



H U 0 0 0 2 1 8 8 9 6 B

(19) Országkód

HU**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL****SZABADALMI
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

218 896 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 00681
(22) A bejelentés napja: 1991. 09. 10.
(30) Elsőbbségi adatok:
9019736.9 1990. 09. 10. GB
9108471.5 1991. 04. 19. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 91/01540
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/04453

(51) Int. Cl.⁷**C 12 N 5/14**
C 12 N 15/82
A 01 H 5/00

(40) A közzététel napja: 1994. 07. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 12. 28.

(72) Feltalálók:

Atkinson, Howard John, Leeds,
West Yorkshire (GB)
Bowles, Dianna Joy, Upper Nidderdale,
North Yorkshire (GB)
Gurr, Sarah Jane, York, North Yorkshire (GB)
McPherson, Michael John, Dewsbury,
West Yorkshire (GB)

(73) Szabadalmaz:

ADVANCED TECHNOLOGIES,
Cambridge (GB)

(74) Képviseelő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás növények parazita fonalférgekkel szembeni védelmére****KIVONAT**

A találmány tárgya eljárás fonalférges (nematódák) irtására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi, hogy azonosítunk egy gént, amely gén promotere egy táplálkozási helyen vagy annak szomszédságában, egy nematódával sikeresen megfertőzött növényben indukálódik

de nem konstitutívan a gén promoterrégióját egy további régióval kombinálják, amely további régió egy, a fonalféreg támadását megszakító terméket kódol, az így kapott szerkezettel egy növényi sejtet transzformálnak, és az így transzformált sejtől növényeket regenerálnak.

A találmány tárgyát növényparazita fonalférgekkel szembeni védekezés, különösen egy gyökércisztaképző fonalférgek elleni védekezésre szolgáló eljárás képezi. A találmány fonalférgekkel szembeni rezisztencia bevitelére is vonatkozik a gyökércisztaképző fonalférgekkel szemben fogékony növényfajok széles körében, például burgonyanövényekben (*Solanum tuberosum*).

A tisztaképző fonalférgek (elsődlegesen *Heterodera* és *Globodera* fajok) a legjelentősebb haszonnövények kulcskártévoí. Ezek közvetlen termésvesztéséért és olyan közvetett veszteségekért is felelősek, melyeket a peszticidekre fordított költségek, és az okoz, hogy vetésforgót nem optimálisan alkalmazzák. A burgonya-fonalférgek (*Globodera rostochiensis* és *Globodera pallida*) a burgonya legjelentősebb kártevői az Egyesült Királyságban, Európa számos más részén és más vezető burgonyatermesztő térségekben. A *Heterodera glycines* (szójabab-fonalféreg) által okozott gazdasági kár a szójababnál meghaladhatja az 500 millió dollárt évente csak az Amerikai Egyesült Államokban. A cukorrépa-termelők körében Európában és az Amerikai Egyesült Államokban a *Heterodera schachtii* (répa-fonalféreg) okozza a fő problémát. A *Heterodera avenae* (gabona-fonalféreg) világszerte káros gazdasági jelentőséggel bír.

A tisztaképző fonalférgek gazdaságilag jelentős súrlóságban általában a haszonnövények visszamaradt fejlődését okozzák. A gyökérrendszer kisebb, mint a nem fertőzött növényeknél, és emiatt ásványos-hiányos tünetek mutatkoznak a levelekben, és megnövekedik annak a kockázata, hogy száraz talajkörülmények között elhervadnak. A termésvesztés egyenes arányban áll a vetéskor jelen lévő tisztaképző fonalférgek számával, és súlyos esetekben a haszonnövényeknél, mint például a burgonyánál és szójánál lényegében meghaladja az 50%-ot.

Jelenleg a védekezés a vegyszerektől, termelési módszerektől és a rezisztens fajtáktól függ, melyeket együttesen is alkalmazhatnak. Ezeknél hatékonyabb védekezési módra van szükség. A nematicidek a legkevésbé elfogadható növényvédő szerek közé tartoznak a széles körű alkalmazásban. Például az Aldicarb és ennek bomlástermékei erősen toxikusak az emlősökre, és szennyezik a talajvizet. Ennek eredményeként az USA több államában a kormányzatok korlátozták ennek a nematicidnek a használatát. Hollandiában öt éve csökkentik a nematicidek alkalmazását. A természet szabályozása nem jelent ideális megoldást a fonalférgek elleni védekezésre, mivel az olyan művelési lépések, mint a vetésforgó, rejtett veszteségeket okoznak, ez a speciális növényeket termesztők számára és azok számára, akik részére kevés alternatív gazdasági növény áll rendelkezésre, elfogadhatatlan.

Egy növény fonalférgekkel szembeni rezisztenciáját az okozhatja, hogy a fonalféreg a gazdanövényfaj egyik genotípusán képtelen szaporodni, és egy vagy néhány növényi génen alapuló domináns, részben domináns és recesszív öröklődés fordulhat elő. Azonban ezeknek a növényeknek korlátozott a piaci értéke a növénytermesztők és a gazdálkodók körében. Például bur-

gonyánál különböző rezisztenciaforrások léteznek, és ez az európai populáció megosztottságát okozza, így van ez az egyénes öröklődésű H1 domináns gén esetében, mely rezisztenciát okoz *G. rostochiensis* Ro1-gyel és Ro4-gyel szemben, de ennek a fajnak más formáival szemben (Ro2, Ro3 és Ro5) nem.

A Maris Piper burgonyafajta expresszája a H1-t, és széles körben alkalmazzák az Egyesült Királyságban a *G. rostochiensis*-szel szemben, de az alkalmazásával párhuzamosan a H1 jelenlétében is szaporodni képes *G. pallida* elterjedése megnövekedett. A rezisztenciát megszüntető patotípusok kapcsán felmerült probléma más tisztaképző fonalférgekkel is előfordul, és a rezisztencia forrásai ismertek. Néhány esetben a rezisztencia poligénes, mely a növénynevelés számára még több nehézséget jelent. Továbbá a rezisztencia néhány fajtában inkább mennyiségi és nem minőségi tulajdonság, és így az ilyen fajták gyakori alkalmazására adott válaszként idővel a patogén fokozott szaporodása fordulhat elő.

A növény és a patogén közötti érintkezési felület kulcsfontosságú hely a fertőzéssel szembeni érzékenység vagy rezisztencia meghatározásában. A fertőzési folyamat korai meghatározó szakasza folyamán az érintkezési felület a növényi sejtek kis számára korlátozódik a fertőzés helyén. A meglévő növényi sejtek későbbi újra differenciálódása egy szincíciumot (többmagvú óriássejt) hoz létre, az állat ebből táplálkozik. A szincícium kialakulását a 2. stádiumban lévő lárvák váltják ki, miután a gazdanövény gyökereibe vándoroltak, valószínűleg az állat által egy kezdeti táplálékul szolgáló sejtbe kibocsátott szekrétrumra adott válaszreakcióként. Egy érzékeny növény esetében a szincícium mennyisége megnő, és ez a fonalféreg táplálkozási időszaka alatt egész végig fennmarad. Nőstényeknél ez néhány hétig tart. A szincícium sejtbiológiáját jól ismerjük.

A találmány célja olyan eljárás biztosítása fonalféreg elleni rezisztencia létrehozására egy növényben, mely univerzális, hosszú ideig fennmaradó védelmet nyújt a tisztaképző fonalférgekkel szemben. A találmány szemben azokkal az eljárásokkal, melyek egy ismert rezisztencia gént alkalmaznak, olyan gének alkalmazásán alapul, melyek specifikus részét képezik a fonalféreg-fertőzéssel szembeni érzékenységnek.

A találmány olyan, korábban ismeretlen gének azonosítására vonatkozik, melyek egy tisztaképző fonalféreg táplálkozási helyén, a fonalféreg kötődése után specifikusan expresszálódnak. A gének azonosítását polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával lehet végrehajtani. Az érintkezési felület molekuláris biológiájának megértését korábban az gátolta, hogy a növény és a patogén közötti érintkezési sejt felület kisméretű. A találmány továbbá ezeknek a géneknek az új alkalmazására vonatkozik abból a célból, hogy a gének a fonalféreg támadásakor, specifikusan a táplálkozási helyen olyan anyagok kibocsátását irányítsák, melyek toxikusak a növényi sejtekre vagy a fonalférgekre. Ezeknek az anyagoknak a specifikus kibocsátása lehetővé teszi olyan vegyületek használatát, melyek ha a növényben konstitutív módon expresszálódnának, károsítanák a

növény növekedését vagy egy elfogadhatatlan toxikológiai veszélyt eredményeznének. Sokféle ilyen vegyület ismerünk, és ismert biotechnológiai módszerek állnak rendelkezésre a találmányban történő alkalmazásukhoz.

A megfelelő fonalféregre specifikus gének a növények széles körében kimutathatóak, és így bármely olyan haszonnövény védelme lehetővé válik, mely genetikailag úgy manipulálható, hogy a táplálkozási helyre jellemző gének promotereihez kapcsolt, a fonalféreg szaporodását megakadályozni képes szekvenciát expresszáljon. Néhány bemutató jellegű példa a korlátozás szándéka nélkül: burgonya, paradicsom, cukorrépa és dohány.

Ismeretes, hogy a különböző cisztaképző fonalférgeknél a szincícium kialakulása hasonló. Egy specifikusan indukált gén tehát univerzálisan alkalmazható az összes cisztaképző fonalféregnél. Ezek közé tartozik, de nem kizárólag: *Globodera pallida* és *Globodera rostochiensis* (burgonya-fonalférgek), *Heterodera glycines* (szójabab-fonalféreg), *Heterodera shachtii* (répafonalféreg), *Heterodera avenae* (gabona-fonalféreg), *Heterodera orizae* (rizsfonalféreg) és *Globodera tabacum* (dohányfonalféreg).

A leírásban a „gén” kifejezés egy olyan DNS-szekvenciára vonatkozik, mely magában foglal: (1) upstream (5') szabályozó szignálokat, ezek közé tartozik a promoter, (2) a terméket, a fehérjét, a gén RNS-ét meghatározó kódoló régiót és (3) downstream (3') régiókat, ide tartoznak a transzkripció terminátor és poliadenilációs szignálok, és (4) ehhez kapcsolódó, a hatékony és specifikus expresszióhoz szükséges szekvenciákat.

A „promoter” kifejezés egy DNS-szekvenciának arra a területére vonatkozik, mely a kódoló szekvencia hatékony expressziójához szükséges szignálokat foglalja magában. Ez olyan szekvenciákat foglalhat magában, melyhez egy RNS polimeráz kötődik, de nem korlátozódik csak ezekre a szekvenciákra, és magában foglalhat olyan régiókat is, melyekhez más szabályozó fehérjék kötődnek, együtt a fehérjetranszláció szabályozásában részt vevő régiókkal, valamint kódoló szekvenciát is tartalmazhat.

A találmány első tárgya fonalférgek elleni védekezésre szolgáló eljárás, mely során azonosítunk egy olyan gént, mely a fonalféreg által sikeresen fertőzött növényben indukálódott, és úgy módosítjuk a gént, hogy az fonalféreg-rezisztenciát biztosítson a növénynek.

Az eljárás során előnyösen a növény fonalféreg-fertőzése által a táplálkozási helyen indukált géneket azonosítjuk, mely említett gének a fonalféreg-fertőzésre jellemzőek.

A gének előnyös azonosítási eljárása a következő lépésekből áll.

polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával egy cDNS-könyvtárat hozunk létre;

az említett könyvtárat fertőzött és nem fertőzött növények cDNS-ével hasonlítjuk össze; és

azonosítunk egy táplálkozási helyen expresszálódó gént képviselő cDNS-klónt, és a cDNS-klónt arra használjuk fel, hogy a megfelelő genomiális klónt izoláljuk.

A gén vagy része lényegében a következő szekvenciák valamelyikéből álló DNS-szekvenciát tartalmazhatja:

- GCCCAAACCTTTCCGGTGTACTCCTTGTCTTGT
 5 TTTTGTAGTCTTTTACCTATCCAAAC
 AAAAATTTCTCGCCAAAAAGGGTTATAACAC
 CGCGATAAAGCTCTTAAATAATG (1. képlet)
 AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGA
 AGAATGGACAATTTTACCAAAGCATT
 10 CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGAT
 GCTGTTGTTGTTTTGAAGG (2. képlet)
 GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGA
 GTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTGT
 CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGN
 15 CGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT
 TAAATTAAGTTAGCAACGG (3. képlet)
 CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGG
 ATAACACCGNCCGGCTGCCGGGGCTGGC
 GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTAT
 20 CGATATGCTCTCAACCGGCATTAATAA (4. képlet)
 CAGCATTACACTGGCCAGGTGCAGTACAGCA
 TGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT
 ACTTTTCGGAATATGCACACCGGCTGCTATC
 AAAGCCTGAAGGCCTGCATA (5. képlet)
 25 GTCGCTACCTTTCCGGACGCAATACCGTATTG
 CTGCGCTCCAGAGAGTACCTACCGCT
 TTGAATGAC (6. képlet)
 GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTA
 CGGCTACGGAGTTGCACAACCTTGC GGAC
 30 GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (7. képlet)
 CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATTCCTG
 GCCGTCGTTTTTACAACGTCGTCGTGACT
 GGGAAACCC (8. képlet),
 ahol A jelentése adenin, C jelentése citozin, T jelen-
 35 tése guanin, és N jelentése nem meghatározott nukleinsav.
 A fentebb említett vagy a találmány következő tárgyaiban szereplő DNS-szekvencia lényegében a fentebb említett szekvenciák (1–8. képlet) bármelyikéből állhat, vagy ezeknek a géneknek az alléljeit vagy polimorf változatait képviselő ekvivalens nukleotidszekvenciákból állhat.
- A találmány másik tárgya egy fonalféregre rezisztens növény, mely egy olyan gént vagy annak egy részét foglalja magában, mely gén lényegében a következő szekvenciák valamelyikéből álló DNS-szekvenciát tartalmazza:
- GCCCAAACCTTTCCGGTGTACTCCTTGTCTTGT
 TTTTGTAGTCTTTTACCTATCCAAAC
 50 AAAAATTTCTCGCCAAAAAGGGTTATAACAC
 CGCGATAAAGCTCTTAAATAATG (1. képlet)
 AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGA
 AGAATGGACAATTTTACCAAAGCATT
 CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGAT
 55 GCTGTTGTTGTTTTGAAGG (2. képlet)
 GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGA
 GTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTGT
 CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGN
 CGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT
 60 TAAATTAAGTTAGCAACGG (3. képlet)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGG
ATAACACCGNCCGGCTGCCGGGGCTGGC
GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCGTAACCGTAT
CGATATGCTCTCAACCGGCATTA AAA (4. képlet)
CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCA
TGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT
ACTTTTCGGA ACTATGCACACCGGCTGCTATC
AAAGCCTGAAGGCCTGCATA (5. képlet)
GTCGCTACCTTTCGGGACGCAATACCGTATTG
CTGCGCTTCCAGAGAGTACCTACCGCT
TTGAATGAC (6. képlet)
GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTA
CGGCTACGGAGGTTGCACA ACTTGC GGAC
GCAAATAACGCGCAACAATCGG (7. képlet)
CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATCACTG
GCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT
GGGAAACCC (8. képlet),

ahol A jelentése adenin, C jelentése citozin, T jelen-
tése guanin, és N jelentése nem meghatározott nuklein-
sav.

A találmány harmadik tárgya az előző, találmány
szerinti eljárással azonosított növényi gén promoter ré-
giójának alkalmazása arra, hogy gyökércisztaképző fon-
alféreggel szembeni rezisztenciát biztosítsunk egy nö-
vénynek.

Az eljárás a következő lépéseket tartalmazhatja: a
korábban említett, találmány szerinti gének promotereivel
módosítjuk vagy transzformáljuk a növényt, és to-
vább módosítjuk a növényt a promotert olyan eszközök-
höz kapcsolva, melyek elpusztítják az olyan növényi
sejtet, mely egy fonalféreg stimulációját követően meg-
próbál a szincíciummá redifferenciálódni.

A táplálkozási helyen expresszázó génklón pro-
moter szekvenciáját promoterként alkalmazhatjuk a kö-
vetkező anyagoknál:

i) egy toxikus fehérje, peptid vagy enzim, így DN-
áz, RN-áz vagy egy proteáz,

ii) többgénés toxikus tünetegyüttes, mely során pél-
dával a promoter egy olyan fehérjét vagy peptidet exp-
resszálhat, ami inaktív mindaddig, míg egy másik
olyan promoterhez kapcsolt gén által termelt fehérje
nem aktiválja, mely promoterről megállapítottuk, hogy
a táplálkozási helyre specifikus. Az első gén A terméke
inaktív lehet mindaddig, míg a második gén B terméke
olyan hatással nincs rá, hogy az új A¹-t kialakítsa, mely
egy aktív toxin vagy proteáz. Alternatív lehetőségként
A B nélkül inaktív, és csak az A-B molekula aktív.

iii) Antiszensz RNS, ezek közé egy vagy több olyan
gén antiszensz RNS-e tartozik, mely azonos a talá-
lmány szerinti génszekvenciákkal vagy más táplálkozá-
si helyre specifikus génnel. A promoter arra alkalmaz-
ható, hogy a saját antiszensz RNS-ének termelését irá-
nyítsa. Ez drámaian lecsökkenti a normális termék
mennyiségét. Alternatív lehetőségként a promotert álta-
lános celluláris gének, így például a sejt életképessége
szempontjából létfontosságú ATP szintetáz gén anti-
szensz RNS-e expressziójának irányítására használ-
hatjuk.

A tisztaképző fonalféreggel szembeni rezisztencia
úgy is biztosítható a növényben, hogy az specifikusan

csak a táplálkozási helyen fejeződjön ki. Az eljárás so-
rán a következő lépéseket hajtjuk végre: egy növényt a
találmány szerinti korábban említett gének promotereivel
és egy olyan ehhez kapcsolt génnel módosítjuk
vagy transzformáljuk, melynek terméke elfogyasztása
után közvetlenül letális vagy erős szubletális hatású a
fonalféregre (azaz egy fonalféreg ellenes géntermék).
A találmányban alkalmazható potenciálisan hasznos gé-
nek lehetnek például a következők:

5 a) *Bacillus thuringiensis* (vagy egy hasonló organiz-
mus) fonalféreg-ellenes aktivitással rendelkező fehérje
toxinja.

b) A 0502730 számú publikált európai szabadalmi
leírásban ismertetett fonalféregre toxikus fehérje.

15 c) egy olyan antitest, mely a táplálékfelvétellel vagy
az emésztésre hatva megszakítja a táplálkozást, ilyenek
például a szójafonalféregre leírt antitestek, ezek közé
tartozik a dorzális garatmirigy elleni antitest is [Atkin-
son et al., *Annals of Applied Biology* 112, 459–469
(1988)], melyek előállítására Hiatt A., Cafferkey R. C.
és Bowdish K. által leírt, az antitestek növényekben tör-
ténő transzgenikus expressziójára szolgáló eljárások al-
kalmazhatjuk [Production of Antibodies in Transgenic
Plants, *Nature* 342, 76–78 (1989)].

25 d) egy olyan fehérje vagy peptid, mint például egy
neuropeptid, mely elfogyasztása után toxikus hatású a
cisztaképző fonalféregre.

Nyilvánvalóan a rezisztenciának nem kell abszolút-
nak lennie, de általában olyan mértékűnek kell lennie
az adott növényben, mely mezőgazdasági vagy gazdasá-
gi szempontból jelentős.

A találmány a fonalféreggel szemben olyan rezisz-
tencia biztosítására nyújt eszközöket, mely rezisztencia
a fonalféreg táplálkozási helyére vagy azzal szomszéd-
dos helyre lokalizálódik. Ez kiküszöböli annak szüksé-
gességét, hogy a növény konstitutív módon állítson elő
egy fonalféreg ellenes génterméket (például a talá-
lmány harmadik tárgyánál példaként felsorolt terméke-
ket). Ez lecsökkenti azokat a növényre káros hatásokat,
melyek a konstitutív expresszió során felléphetnek.

A találmánnyal számos haszonnövény megvédhető, és
ebből a célból ezek genetikailag úgy manipulálhatók,
hogy a szincíciumra jellemző gének promotereit és
ezekhez kapcsolt olyan szekvenciákat fejtszenek ki,
melyek megszakítják a növényi sejtek redifferenciáló-
dását szincíciummá, vagy egy fonalféreg ellenes génter-
méket expresszáljanak a szincíciumban. Ezek közé
azok a növények tartoznak, melyeket például a követke-
ző tisztaképző fonalféreg fertőzik: *Globodera pallida*
és *Globodera rostochiensis* (burgonya-fonalféregek),
Heterodera glycines (szójabab-fonalféreg), *Heterodera*
shachtii (répafonalféreg), *Heterodera avenae* (gabona-
fonalféreg), *Heterodera carotae* (sárgarépa-fonalfé-
reg), *Heterodera orizae* (rizsfonalféreg) és *Globodera*
tabacum (dohányfonalféreg). Néhány bemutatást szol-
gáló és nem korlátozó jellegű példa azokra a haszonnö-
vényekre, melyek a találmány szerinti megoldással a fon-
alféreggel szemben megvédhetőek: burgonya, paradicsom,
szója, cukorrépa, olajrepce, búza, zab, árpa, rizs,
sárgarépa, káposztafélék és dohány.

45

50

55
60

A találmányt a továbbiakban nem korlátozó jellegű példákön keresztül mutatjuk be.

Az 1. példa burgonyagének azonosítására, jellemzésére és manipulálására szolgáló eljárásokat ír le rezisztens transzgenikus burgonyanövények létrehozása céljából.

1. példa

Ebben a példában egy *Globodera rostochiensis* Ro2 patotípusra érzékeny burgonyafajta alkalmazását mutatjuk be abból a célból, hogy lehetővé tegyük a fonalféreg táplálkozási helyén expresszáldott gének azonosítását. Az 1–5. részekben a fertőzött gyökérszövet előállítását részletezzük. A kis mennyiségű lokálisan fertőzött szövet olyan mennyiségű RNS-t biztosított (6. rész), melyből legalkalmasabban PCR amplifikációs módszerrel tudtunk cDNS-könyvtárat létrehozni (7.1.–7.4. rész). A táplálósejtre specifikus cDNS-klónok izolálását megkülönböztető hibridizációs szűréssel hajtottuk végre olyan cDNS-próbákkal, melyek fertőzött és nem fertőzött szövetekből származtak (7.5. rész). A pozitív cDNS-klónokat DNS-szekvenálással elemeztük (10. rész), és a következő lépésekben az inszertumokat használtuk próbaként. A gének expressziójának időbeli és térbeli lefolyásának vizsgálatát Northern-analízissel hajtottuk végre (8. rész) különböző növényi szövetet és fertőzési időtartamot alkalmazva. A génextpresszió helyének további meghatározására *in situ* hibridizációs vizsgálatokat hajtottunk végre (12. fejezet). A tápláló sejtre specifikus cDNS-klónoknak megfelelő genomiális klónokat egy genomiális cDNS-könyvtárból izoláltuk (11. rész). A fonalféreggel szembeni rezisztenciát a táplálkozási helyen lokálisan expresszáldó növények (13. rész) létrehozására alkalmas szerkezetek kifejlesztéséhez a promotereket DNS-szekvenancia-analízissel azonosítottuk (11. fejezet).

1. Növényi anyagok

Maris Piper fajtájú *Solanum tuberosum* (A osztályú skót vetőmag burgonya) 24 napon át csíráztattuk [Hammond-Kosack K. E., Atkinson H. J., Bowles D. J., Changes in abundance of translatable mRNS species in potato roots and leaves following root invasion by cyst-nematode *G. rostochiensis* pathotypes, *Physiol. Mol. Plant Pathol* (1990)]. A különálló csírákat levágtuk a zacskóban növesztett gumókról, vagy a cserépben növesztett anyag esetében a teljes gumót használtuk fel.

2. fonalféreg

Ro1 és Ro2 patotípusú *Globodera rostochiensis* cisztáinak populációját száraz törzstenyészetként tartottuk fenn 4 °C-on. A cisztákat csapvízben áztattuk 7 napig 4 °C-on. Burgonyagyökér-diffuzátumot adtunk hozzá [Shepherd A. M., Southey J. F. (szerk), *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes: MAFF reference book 402*, 6. kiadás (1986)] és a lárvák szobahőmérsékleten 4-7 nap múlva keltek ki.

3. Fertőzés

Zacskós anyag: A különálló csírákat készen vett zacskókba (Northup-King, Minnesota) tettük. 1 cm×0,5 cm-es Whatman GFA papírcsikokat helyez-

tünk egyenként a gyökércsúcsok alá. Mindegyik gyökércsúcsra 10 µl gyökérdiffuzátumban lévő 50 fonalféreg pipettáztunk, majd egy második GFA papírcsikkal lefedtük. A fertőzés után 24 órával a fertőzések szinkronizálása érdekében a GFA szűrőpapírt eltávolítottuk. A zacskók alját levágtuk, és a zacskókat csapvízben tartva öntöttük.

Cserepes anyag: A kicsírázott gumókat 25 cm-es cserepekben talajba ültettük, melybe kikeletlen cisztákat helyeztünk olyan mennyiségben, hogy 50 Pete/gramm talaj populációsűrűséget kapjunk.

A nem fertőzött kontrollzacskókat és cserepeket ugyanilyen körülmények között tartottuk, csak ezek nem tartalmaztak cisztát.

4. Tenyésztési körülmények

A fertőzött burgonyákat olyan rendszerben növesztettük, mely a következőkből állt: 18 óra megvilágítás 22 °C-on, és 6 óra sötétség 18 °C-on.

5. Begyűjtés és feldarabolás

A zacskóban növesztett szövetet a fertőzés utáni 4., 7., 15. és 24. napon gyűjtöttük be. A szintelen lokálisan fertőzött gyökereket kivágtuk és azonnal fóliazacskókba, folyékony nitrogénbe helyeztük. A fertőzött területekkel közvetlenül szomszédos gyökérszöveteket szintén levágtuk, és elkülönítve lefagyasztottuk.

A cserépben növesztett szövetet 26 nappal az Ro2 fertőzés után gyűjtöttük be. A megjelenő nőstényeket és cisztákat egy finom ecsettel eltávolítottuk, és a helyileg fertőzött szövetet kivágtuk és azonnal folyékony nitrogénbe, különálló fóliazacskókba helyeztük.

6. Össz-RNS izolálása

A fóliazacskókat egy mozsártörővel óvatosan összezúztuk, hogy egy szövetport kapjunk, melyet felhasználásig -70 °C-on tároltunk. A porrá tört szövetet (12 mg) előhűtött 20 ml-es eldobható műanyag Sarstedt csövekbe vittük át folyékony nitrogénben, majd hozzáadtuk a 0,5 ml fenol/CH₃Cl/izoamil-alkohol elegyét (25:24:1) és a 0,5 ml GuHCl puffert (8 M guanidinium-HCl, 20 mM MES (4-morfolino-etanol-szulfonsav), 20 mM Na₂EDTA, a pH-t 7-re beállítva NaOH-val, és a merkaptóetanolt közvetlenül a felhasználás előtt hozzáadva 50 nM végkoncentrációban). Amikor a csövek jégen kiolvadtak, a szövetet egy Politron keverővel (Kinematica, Svájc) 15 lökettel homogenizáltuk. A vizes fázist még háromszor fenollal újra extraháltuk, majd -20 °C-on egy éjszakán át hagytuk kicsapódni, ezután 0,2 térfogat 1 M ecetsavat és 0,7 térfogat hideg 96%-os etanolt adtunk hozzá. A hozzávetőleg 13000×g-n 15 percig végzett centrifugálással kinyert RNS-t 4 °C-on 400 µl 3 M nátrium-acetáttal (pH=5;5), majd 70%-os hideg etanollal mostuk, végezetül 30–50 µl DEPC-cel kezelt H₂O-ban feloldottuk, és -70 °C-on tároltuk.

7. PCR-en alapuló cDNS-könyvtár létrehozása

7.1. cDNS-szintézis

G. rostochiensis Ro2 patotípusával végzett fertőzés után 26 nappal összegyűjtött burgonyagyökérből származó 1 µg össz-RNS-t 5 percen át 70 °C-os vízfürdőben denaturáltuk, majd jégen gyorsan lehűtöttük. A mintát a következőkből álló reakcióelegyhez adtuk

hozzá: 4 µl 5×AMVRT puffer (250 mM Tris-HCl, pH=8,3, 250 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM DDT, 5 mM EDTA, 50 µg/ml marha-szérumalbumin), 2 µl oligo(dT₁₇) (100 µg/ml), 2 µl dNTP elegy (10-10 mM ATP, dCTP, dGTP, dTTT), 1 µl 10 mM spermidin-HCl, 1 µl 80 mM nátrium-pirofoszfát és 125 egység humán placenta ribonukleáz inhibitor (HPRNI). 10 egység madár mioblasztóza vírus (AMV) reverz transzkriptáit adtuk hozzá, és a végső reakcióterfogatot 20 µl-re állítottuk be, mielőtt 1 órán át 42 °C-on inkubáltuk. A reakciót 20 µl 0,1 M NaCl és 40 mM EDTA hozzáadásával állítottuk le. A termékek hosszát és minőségét egy 50 µCi ³²P-vel jelölt dCTP-t (3000 Ci/mmol) tartalmazó párhuzamos reakció felállításával állapítottuk meg. A jelölt reakciótermékeket egy alkalikus gélen frakcionáltuk, melyet ezután autoradiografáltunk. A jelölt termékek zöme 200–2000 bp mérettartományba esett, a nagyobb termékek tisztán látszottak.

Az oligo-dT primert szelektív precipitációval távolítottuk el. 0,5 µg poliI-poliC-t (Pharmacia) és 3 µl 10% (tömeg/térfogat) CTAB-ot adtuk a reakcióelegyhez, majd egy mikrocentrifugában szobahőmérsékleten 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót óvatosan eltávolítottuk, és a pelletet 14 µl 1 M NaCl-ben újra szuszpendáltuk, ehhez 25 µl H₂O-t és 1 µl 10%-os CTAB-ot adtuk hozzá, és a mintát újra pelletáltuk mikrocentrifugában. A pelletet végül 10 µl 1 M NaCl-ben újra szuszpendáltuk, és 2,7 térfogat etanolban kicsaptuk –20 °C-on egy éjszakán át. A pelletet 70%-os etanolban mostuk, és 7 µl H₂O-ban oldottuk. A dG-farok képzési reakciót úgy hajtottuk végre, hogy a mintához a következőket adtuk: 4 µl 5×farokképző puffer (1 M kálium-kakodilát, 125 mM Tris-HCl, pH=7,2), 1 µl 2 mM DTT, 2 µl 5 mM kobalt-klorid, 5 µl 20 M dGTP és 25 egység terminális transzferáz (Boehringer), és 37 °C-on 20 percen át inkubáltuk, majd 4 µl 100 mM EDTA-val és 2 µl 1 M NaCl-lel állítottuk le a reakciót. A nukleotidok feleslegét úgy távolítottuk el, hogy 1 µl 10%-os (tömeg/térfogat) CTAB-ot adtuk hozzá, és 4 °C-on 20 percen át mikrocentrifugában centrifugáltuk. A pelletet 10 µl 1 M NaCl-ben feloldottuk, majd 0,25 µg glikogént és 30 µl hideg etanolt adtuk hozzá, és –20 °C-on egy éjszakán át újra kicsaptuk. A pelletet 70%-os etanolban mostuk, majd újra feloldottuk 20 µl 50 mM NaOH és 2 mM EDTA elegyében, és 65 °C-on 60 percen át inkubáltuk, hogy hidrolizáljuk az RNS-t. A cDNS-t etanollal ismét kicsaptuk, mostuk, és a csapadékot 20 µl H₂O-ban feloldottuk.

7.2. PCR amplifikáció

A homopolimer farokkal ellátott egyszálú cDNS PCR amplifikációjához a következő amplimereket használtuk:

A (oligo-dT₁₇-NotI): GCGCCGCTTTTTTTTTT-TTTTTT

B (oligo-dCl4-EcoRI): AAGGAATCCCCCCC-CCCCC

A PCR reakcióelegyeket, melyek 10 µl 10×PCR puffert (100 mM Tris-HCl, pH=8, 3, 500 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 0,1% zselatin), 10 µl 10×dNTP elegyet

(5-5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pmol A amplimert, 100 pmol B amplimert, 2 egység Taq polimerázt és 1–10 ng oligo-(dG)-farokkal ellátott cDNS-t tartalmaztak 20 µl teljes reakcióelegyben, 20 µl ásványi olajjal felülrétegeztük. Ezután a reakciót a következő hőciklusokkal hajtottuk végre: 1 kétperces ciklus 96 °C-on a termékek denaturálására; 96 °C 2 perc, 58 °C 2 perc, 72 °C 3 perc, hogy lehetővé váljon a második szál szintézise; 1 ciklus (96 °C 2 percig, 40 °C 2 percig, 72 °C 2 percig), hogy az oligo-(dT)-ről biztosítsuk a láncindítást; 15 ciklus (96 °C 2 percig, 58 °C 2 percig, 72 °C 3 percig) a termékek amplifikálására. A reakcióelegyet egy NuSieve GTG LMP (FMC Bioproducts) gélen végzett elektroforézissel frakcionáltuk méretmarkerként 123 bp-os DNS-létrát alkalmazva, és a <500 bp, 500–1500 bp, 1500–2000 bp és 2000 bp < méretosztályoknak megfelelő gélterületeket kivágtuk, és úgy nyertük ki a gélből, hogy –20 °C-on fagyasztottuk, majd mikrofügában 10 percig centrifugáltuk Spin-X filterteken (Costar). A PCR termékeket Southern blotoltuk, és 3 olyan klónhoz hibridizáltuk, melyekről tudtuk, hogy konstitutívan expresszálódnak a burgonyagyökerekben. A PCR termékekhez hosszú és rövid valamint nagy és kis mennyiségben lévő transzkriptumok cDNS-próbái hibridizáltak, mely arra mutatott rá, hogy a különböző transzkriptumok megfelelően képviseltetik magukat a könyvtárban.

7.3. Könyvtár szerkesztése

A kinyert DNS-t (200 bp-nál nagyobb) EcoRI-val és NotI-vel emésztettük, és az ugyanígy emésztett lambda-Zap-ba ligáltuk, majd *in vitro* Stratagene Giga Plus pakolóelegyét alkalmazva a gyártó útmutatásainak megfelelően pakoltuk. A könyvtárat *E. coli* XL1-Blue törzsön titráltuk 12,5 mM IPTG-t és 6,25 mg/ml X-gal-t tartalmazó 1%-os fedőagarból álló LB lemezeket alkalmazva.

7.4. A könyvtár értékelése

A PCR-en alapuló cDNS-könyvtár minőségét két módon állapítottuk meg, (i) hozzávetőleg a tarfoltok 96%-ról igazoltuk, hogy rekombinánsak, melyet a bétagalaktozidáz alfa-komplementáció inszerciós inaktiválásával mutattuk ki; (ii) a plakkokról, melyeket random módon felszúrtunk és PCR pufferbe helyeztünk, majd komplementer M13 amplimereket alkalmazva amplifikáltunk, egyetlen 230–1000 bp méretű, átlagosan 470 bp méretű inszertumot mutatunk ki.

7.5. Megkülönböztető szűrés

A könyvtárral $3,5 \times 10^5$ rekombináns fagot hoztunk létre, melyből 6×10^4 mennyiséget szűrtünk ³²P-dCTP-vel jelölt próbával. A próbát olyan egyszálú cDNS-ből szintetizáltunk, mely 26 nappal az Ro2 fertőzést követően a fertőzött gyökérszövetből vagy azonos korú egészséges gyökerekből készített 10 µl össz-RNS-ből származott [Gurr S. J., McPherson M. J., PCR-based cDNA library construction. McPherson M. J., Quirke P., Taylor G. R. (szerk.): Polymerase chain reaction: A practical approach (1991) IRL Press at Oxford University Press, Oxford]. A beépületlen izotópot ammónium-acetátos kicsapással távolítottuk el, és a próbákat úgy állítottuk be, hogy ekvivalens cpm/µg cDNS/ml hibridizációs fo-

lyadékkértéket adjon a szcintillációs számlálás után. Tarfolt-lenyomatokat készítettünk két példányban, és 0,5 M NaOH és 1,5 M NaCl elegyében denaturáltuk, és 1,5, 0,5 M Trisben (pH=7,2) és 1 mM EDTA-ban semlegesítettük, és kiszárítottuk (80 °C, 2 óra). A szűrőket elkülönített „egészséges” és „fertőzött” előhibridizációs folyadékban (5×SSPE, 6% PEG 6000-t, 0,5% Marvelt (sovány tejpor), 1% SDS, 0,1% nátrium-pirofoszfát és 250 µg/ml ultrahanggal kezelt és denaturált hering sperma DNS) 65 °C-on 6 órán át előhibridizáltuk. 24 órán át 65 °C-on hibridizáltunk, miután a megfelelő radioaktívan jelölt egyszálú próbát hozzáadtuk. A hibridizáció után a szűrőket egymás után 5×SSC és 0,1% SDS elegyében, majd 1×SSC és 0,1% SDS elegyében mostuk 65 °C-on, mindegyik oldatban 2×20 percig. A lenyomatokat röntgenfilmre exponáltuk erősítőernyőkkel -70 °C-on. Azokat a tarfoltokat, melyek az Ro2 26 napos próbával hibridizáltak, de az egészséges 26 napos próbával nem, homogenitásig tisztítottuk 2 további plakkszűrést végrehajtva.

8. Northern- és Southern-hibridizáció és próba készítése

Pályánként 10 µg RNS-t vittünk fel 0,6 M formaldehidet tartalmazó agarózgélre, és 7,5 Vcm⁻¹-nél megfuttattuk. A gélt lefényképeztük, és 2×20 percig 10×SSC-ben áztattuk, majd Hybond-N membránra (Amersham) blottoltuk 10×SSC-vet. A szűrőket kiszárítottuk (80 °C, 2 órán át), és 12 órán át 42 °C-on 50% formamid, 5×SSC, 1×Dendhards, 100 µg/ml hering sperma DNS és 250 mM foszfátpuffer elegyében (pH=6,5) előhibridizáltuk. A hibridizációt friss előhibridizációs pufferban hajtottuk végre 42 °C-on 24 órán át hődenaturált ³²P-hexaprimerrel jelölt pPSR2-4 próbával (25 ng) [Feinberg A. P. és Vogelstein B., *Nucleic Acids Research* 14, 2229 (1983)]. A szűrőket egymás után 5×SSC és 0,1% SDS elegyében, majd 42 °C-on 2×SSC és 0,1% SDS elegyében, végül 65 °C-on 2×SSC és 0,1% SDS elegyében mostuk. A lenyomatokat röntgenfilmre exponáltuk, erősítőernyőkkel -70 °C-on. PMR1 inszertumot készítettünk oly módon, hogy egy különálló tisztított tarfoltot felszűrtünk, és PCR pufferbe helyeztünk, és komplementer M13 amplimerrel amplifikáltuk Gussow D. és Clackson T. eljárása szerint [*Nucleic Acids Research* 17, 4000 (1989)].

Fiatal burgonyalevelekből (Maris Piper fajta) származó sejtmagokból genomiális DNS-t készítettünk oly módon, ahogy Jofuku K. D. és Goldberg R. B. leírta [*Plant Molecular biology: A Practical Approach* (C. S. Shaw szerk.), 37-66 (1989)]. A nagy molkulatömegű DNS-t 0,6%-os agarózgélén méret szerint fracionáltuk, miután restriktív enzimekkel emésztettük. A génextpresszió egész növényben történő elemzésére RNS-t vontunk ki a fertőzött és fertőzetlen hajtásokból, levélgyeletekből, levelekből, virágokból és gyökerekből is. Abból a célból, hogy analizáljuk a sérülésre adott választ, a növénygyökereket vagy leveleket szétmorzsoltuk, és RNS-t vontunk ki a kezelt szövetből egy adott időtartam múlva (3, 6, 9 és 12 órával a szétromcsolás után). A mintákat Northern-analízis során

olyan RNS-sel hasonlítottunk össze, melyet fonalféreggel fertőzött gyökerekből extraháltunk. A géleket purinmentesítettük, denaturáltuk és Hybond-N membránra blottoltuk [Sambrook, J., Fritsch, E. F. és Maniatis T., *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2. kiadás, Cold Spring Harbour Press (1989)]. A szűrőt kiszárítottuk (80 °C-on 2 órán át), és 6 órán át 65 °C-on a tarfoltok megkülönböztető szűrésénél leírt előhibridizációs folyadékban előhibridizáltuk. A homogén hibridizációs és a mosási körülmények olyanok voltak, melyet a northern blot szűrőknél leírtunk. Heterológ hibridizációt 56 °C-on hajtottuk végre, és a szűrőket 5×SSC-ben 56 °C-on mostuk.

9. A pBluescript kivágása a lambda ZAP-ból és a plazmid tisztítása

A PMR1 pBluescript klónt, mely az 1-8. képlet valamelyikében bemutatott szekvenciát tartalmazza, kihalásítottuk a pozitívan hibridizáló lambda ZAP klónból, és kimentettük a Stratagene kézikönyv útmutatásainak megfelelően. A plazmid DNS-t cézium-kloridos sűrűség grádiens centrifugálással tisztítottuk [Davis L. G., Dibner M. D., Batey J. F., *Basic methods in molecular biology*, Elsevier Science Publishers, New York (1986)].

10. Szekvenciaanalízis

A DNS-szekvencia analízisét lúgosan denaturált plazmid DNS-en hajtottuk végre a Sequenase (2.0 verzió) reakcióelegyek (United States Biochemical Corp.) gyártmányismertetőjében leírt eljárásoknak megfelelően. A DNS-szekvencia adatokat összehasonlítottuk az EMBL adatbázissal és a GenBank adatbázissal (23. változat) QUICKN programot alkalmazva, mely Lipman és Pearson algoritmusát használja [Lipman D. J. K., Pearson W. R., *Rapid and sensitive protein similarity searches*, *Science* 227, 1435-1441 (1985)], egy VAX 11/750 számítógépes VMS operációs rendszeren futtatva.

11. Genomiális klón izolálása

Lambda EMBL genomiális DNS-könyvtárat hoztunk létre EcoRI-val részlegesen emésztett Maris Piper fajtájú növény genomiális DNS-ét alkalmazva Sambrook és munkatársai (1989) által (fentebb) leírt módszereket alkalmazva. A könyvtárát úgy szűrtük, hogy hozzávetőleg $1,8 \times 10^5$ klónt szélesztettünk, két példányban plakklenyomat filtereket hoztunk létre, előhibridizáltuk, majd hibridizáltuk és mostuk lényegében úgy, ahogy a 7.5. részben leírtuk, azzal a különbséggel, hogy a próbát úgy hoztuk létre, hogy a pPMR1, pPMR2 vagy pPMR3 cDNS-klónokból egy hexaprimerrel jelöltük a DNS-inszertumot, majd PCR-rel amplifikáltuk [Gussow D., Clackson T., *Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction*, *Nucleic Acids Res* 17, 10 (1989)].

A pozitívan hibridizáló klónokat három kör hibridizációs szűrés után további elemztük DNS-analízissel és DNS-szekvenálással [Sambrook et al. (1989) fentebb], hogy meghatározzuk a promotor szekvenciahelyét.

12. In situ hibridizáció

Fertőzött és nem fertőzött gyökerekből származó szövetet gyantába ágyasztunk, metszeteket készítettünk, elő-

hibridizáltuk, majd a pPMR1, pPMR2 és pPMR3 szensz és antiszensz próbáihoz hibridizáltuk úgy, ahogy Jackson D. leírta [Molecular Plant Pathology: A practical Approach (S. J. Gurr, M. J. McPherson és D. J. Bowles, IRL Press, Oxford (1991))].

13. Transzgenikus növények előállítása és regenerálása

Transzgenikus burgonyákat állítottunk elő Hars et al. által leírt módszerekkel [Science 227, 1229–1231 (1985)] olyan GV3101 *Agrobacterium* törzsszel, mely a fenti leírás bevezetésben említett roncsoló gének közül egy megfelelő gént és ehhez fuzionált táplálójsejtspecifikus promotereket hordozó pGV3850-t tartalmazott, és a csíranövényeket regeneráltuk, majd a fonalféreggel szembeni rezisztenciára megvizsgáltuk.

2. példa: Ekvivalens gének jelenléte más növényfajokban

Egy növényfajból származó géneket időben és térben akkor is helyes módon expresszálhatjuk egy második fajban, ha a fajok eltérő növénycsaládokba tartoznak. Mivel a gyökérből fonalféregben számos különböző családba tartozó növényben hasonló a szinciciumbézés fiziológiája és patológiája valamint az életciklusuk, egy növény szinciciumbézésben expresszálódott gén helyesen fog expresszálódni akkor is, amikor azt egy eltérő növényfajba visszük be.

Ezt úgy igazoljuk, hogy ekvivalens géneket azonosítunk más növényfajokban. Dohány, paradicsom és cukorrépa genomai DNS-emésztményeket vizsgáltunk meg úgy, hogy pPMR1-hez hibridizáltuk (a 8. rész módszerét követve). Mindegyik esetben kereszthibridizálást figyeltünk meg, mely azt mutatja, hogy ezekben a növényekben ekvivalens gének vannak jelen. A pPMR1 által képviselt gén promotereit tartalmazó szerkezet tehát képes egy megfelelő fonalféreg-ellenes gén expressziójának helyes lokalizálására a haszonnövények széles körében. Ezek a kísérletek arra is módszert biztosítanak, hogy más növényfajokból származó ekvivalens géneket izoláljunk, hogy bennük egy fonalféreg-ellenes védekezési mechanizmust fejezzünk ki.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás fonalféreg (nematódák) elleni védekezésre, *azzal jellemezve*, hogy azonosítunk egy gént, amely gén promotere egy táplálkozási helyen vagy annak szomszédságában egy nematódával sikeresen megfertőzött növényben indukálódik, de nem konstitutíván, a gén promoterrégióját egy további régióval kombinál-

juk, amely további régió egy, a fonalféreg támadását megszakító terméket kódol, az így kapott szerkezettel egy növényi sejtet transzformálunk, és az így transzformált sejtéből növényeket regenerálunk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fonalféreg egy táplálkozási helyén indukálódott gént azonosítunk.

10 3. A 2. igénypont szerinti eljárás fonalféreg elleni védekezésre, *azzal jellemezve*, hogy egy cDNS-könyvtárat készítünk polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával; a könyvtárat összehasonlítjuk fertőzött és nem fertőzött növények cDNS-ével; egy, a táplálkozási helynél indukálódott gént képviselő cDNS-klónt azonosítunk, és ennek a cDNS-klónnak az alkalmazásával elkülönítjük a megfelelő genomai klónt.

15 4. Az 1., 2. vagy 3. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a további régió olyan anyagot kódol, amely a táplálkozási hely kialakulása céljából redifferenciálódó sejt elpusztítására alkalmas.

20 5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy sejtpusztítást előidéző eszközként a következők valamelyikét alkalmazzuk:

i) DNáz, RNáz vagy proteáz, toxikus fehérje vagy toxikus peptid;

25 ii) egy többgénés toxikus tünetegyüttes;

iii) a redifferenciálódott sejtek elleni antiszensz RNS.

30 6. Az 1., 2. vagy 3. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a további régió olyan terméket kódol, mely letális vagy kifejezett szubletális hatású, ha a fonalféreg elfogyasztja a terméket.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a terméket a következők valamelyike:

i) egy fonalféregre toxikus fehérje;

ii) egy, a fonalféreg táplálkozását megszakító antitest;

35 iii) egy, a fonalféregre toxikus neuropeptid.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a gyökereken cisztát képző fonalféreg ellen alkalmazzuk.

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a növény, amelyben a fonalféreggel szembeni rezisztenciát kialakítjuk, a következők valamelyike: burgonya, paradicsom, szója, cukorrépa, olajrepce, búza, zab, árpa, rizs, répa, káposztafélék, dohány.

45 10. fonalféregnek ellenálló növényi sejt, amely az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított módosított gént tartalmaz.

50 11. A 10. igénypont szerinti növényi sejt, ahol a növény a következők valamelyike: burgonya, paradicsom, szója, cukorrépa, olajrepce, búza, zab, árpa, rizs, répa, káposztafélék, dohány.