Reports* 14:635-640 (1995) (avena).

La trasformazione delle piante di avena adottando il metodo di Somers et al., *Bio/Technology* 10:1589-1594 (dicembre 1992) viene riportata di seguito nel modo seguente:

Colture di cellule

Embrioni immaturi di linee di avena derivate da GAF-30/Park vengono usati per fare iniziare il callo (Rines, H.W. & Luke, H.H., *Theor. Appl. Genet.* 71:16-21 (1985)). Le linee di callo embriogenico, friabile vengono selezionate visivamente (Bregitzer, P., et al., *Crop Sci* 29:798-803 (1989)) e vengono sottoposte a subcoltura ogni 2 settimane su un mezzo MS2D solidificato con 0,2% di Gelrite contenente sali MS (Murashige, T. & Skoog, F., *Physiol. Plant* 15:473-497

(1962)) con 150 mg/l di asparagina, 0,5 mg/l di tiamina-HCl, 20 g/l di saccarosio e 2,0 mg/l di 2,4-D, pH 5,8. Le colture in sospensione vengono fatte iniziare ponendo circa 1 g di callo embriogenico friabile in 35 ml di mezzo liquido MS2D. Le colture in sospensione vengono selezionate per la presenza di piccoli aggregati di cellule con citoplasma denso di colore giallo e sottoposte a subcoltura ogni settimana.

Preparazione di particelle rivestite con DNA

Particelle di tungsteno vengono rivestite con DNA di pJS20293 (figura 1) e pUBIAC (figura 2) adottando procedimenti simili a quello descritto da Gordon-Kamm, et al., *Plant Cell* 2:603-618 (1990)). Particelle di tungsteno precedentemente lavate (1,25 mg) vengono poste in sospensione in 250 ml di acqua sterile in una provetta di Eppendorf da 1,5 ml. Una porzione da 25 ml di 1 mg/ml di ciascun DNA (250 ml di CaCl_2 2,5 M e 50 ml di sperimidina 0,1 M (base libera) viene aggiunta alla provetta di Eppendorf in questo ordine. La miscela viene sottoposta ad agitazione vorticoso impiegando Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc.) alla velocità massima per 1 minuto, viene posta su ghiaccio per 5-10 minuti e viene centrifugata a 14000 giri/minuto per 1 minuto in una centrifuga di Eppendorf 5415. Dopo la centri-

fugazione, 550 ml del surnatante vengono pipettati e vengono scartati. Le particelle di tungsteno rivestite con DNA vengono poste in sospensione di nuovo pipettandole verso l'alto e verso il basso per parecchie volte e 1 ml della sospensione particelle-DNA viene caricato sul macrosupporto del sistema di cessione delle particelle.

Cessione di DNA

Cellule in coltura in sospensione vengono lavate 3 X con il mezzo MS2D privo di asparagina prima del bombardamento. Da 3 a 5 giorni dopo la subcoltura, le cellule in coltura in sospensione vengono raccolte mediante filtrazione sotto vuoto su un tampone di supporto Millipore AP 10, MF (Millipore Corp.) avente un diametro di 4,7 cm in modo da formare uno strato sottile uniformemente distribuito di circa 0,5 g di cellule in colture di tessuti in peso fresco. I tamponi che supportano le cellule vengono quindi trasferiti in piastre di petri da 60 x 20 mm. Per il bombardamento del callo, il callo embriogenico friabile di due settimane (0,5 g) viene distribuito uniformemente su tamponi di supporto Millipore precedentemente inumiditi con 2 ml del mezzo MS2D privo di asparagina in piastre di petri da 60 x 20 mm. Le piastre di petri contenenti campioni in sospensione

oppure campioni di callo vengono disposti (Gordon-Kamm, et al., *Plant Cell* 2:603-618 (1990)) ad una distanza di 5 cm dalla piastra di arresto e vengono bombardati con il dispositivo Biolistic PDS-1000 (gun powder) Particle Delivery System (DuPont Co.).

Selezione di trasformanti

Dopo il bombardamento, le cellule vengono lavate da ciascun tampone di supporto Millipore con 5 ml di mezzo liquido MS2D privo di asparagina in una piastra di petri da 60 x 20 mm, che viene quindi sigillata con una pellicola di paraffina e viene fatta incubare a 21-23°C al buio. Dopo 5 giorni di incubazione nel mezzo liquido, le cellule bombardate vengono seminate in uno strato sottile su dischi di carta da filtro Whatman NO. 1 aventi un diametro di 7,0 cm che si trovano al sopra del mezzo di selezione MS2D solidificato con Gelrite privo di asparagina e contenente 3 mg/l di fosfinotricina (PPT) (Crescent Chemical Co. Inc.). Le cellule provenienti da un bombardamento vengono distribuiti tipicamente su due o più carte da filtro a seconda della densità delle cellule. Le carte da filtro con le cellule poste al di sopra vengono trasferite in un mezzo di selezione fresco ad intervalli di 2-3 settimane. Le colonie resistenti a PPT cominciano a comparire 7-8 settimane dopo il

bombardamento e vengono sottoposte a subcoltura direttamente su un mezzo di selezione fresco senza carta da filtro ogni 2-3 settimane.

Rigenerazione delle piante

Le colture dei tessuti resistenti a PPT vengono poste su un mezzo di rigenerazione delle piante di avena N + B (Bregitzer, P., et al., *Crop Sci* 29:798-803 (1989)) (MS sali (Murashige, T. & Skoog, F., *Physiol. Plant* 15:473-497 (1962)), 2 mg/l di acido naftalenacetico, 0,2 ml/g di benzilamminopurina) contenente 3 mg/l di PPT. Dopo 2-6 settimane, i germogli vengono rimossi dal callo e vengono trasferiti nel mezzo MS senza ormoni però contenente 3 mg/l di PPT per la formazione delle radici. Le piante dotate di radici vengono trasferite in una miscela di terreno per vasi e vengono fatte crescere fino a maturità in camere di crescita.

Analisi di piante transgeniche

Tessuti transgenici e piante transgeniche vengono analizzati mediante le tecniche Southern e Northern per dimostrare la presenza rispettivamente della sequenza che codifica la perossidasi e del RNA.

L'attività PAT viene valutata in estratti di callo e di foglie secondo DeBlock et al., *EMBO J.* 6:2513-2518 (1987).

Le piante di avena che hanno dimostrato di contenere la sequenza che codifica la perossidasi mediante analisi Southern vengono valutate per l'attività insetticida adottando metodi ben noti nel settore.

Esempio 6: Piante di orzo transgeniche che contengono una sequenza che codifica la perossidasi

Si usano pJS20293 (figura 1) e pUBIAc (figura 2) per trasformare orzo adottando i metodi di Wan et al., *Plant Physiol.* 104:37-48 (1994) e/o Jahne et al., *Theor. Appl. Genet.* 89:525-533 (1994).

La trasformazione dell'orzo adottando il metodo di Wan et al., *Plant Physiol.* 104:37-48 (1994) viene riportata di seguito in breve.

Materiali vegetali

Le piante di orzo (*Hordeum vulgare* L.) varietà primaverile Golden Promise vengono fatte crescere in camere di crescita con un ciclo di 16 ore di luce/8 ore di buio a 12°C e con un'umidità di 60-80% (Hunter, C.P., *Plant Regeneration from Microspores of Barley, Hordeum vulgare*, PhD Thesis, Wye College, University of London, Ashford, Kent (1988)). I livelli di luce in corrispondenza della altezza massima sono circa 350-400 mE. I semi di una varietà invernale, Igri, vengono fatti germogliare nel

terreno nella camera di crescita nelle medesime condizioni. Quando l'altezza è di circa 10 cm, le pianticelle vengono vernalizzate per 8 settimane con un ciclo di 10 ore di luce (10-15 mE)/14 ore di buio a 4°C (Hunter, C.P., *Plant Regeneration from Microspore of Barley, Hordeum vulgare*, PhD Thesis, Wye College, University of London, Ashford, Kent (1988). Dopo la vernalizzazione, le piante vengono fatte crescere nel medesimo regime delle piante Golden Promise. Tutte le piante vengono trattate con fertilizzanti, usando Osmocote (Sierra, 17-6-12 più minori) al momento della piantagione quindi ogni due settimane con 0,02% di Verdi (Peter's 20-20-20).

Embrioni e callo immaturi derivati da embrioni immaturi

Spighe di cv Golden Promise con embrioni immaturi aventi dimensioni di circa 1,5-2,5 mm vengono sterilizzati in superficie in un liquido di sbianca al 20% (v/v) (ipoclorito di sodio al 5,25%) per 5 minuti, vengono risciacquati per breve tempo tre volte e vengono lavati per 5 minuti con acqua sterile. Gli embrioni maturi vengono sezionati dalle cariossidi giovani e vengono lasciati intatti oppure vengono sezionati nella direzione longitudinale. Per la induzione del callo per il bombardamento, gli embrioni (intatti oppure sezionati) vengono posti con

il lato dello scutello verso il basso su un mezzo di induzione del callo che è un mezzo di Murashige e Skoog (Murashigem, T. & Skoog, F., *Physiol Plant* 15: 473-497 (1962)) integrato con 30 g/l di maltosio, 1,0 mg/l di tiamina-HCl, 0,25 g/l di myo-inositolo, 1,0 g/l di idrolizzato di caseina, 0,69 g/l di Pro, e 2,5 mg/l di dicamba, solidificato con 3,5 g/l di gelrite (Scott, Carson, CA) o di Phytigel (Sigma). Gli embrioni vengono fatti incubare a 25°C al buio ed il callo embriogenico viene selezionato per il bombardamento dopo 2 settimane.

Culture di antere ed embrioni derivati da microspore (MDE)

Spighe, avvolte da foglie avvizzite, vengono raccolte dalle piante cv Igri quando le microspore si trovano negli stadi da medio-uninucleato fino a precoce binucleato e vengono sterilizzate in superficie per breve tempo con etanolo al 70%. Le antere vengono sezionate dalle spighe e 60 antere vengono poste in ciascuna piastra di petri (35 x 10 mm) con 3 ml di mannitolo 0,3 M. Le piastre di petri vengono sigillate con una pellicola di paraffina e vengono fatte incubare a 25°C al buio per 3 oppure 4 giorni. Le antere vengono successivamente trasferite in piastre di petri con 3 ml di mezzo FHG liquido di Hunter (un mezzo di Murashige e Skoog modificato

avente un contenuto inferiore in NH_4NO_3 e un contenuto elevato in Gln; Kasha, K., et al., "Haploids in Cereal Improvement: Anther and Microspore Culture", J.P. Gustafson, ed., *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, Plenum Press, NY (1990), pg. 213-235), senza Ficoll-400 e integrato con 1 mg/l di IAA e 0,2 mg/l di cinetina (denominato FHG⁺) e sono state fatte incubare come descritto. Gli MDE erano visibili dopo circa 2 oppure 3 settimane e sono stati usati per il bombardamento dopo circa 4 settimane.

Preparazione di piastre di bombardamento e bombardamento con microproiettili

Un giorno prima del bombardamento, IE (1,5-2,5 mm) ottenuti da cariossidi giovani di cv Golden Promise vengono tagliati a metà in direzione longitudinale e vengono posti in tre differenti orientamenti (lato dello scutello verso l'alto, lato dello scutello verso il basso oppure superficie di taglio verso l'alto) su un mezzo per l'induzione del callo nel centro di piastre di petri (100 x 15 mm). Per il bombardamento del callo 0,5 g di callo embriogenico ottenuti da IE sottoposti a coltura vengono tagliati in piccoli pezzi (circa 2 mm) e vengono posti al centro di una piastra di petri (100

x 15 mm) contenente il mezzo per l'induzione del callo. Gli embrioni derivati da microspore (MDE) vengono raccolti da piastre di coltura di antere impiegando una pipetta Pasteur e vengono distribuiti uniformemente in piastre di petri (100 x 15 mm) su un pezzo di carta da filtro Whatman NO. 3 da 5 cm supportata con due filtri da 7 cm. Prima del bombardamento, il mezzo in eccesso viene allontanato dai filtri.

Il DNA del plasmide viene fatto adsorbire su particelle di oro (1,0 µm, Dupont, Wilmington, DE) come descritto in precedenza (Daines, R.J. *Biolistic Particle Delivery Systems Newsletter* 1:1, 4 (1990)). Quando si usano due plasmidi, si mescolano quantità uguali (µg) di DNA proveniente dai due plasmidi. Tutti i materiali bersaglio vengono bombardati una volta, impiegando il sistema di cessione DuPont PDS 1000 He Biolistic. I materiali bersaglio vengono situati circa 13 cm al di sotto della piastra di arresto dei microproiettili; si usano dischi di rottura da 1100 p.s.i.

Selezione di trasformanti

IE e callo

Un giorno dopo il bombardamento, gli embrioni a metà e i pezzi di callo vengono trasferiti singolar-

mente in un mezzo di induzione del callo con 5 mg/l di bialaphos; gli embrioni dimezzati vengono sottoposti a coltura con il lato dello scutello rivolta verso il basso, indipendentemente dal loro orientamento durante il bombardamento. Il tessuto rimane nella prima piastra di selezione per circa 10-14 giorni. Al momento del trasferimento nella seconda piastra di selezione (5 mg/l di bialaphos), i singoli embrioni che stanno formando il callo oppure pezzi di callo vengono rotti impiegando il forcipe in parecchi pezzi piccoli e vengono mantenuti separatamente. Durante i successivi due fino a tre passaggi di selezione (ciascuno circa da 10 a 20 giorni, con 5 mg/l di bialaphos), i pezzi di callo che presentano segni di una crescita più vigorosa vengono trasferiti precocemente in nuove piastre di selezione e il tessuto viene manipolato in modo identico. Tutto il tessuto del callo che si sviluppa originariamente da ciascun pezzo di embrione oppure del callo viene definito come una linea. Le linee di callo resistenti a bialaphos vengono mantenute mediante subcoltura mensile su un mezzo per l'induzione del callo con 5 mg/l di bialaphos.

MDE

Dopo il bombardamento, diverse gocce di mezzo

FHG⁺ vengono aggiunte ai MDE. Dopo 2 o 3 giorni, gli embrioni aventi dimensioni superiori a 1,5 mm vengono trasferiti singolarmente in un mezzo per l'induzione del callo con 3 oppure con 5 mg/l di bialaphos. Gli embrioni più piccoli rimangono sul filtro e vengono trasferiti in un mezzo di selezione quando essi hanno dimensioni di circa 1,5 mm. Le carte da filtro vengono lavate ogni 2 oppure 3 giorni mediante aggiunta e allontanamento ripetuto del mezzo liquido FHG⁺. I MDE rimangono sul primo mezzo di selezione per 10-20 giorni. I MDE che mostrano segni di formazione del callo vengono trasferiti in un mezzo di selezione fresco con 5 mg/l di bialaphos. Durante il trasferimento, ciascun MDE che sta formando il callo viene rotto in pochi piccoli pezzi. L'ulteriore selezione viene effettuata come descritto nel capoverso precedente.

Rigenerazione delle piante e applicazione dell'erbicida

Le piante vengono rigenerate da linee di callo PAT-positive trasferendo il callo embriogenico in un mezzo FHG con 1 mg/l di bialaphos a 23° oppure 25°C sotto luce fluorescente (45-55 mE, 16 ore/giorno). In circa 2 settimane si osservano pianticelle. Le pianticelle verdi, di circa 2 cm vengono trasferite in cassette Magenta contenenti un mezzo di crescita

della pianticella (mezzo di induzione del callo senza ormoni) con 1 mg/l di bialaphos. Prima che le pianticelle crescano fino alla parte superiore della cassetta, le pianticelle vengono trasferite in vasi da 6 pollici contenenti Supersoil e vengono poste nella serra (periodo di luce 16 ore, 15°-18°C). I rigeneranti crescono fino a maturità e vengono auto-impollinati. Alcune delle piante vengono esaminate per la loro risposta a Basta (200 g/l di PTT, Hoechst AG, Francoforte, Germania) mediante spruzzatura con una soluzione allo 0,5% (v/v) più 0,1% di Tween 20. Le piante vengono rigenerate anche dal callo di tipo selvaggio sui mezzi senza bialaphos.

Analisi delle piante transgeniche

Tessuti transgenici e piante transgeniche vengono analizzati mediante le tecniche Southern e Northern per dimostrare la presenza rispettivamente della sequenza che codifica la perossidasi e del RNA.

Le piante di orzo che hanno dimostrato di contenere la sequenza che codifica la perossidasi mediante analisi Southern vengono valutate per l'attività insetticida contro *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis Ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Acrosternum hilare*, *Euschistus servos*, *Hylemya platura*, *Mayetiola*

destructor, *Thysanoptera*, *Thrips*; oppure *Petrobia latens* adottando metodi ben noti nel settore.

★ ★ ★ ★

Tutte le pubblicazioni citate qui in precedenza vengono qui incorporate nella loro interezza come riferimento.

Mentre l'invenzione precedente è stata descritta con certi dettagli per scopi di chiarezza e di comprensione, da una lettura di questa descrizione, chi è esperto nel settore comprenderà che si possono realizzare diversi cambiamenti nella forma e nei dettagli senza allontanarsi dal vero ambito della invenzione e delle rivendicazioni allegate.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per controllare insetti che consiste nell'alimentare un insetto oppure nel porre a contatto un insetto con una quantità insetticida di cellule di piante monocotiledoni transgeniche, in cui dette cellule di piante contengono un DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica perossidasi.

2. Il metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto metodo consiste nel trasformare una pianta monocotiledone con una sequenza di DNA che contiene una sequenza codificante che codifica perossidasi.

3. Il metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta sequenza di DNA contiene un promotore collegato in modo operativo a detta sequenza codificante.

4. Il metodo secondo la rivendicazione 3, in cui detta sequenza di DNA contiene un gene chimerico che contiene un promotore collegato in modo operativo a detta sequenza codificante.

5. Il metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta perossidasi è una perossidasi anionica.

6. Il metodo secondo la rivendicazione 1, in cui dette cellule costituiscono una parte di una pianta transgenica fertile.

7. Il metodo della rivendicazione 6, in cui

detta pianta viene scelta dal gruppo costituito da frumento, riso, avena, orzo, sorgo e mais.

8. Il metodo della rivendicazione 7, in cui detta pianta è una pianta di mais.

9. Il metodo della rivendicazione 8, in cui detta pianta di mais è una linea di mais scelta dal gruppo costituito da CG00526, CG00615 e CG00714.

10. Il metodo della rivendicazione 1, in cui detta pianta viene trasformata adottando una tecnica

scelta dal gruppo costituito da bombardamento con particelle, elettroporazione e trattamento con polietilene glicol.

11. Il metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detta sequenza di DNA contiene inoltre un gene marcatore selezionabile oppure valutabile.

12. Il metodo secondo la rivendicazione 11, in cui detto gene marcatore codifica un enzima scelto dal gruppo costituito da neomicin fosfotransferasi, igromicin fosfotransferasi, diidrofolato reductasi, fosfinotricina acetiltransferasi, acido 2,2-dicloropropionico dealogenasi, acetoidrossiacido sintasi, 5-enolpiruvilscichimato fosfato sintasi, aloarilnitrilasi, acetil-coenzima A carbossilasi, diidropteroato sintasi, cloramfenicol acetil trasferasi e

β -glucoronidasi.

13. Il metodo della rivendicazione 1, in cui detto insetto deriva da un ordine scelto dal gruppo costituito da Coleotteri, Ditteri, Imenotteri, Lepidotteri, Mallofagi, Omotteri, Emitteri, Ortotteri, Tisanotteri, Dermatteri, Isotteri, Anopluri, Sifonatteri e Tricotteri.

14. Il metodo della rivendicazione 13, in cui detto insetto viene scelto dal gruppo costituito da piralide del mais europeo, piralide degli steli di mais, agrotide nero, bruco delle spighe di mais, bruco dell'armata 'fall', piralide del mais sud occidentale, piralide degli steli di mais inferiori, piralide della canna da zucchero, bruco delle radici del mais occidentale, bruco delle radici del mais settentrionale, bruco delle radici del mais meridionale, enteridi, scarabeo mascherato settentrionale, scarabeo mascherato meridionale, coleottero giapponese, coleottero-pulce del mais, cimice del mais, afide delle foglie di mais, afide delle radici di mais, cimice, cavalletta dalle zampe rosse, cavalletta migratoria, larva dei semi di mais, 'leafminer' delle pustole del mais, tripide dei cereali, formica e acaro-ragno a due macchie.

15. Una pianta monocotiledone transgenica

fertile che contiene un DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica una perossidasi in cui l'espressione della perossidasi conferisce a detta pianta monocotiledone un tratto fenotipico.

16. La pianta secondo la rivendicazione 15, in cui detto tratto fenotipico viene scelto dal gruppo costituito da resistenza agli insetti e capacità di resistenza 'standability'.

17. La pianta secondo la rivendicazione 16, in cui detto tratto fenotipico è resistenza agli insetti.

18. La pianta secondo la rivendicazione 15, in cui detta sequenza che codifica la perossidasi è un gene che codifica una perossidasi anionica.

19. La pianta secondo la rivendicazione 15, in cui detta pianta viene scelta dal gruppo costituito da frumento, riso, avena, orzo, sorgo e mais.

20. La pianta secondo la rivendicazione 19, in cui detta pianta è una pianta del mais.

21. La pianta secondo la rivendicazione 20, in cui detta pianta del mais è una linea di mais scelta dal gruppo costituito da CG00526, CG00615 e CG00714.

22. La pianta secondo la rivendicazione 15, in

cui detta sequenza del DNA comprende inoltre un gene marcatore selezionabile oppure 'screenable'.

23. La pianta della rivendicazione 22, in cui detto gene marcatore codifica un enzima scelto dal gruppo costituito da neomicina fosfotransferasi, igromicina fosfotransferasi, diidrofolato reduttasi, fosfinotricin acetiltransferasi, acido 2,2-dicloro-propionico dealogenasi, acetoidrossiacido sintasi, 5-enolpiruvil-scichimato-fosfato sintasi, aloaril-nitrilasi, acetil-coenzima A carbossilasi, diidro-pterato sintasi, cloroamfenicol acetil transferasi e β -glucoronidasi.

24. Una cellula, un tessuto oppure un seme di una pianta transgenici ottenuti dalla pianta secondo la rivendicazione 15.

25. Un discendente transgenico della pianta secondo la rivendicazione 15.

26. Una cellula, un tessuto oppure un seme di una pianta transgenici ottenuti dal discendente secondo la rivendicazione 25.

26. Impiego di un DNA ricombinante che codifica perossidasi per conferire resistenza nei confronti degli insetti a cellule di piante monocotiledoni.

28. Impiego di una pianta che contiene DNA ricombinante che codifica perossidasi per controllare

un danno alla pianta provocato dall'attacco di insetti.

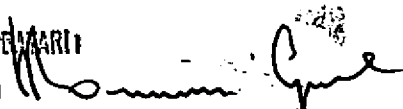
29. Un metodo agricolo in cui si usa il materiale di piante transgeniche oppure piante transgeniche che contengono DNA ricombinante che comprende una sequenza codificante che codifica perossidasi, in cui l'espressione della perossidasi conferisce a detta pianta monocotiledone un tratto fenotipico.

Ing. Barzanò & Zanardo Milano S.p.A.

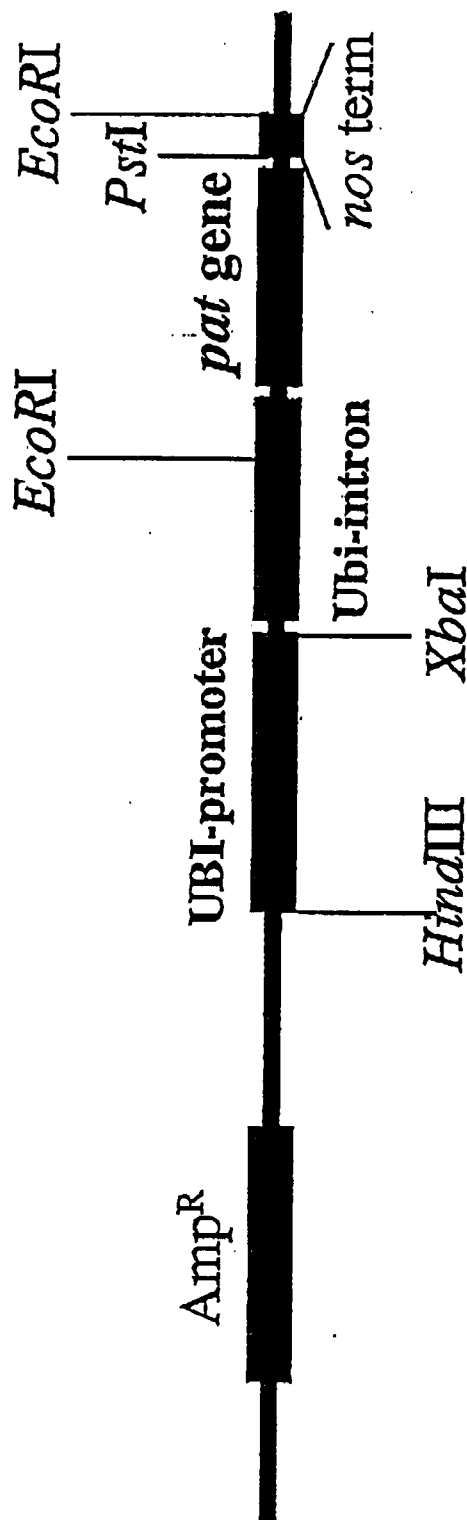
C/rb/1094

I MANE MARTI

(firma)

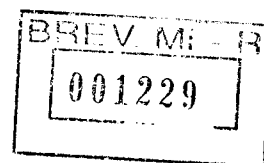

(per sé e per gli altri)





1 Kb

Fig. 2. Plasmid pUBIAC.



(Name) *Manim. Gue*

[Signature]

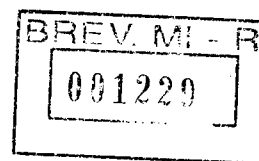
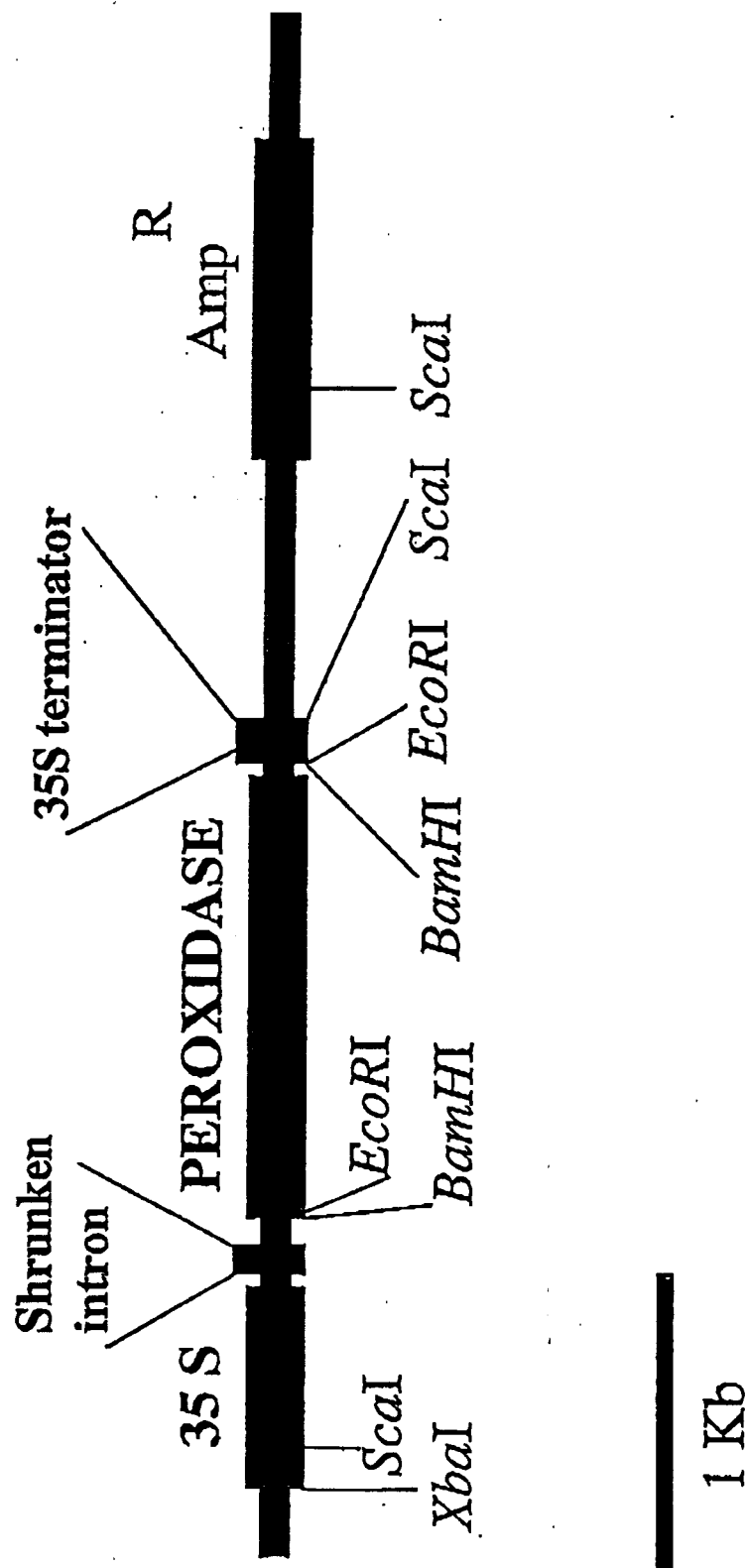
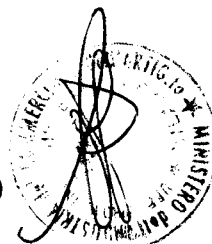


Fig. 1. Plasmid pJS20293.



MANDATARI
(firma)

(per sé e per gli altri)