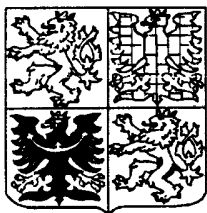


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 25.10.94
(32) 24.11.93
(31) 93/161041
(33) US
(40) 16.10.96

(21) 1317-96

(13) A3

6(51)

C 12 N 15/53
C 12 N 15/82
C 12 N 15/29
C 12 N 15/05
C 12 N 5/04
C 12 N 5/14

(71) MONSANTO COMPANY, St. Louis, MO, US;

(72) Lawrence Ellen Briskin, Creve Coeur, MO, US;
Levine Elaine Beatrice, St. Louis, MO, US;
Shah Dilipkumar Maganlal, Chesterfield, MO, US;

(54) Způsob kontroly rostlinných patogenů

(57) Rostliny lze transformovat, aby vyjadřovaly oxidázu glukózy z *Aspergillus niger*, a byly odolné proti bakteriálním a houbovým patogenům. Rostliny mohou případně vyjadřovat invertázu, aby se zvýšila dosažitelná glukóza jako substrát enzymatické aktivity.

13 17-96

Způsob kontroly rostlinných patogenů

07.V.96	03.12.88	č.j.
DOŠLO		
URAD		
PRŮMYSLOVÉHO		
VLAŠTINICTVÍ		
pro		

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu kontroly rostlinných patogenů proteinem, který se získá genetickou modifikací rostliny, aby produkovala protein, ~~rostlin užitečných při tomto způsobu~~

Dosavadní stav techniky

Je dobře známo, že enzymatický účinek oxidázy glukózy je antibakteriální. V přítomnosti kyslíku oxidáza glukózy katalyzuje oxidaci glukózy na delta-glukonolakton a peroxid vodíku. Antibakteriální působení je vyvoláno jak oxidačním potenciálem peroxidu vodíku, tak přítomností delta-glukonolaktonu, který je známý inhibitor glykosyltransferázy.

Antibakteriální účinek produktů tohoto enzymu vedlo k jeho velmi rozšířenému použití v potravinářském průmyslu, kde se považuje za GRAS sloučeninu (obecně považovaná za bezpečnou). Jako taková se oxidáza glukózy používá k zamezení bakteriálního zkažení připravených potravin. V lékařství se oxidáza glukózy používá jako enzymatický baktericid, který je součástí obvazů ran, zubních párátek, zubních vláken a miniaturních zubních kartáčků. Oxidáza glukózy byla rovněž zmíněna jako způsob kontroly zubního kazu.

Nejnovější zprávy ukázaly, že oxidáza glukózy je součástí biokontrolního mechanismu používaného *Penicillium dangerousii* ke kontrole rostlinné patogenní houby *Verticillium dahliae* (Kim aj., 1988, 1990).

Avšak použití oxidázy glukózy jako prostředku pro rostliny, aby se chránily samy proti patogenním organismům, se

považovalo za málo nadějně pro povahu enzymatického účinku. Za první je v rostlinách málo volné glukózy. Zdálo by se, že enzym bude mít nedostatek substrátu, aby produkoval dost peroxidu vodíku a nebo delta- glukonolaktonu, aby překonal útok pathogenu. Za druhé, přítomnost takového enzymu v rostlinné buňce, spotřebovávajícího glukózu a produkujícího i malé množství peroxidu vodíku, by se považovala za zhoubnou pro vitalitu buňky. Neočekávalo by se, že transgenní rostliny vyjadřující oxidázu glukózy by se vyvíjely normálně, ať již jako regenerované rostliny nebo jako následující generace.

Předmětem tohoto vynálezu je zajištění oxidázy glukózy, která by se mohla bezpečně vyjádřit v rostlinných buňkách a zabezpečit odolnost těchto buněk. Dalším předmětem tohoto vynálezu je zajištění způsobu transformace rostlin, aby vyjadřovaly oxidázu glukózy, která by se mohla bezpečně vyjádřit v rostlinách a zabezpečit odolnost těchto rostlin.

Podstata vynálezu

Překvapivě se zjistilo, že gen pro oxidázu glukózy z *Aspergillus niger* lze použít k transformaci rostlin, které se vyvíjejí normálně a odolávaly útok pathogenu. Je tedy předmětem tohoto vynálezu zajištění genetických konstruktů obsahujících gen pro *Aspergillus* oxidázu glukózy (AGO) užitečnou pro vložení do rostlinných buněk. Je jiným předmětem tohoto vynálezu zajištění transformovaných rostlin odolných proti pathogenům, obsahujících takový genetický materiál.

Mimo to se rostliny mohou transformovat, aby také vyjadřovaly jiné antifungicidní proteiny nebo insekticidní

proteiny, například s použitím genů *Bacillus thuringiensis* (BT). Příklady rostlin transformovaných aby vyjadřovaly geny *B.t.* jsou popsány v Evropské patentové přihlášce číslo 0 385 962, která odpovídá US pořadové číslo 07/476,661, podané 12. února 1990 (Fishhoff aj.), která je sem zahrnuta touto referencí. Gen *B.t.* lze zabudovat do rostliny podle tohoto vynálezu současnou transformací, postupnou transformací, nebo šlechtěním.

V souladu s jedním aspektem tohoto vynálezu se zajišťuje rekombinantní molekula DNA s dvojitou šroubovnicí obsahující v pracovní sekvenci:

a) promotor, který vyvolává v rostlinné buňce produkci RNA sekvence a

b) strukturní kodující sekvenci, která kóduje produkci AGO,

c) 3' nepřeloženou oblast, která působí v řečené rostlinné buňce to, že se polyadenylátové nukleotidy připojí k 3' konci RNA sekvence.

V souladu s jiným aspektem tohoto vynálezu se zajišťuje způsob produkce geneticky transformovaných rostlin, které vyjadřují antipathogenní množství AGO zahrnující kroky:

a) vložení do genomu rostlinné buňky rekombinantní molekulu DNA s dvojitou šroubovnicí obsahující:

i) promotor, který vyvolává v rostlinné buňce produkci RNA sekvence,

ii) strukturní kodující sekvenci, která kóduje produkci AGO,

iii) 3' nepřeloženou oblast, která působí v rostlinné buňce to, že se polyadenylátové nukleotidy připojí k 3' kon-

ci RNA sekvence,

b) získání transformovaných rostlinných buněk a

c) regeneraci geneticky transformovaných rostlin, které vyjadřují antipathogenní množství AGO z transformovaných rostlinných buněk.

Také se zajišťují v souladu s jiným aspektem tohoto vynálezu transformované rostliny, které obsahují DNA mající shora zmíněné prvky (i), (ii) a (iii).

Tak jak se zde používá, výraz "Aspergillus oxidáza glukózy" nebo "AGO" se používá k označení oxidázy glukózy přirozeně produkované *Aspergillus* sp. nebo mající homologii alespoň 80 %, výhodně alespoň 90 % s takovým enzymem, například enzymem kódovaným SEQ ID NO: 1.

Tak jak se zde používá, výraz "kontrola mikrobiálního poškození" nebo "odolnost proti patogenům" se používá k označení vlivu na redukci poškození úrody v důsledku infekce bakteriálními nebo houbovými patogeny.

Tak jak je zde používán, výraz "strukturní kodující sekvence" znamená DNA sekvenci, která kóduje polypeptid, který může rovněž udělat buňka po transkripci DNA na mRNA s následující translací na žádoucí polypeptid.

Tak jak je zde používán, výraz "stanoviště rostliny" znamená oblast bezprostředně obklopující rostlinu včetně rostliny a oblasti jejích kořenů.

Příkladná provedení vynálezu

Jedno provedení tohoto vynálezu zahrnuje protein izolovaný z *Aspergillus niger*. Tento protein, označený AGO, se čistil do homogenity. Inhibuje růst agronomicky důležitých

houbových patogenů včetně *Verticillium dahliae*, jednoho z nejrozšířenějších a nejškodlivějších houbových patogenů, působícího nemoci mnoha rostlin, *Phytophora infestans* (Pi), patogenu působícímu pozdní hnití brambor a rajčat, *Botrytis cinerea* (Bc) zdroji šedé plísně mnoha rostlin a zelenin, *Septoria nodorum* (Sn) příčině skvrnitosti pšenice, *Pseudocercospora herpotrichoides* (Ph) příčině očkovitosti pšenice, *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (Ggt) příčině hnití zelenin, v tak malém množství, jako je 50 ng, za pokusných podmínek. Také se zjistilo, že inhibuje *Erwinia carotovora*, příčinu měkké hniloby brambor, posklizňové nemoci brambor. Očekává se, že je schopný kontrolovat mnohé jiné patogenní organismy rostlin, což je založeno na produktech jeho enzymatické aktivity delta- glukonolaktonu a peroxidu vodíku. Oba tyto koproducty jsou toxické pro takové organismy.

Mnohé druhy rostlin se mohou chránit způsobem podle tohoto vynálezu. Například mnohé ovoce a zeleniny, jako jsou maliny, brambory se mohou chránit před rostlinnými patogeny pomocí těchto způsobů. Různé druhy *Phytophora* jsou patogenní pro mnohé jiné rostliny, jako jsou ovocné stromy a trávnik, a tedy tyto rostliny se také mohou chránit pomocí způsobů podle tohoto vynálezu. Dále rostliny pšenice a ječmene se mohou chránit před Ggt, Sn a Ph tímto způsobem.

Jak se poznamenalo shora, antibakteriální proteiny podle tohoto vynálezu se mohou použít v kombinaci s jinými antifungicidními proteiny, aby se dosáhlo široké spektrum aktivity, například kontrola dalších patogenů a nebo aby se dosáhly mnohonásobné módy akce pro inhibici stejných houbo-

vých patogenů. Zdroji takových jiných antifungicidních proteinů by mohly být mikrobiální, jako jsou proteiny podle tohoto vynálezu, nebo to mohou být rostliny. Řada takových antifungicidních genů je uvedena v literatuře.

Ačkoliv AGO bude chránit rostliny proti útoku patogenů i při přirozeně se vyskytujících hladinách glukózy, může být žádoucí zajistit invertázu, která by působila hydrolýzu sacharózy a tak uvolňovala další glukózu, na kterou by AGO mohl působit. Invertáza bude s výhodou invertáza z buněčných stěn, jako z kvasnic (EP 0 442 592, Willmitzer aj., 1991, také AU 70898/91) nebo vakuolární enzym jako je z rajčat či jiných rostlin. V těchto případech se mohou použít přirozené signální sekvence, avšak může být lepší, aby invertáza byla do doby potřeby vázaná v mezibuněčném prostoru, nebo nebyla produkována před svou potřebou. Prvou alternativu lze dosáhnout použitím signální sekvence, která zaměří enzym do mezibuněčného prostoru. Jedním takovým signálem je signál inhibitoru proteázy brambor (Keil aj., 1986, Nelson aj., 1980). Promotor, který je aktivní pouze jako důsledek infekce patogeny, by byl užitečný při omezení vyjádření invertázy na její opravdovou potřebu, aby produkovala glukózu jako substrát pro AGO.

Během skladování, kdy infekce *Erwinii* může způsobit ztrátu celého skladu, hlízy brambor budou přirozeně obsahovat glukózu z rozkládajícího se škrobu. Tedy vložení genu pro invertázu není žádoucí nebo nutné pro ochranu proti ačkolivké hnilobě.

Testy biologické účinnosti in vitro

Protiplísňové testy

Oxidáza glukózy z *Aspergillus niger* se může dostat od Sigma Chemical Company, St. Louis (katalogové číslo G-7141). Používala se k testování účinnosti in vitro proti řadě organismů.

Testy proti Pi a Bc se prováděly v mediu číslo 303 připraveném následovně: Jeden litr obsahuje 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl, 1 g $CaCO_3$, 1 ml $ZnSO_4 \cdot 7HO$ zásobního roztoku 1 mg/ml, 1 ml $FeSO_4 \cdot 7HO$ zásobního roztoku 1 mg/ml, 0,5 ml $FeEDTA$ zásobního roztoku 100 mM, 20 g malt-rin M-100, 20 g kaseinu, 5 g výtazku z kvasnic, 5 g glukózy, 3,02 g Pipes 10 mM. pH se upravilo na 6,5 a sterilovalo se filtrací. Testy proti Ph se prováděly v CDAA.1% mediu, připraveném následovně: 35 g/l Difco Czapek Dox vývar, 1 g/l prolin, 500 mg/l asparagin, 500 mg/l cystein a 1 g/l agar se autoklavují 23 minut a přidají se vitaminy sterilované filtrací (1 ppm thiamin a 1 ppm biotin).

Bc a Pi se testovaly v kapalném stavu na deskách s 96 jamkami. Bc se použilo při $5 \cdot 10^2$ sporách na jamku a nechalo se inkubovat při 20 °C 24-48 hodin. Pi se vysévalo při $5 \cdot 10^3$ sporangíích na jamku a nechalo se inkubovat při 18 °C 24-48 hodin. Růst se sledoval měřením OD při 595 nm. Růst Pi byl inhibován z 90 % při koncentracích tak nízkých jako je $3 \cdot 10^{-5}$ IU/mikrolitr. Růst Bc byl inhibován z 95 % při koncentraci jako je 0.001 IU/mikrolitr.

Aktivita proti *Gaeumannomyces* se hodnotila na deskách pevného agaru. Kousky agaru asi 0,5 cm², podporující silný růst houby, se daly do středu PDA desky poloviční síly

a nechaly se růst několik dní při 22 °C. 1 cm za vedoucí hranou růstu se vyjmul asepticky 0,5 cm² kousek agaru sterilním korkovrtem. Přímo do těchto jamek se dal sterilní AGO zásobní roztok. Zřetelná zóna inhibice se pozorovala při množstvích tak nízkých jako je 0,02 IU/jamku.

Ph se testoval na deskách s 96 jamkami. 14 dní stará kultura *Pseudocercospora herpotrichoides* var *tritici* na vodném agaru se použila k získání suspenze spór. Deska se zavodnila 5-10 ml CDAA.1% mediem a spóry se zamíchaly do kapalného media jemným zakroužením. Koncentrovaná suspenze spór se odtáhla pipetou a přidala se k celkovému objemu CDAA potřebnému pro test s úpravou koncentrace spór na 100000 spór/ml. Inkubovalo se při 24 °C v temnu.

Suspenze spór se rozdělila po 50 mikrolitrech na jamku na deskách s 96 mikrotitračními jamkami. Tyto desky se daly do inkubátoru (10 hodin/ denního světla při 12 °C) na 24 hodin před aplikací vzorku. 50 mikrolitrový vzorek se přidal k 50 mikrolitrům inokula (připraveného 24 hodin předem) s celkovým objemem jamky 0,100 ml/ošetřená jamka/opakované ošetření. Zkušební desky se inkubovaly 48 hodin a výsledky se stanovily odečtením optické hustoty (OD) pomocí BioRad čítačem mikrotitračních desek model 3550 při jediné vlnové délce 595 nm. OD stanovení se provedlo v čase nula (t_0), který se dělal bezprostředně po aplikaci vzorku a OD stanovení se provedlo v čase 48 hodin po aplikaci vzorku (t_{48}). Růst hub se stanovil z rozdílů OD mezi t_0 a t_{48} násobeného výpočetní hodnotou pro biomasu houby. (Výpočetní hodnota pro biomasu houby je vztah mezi růstem hub a optickou hustotou a stanovil se ve zvláštních pokusech. Vztah mezi

růstem hub a optickou hustotou se stanovil růstem hub na deskách s 96 mikrotitračními jamkami a sklizní mycelia během času při intervalech absorbance asi 0,1 OD. (Výpočetní hodnota vychází z lineární závislosti mezi biomasou houby a OD pro specifickou houbu. Hodnota jejího sklonu se dostane z lineární závislosti. Výpočetní hodnota pro Ph je 4,91). Pak se stanovilo % inhibice z rozdílů mezi biomasou ošetřených vzorků a biomasou kontrol. AGO vykazoval 60 % inhibici Ph při $1,7 \cdot 10^{-4}$ IU/mikrolitr.

Testy proti Sn se prováděly podstatně podobně jako proti Ph, s výjimkou preparace suspenze spór. Sedm dní stará kultura *Septoria nodorum* na YMA agaru se použila k získání suspenze spór. Malé množství (pod 1 ml) CDAA media se nakapalo na plochu kultury s hmotou růžových spór vycházejících z pyknidia. Spóry se smíchaly s CDAA mediem opakovaným nasávaním a vypouštěním z pipety. Koncentrovaná suspenze spór se přidala k celkovému objemu CDAA potřebnému pro test s úpravou koncentrace spór na 50000 spór/ml. Výpočetní hodnota pro Sn je 0,508. AGO vykazoval 60 % inhibici Sn při $1,7 \cdot 10^{-4}$ IU/mikrolitr.

Bakteriální test

Kultura bakterií *Erwinia carotovora* se udržovala rozptřením na PDA desky a inkubovala se při 24 °C v temnu. Pro preparaci kapalného inokula se smyčka aktivně rostoucích bakterií (stará 5-9 dní) přidala do 50 ml PD výluhu síly 1/4 v 125 ml Erlenmayerové baňce. Baňka se dala do třepacího inkubátoru (130 otáček za minutu) při 24 °C v temnu. Po 24 hodinách se bakterie peletovaly, znovu suspendovaly v sterilní deionizované vodě a tři nebo čtyři 0.100 ml podíly se

daly do jamek na deskách s 96 mikrotitračními jamkami. Čítač mikrotitračních desek se nastavil na 595 nm a stanovila se průměrná optická hustota. Číslo této absorbance optické hustoty (ABS) se použilo v následujícím vzorci pro výpočet jednotek tvořících kolonii (CFU) obsažených ve výluhu.

$$\text{CFU} = 3 \cdot 10^6 + 3 \cdot 10^6 \cdot \text{ABS} + 5 \cdot 10^8 \cdot \text{ABS}^2$$

Výluh se nastavil pro použití na 10 CFU.

AGO úplně kontroloval růst *Erwinia carotovora* při koncentracích tak nízkých jako je $3 \cdot 10^{-5}$ IU/mikrolitr.

Identifikace enzymu

Pro zjištění produkce proteinu lze navrhnout řadu metod v heterologní soustavě, jakou jsou rostlinné buňky. Lze použít Western skvrnovou analýzu, aby se protein zjistil imunologicky, nebo lze použít enzymatické nebo biologické testy, aby se zjistila aktivita proteinu.

Enzymatický test oxidázy glukózy

Aby se zjistila aktivita GO, použil se kontinuální spektrofotometrický test (Frederick aj., 1990). GO *Aspergillus niger* (Sigma) se použil jako pozitivní kontrola. Reakční směs se skládala z 0,020 mg/ml peroxidázy z ředkve (Sigma), 0,32 mM Triton X-100 stabilizovaného o-dianisidinem (Sigma) a 0,1 M glukózy v 75 mM ústoji fosforečnanu sodného (pH 5,0). K tomu se přidalo 0,100 ml různých koncentrací GO *Aspergillus niger* pro kontrolu reakcí 0,100 ml vzorku odebraného z heterologního zdroje. Test se prováděl při pokojové teplotě a zvýšení absorbance se sledovalo při 460 nm.

Jiný test na oxidázu glukózy používající reagent 4-aminoantipyrin (4-AAP) se optimalizoval pro použití. Je za-

ložen na Gallo, 1981. 5X 4-AAP reagent se připravil v celkovém objemu 10 ml s 0,68 g KH_2PO_4 , 8,3 mg 4-AAP (0.82 mM), 0,025 ml Triton X-100, 65,8 mg krystalického fenolu a 1000 jednotek peroxidázy z ředkve. pH se upravilo na 5,0 s KOH. Test se prováděl smícháním 0,200 ml tohoto 4-AAP reagentu s 0,005 ml 1 mM FAD, 0,050 ml 1 M glukózy a zkoušeného vzorku (až 0,750 ml). Výsledek se odečítal při OD 508.

Test biologické aktivity oxidázy glukózy

4-6 dní starý roub Ggt houby se přenesl na čerstvé desky (Difco) agaru bramborové dextrózy čtvrtinové síly. Houba rostla čtyři dny při 22 °C, dokud růstový kruh nebyl asi 2,5 cm. Pomocí sterilního korkovrtu se udělaly v agaru jamky 1 cm vně růstového kruhu a do jamek se dalo 0,100 ml ústoje nebo vzorku z heterologní soustavy. Houba rostla při pokojové teplotě 24 hodin a pak se zjistila inhibice růstu.

Imunologický test oxidázy glukózy

Polyklonální antičástice pro oxidázu glukózy produkovanou *Aspergillus niger* jsou dostupné komerčně z mnoha zdrojů, například Rockland, Inc., Gilbertsville, Pensylvánie.

GENETICKÁ TRANSFORMACE

Z *Aspergillus niger* se isolovala úplná DNA (ATCC 9029) a použila se pro izolaci PCR genu pro oxidázu glukózy. PCR primery byly založeny na publikované sekvenci (Frederick aj., Kriechbaum aj.) a byly navrženy pro izolaci úplné sekvence genu včetně signální sekvence. Mimo to se pro usnadnění zabudování tohoto genu do vektorů vhodných pro vyjádření v heterologních bakteriálních, bakulovirových nebo rostlinných soustavách 5'PCR primer (SEQ ID NO: 3) zavedl XbaI a BglII místa omezující endonukleázu po proudu od ATG počát-

ku translaci genu. 3'PCR primer (SEQ ID NO: 4) zavedl BamHI a KpnI místa omezující endonukleázu ihned za končící kodon. Vzniklý PCR fragment se klonoval do pUC118 jako XbaI/KpnI fragment, aby vytvořil pMON22514 a byl úplně sekvencován.

Konstrukce rostlinného genu

Vyjádření rostlinného genu existujícího v dvojité formě DNA vyžaduje transkripci matricové RNA (mRNA) z jedné šroubovnice DNA enzymem RNA polymerázou a následující zpracování primárního mRNA transkriptu do jádra. Toto zpracování vyžaduje 3' nepřeloženou oblast, která aduje polyadenylátové nukleotidy na 3' konec RNA řetězce. Transkripce DNA do mRNA se reguluje oblastí DNA obvykle označovanou jako "promotor". Tato promotorová oblast obsahuje sekvenci bází, která signalizuje RNA polymeráze, aby se připojila k DNA a iniciovala transkripci mRNA pomocí jedné ze šroubovnic DNA jako formy, aby vytvořila odpovídající pás RNA.

V literatuře byla popsána řada promotorů, které jsou aktivní v rostlinných buňkách. Tyto zahrnují promotory nopalín syntházu (NOS) a oktopin syntházu (OCS) (které se přenášejí na tumory působící plasmidy *Agrobacterium tumefaciens*), promotory 19S a 35S mosaikového viru kvěťáku (CaMV), promotor 35S mosaikového Figwort viru (FMV) a světlem buzený promotor z malé části ribuloso 1,5-bis-fosfát karboxylázy (ssRUBISCO, velmi hojný rostlinný polypeptid). Všechny tyto promotory se také použily k vytvoření různých typů DNA konstrukcí, které se vyjádřily v rostlinách. US patent číslo 5,034,322 (Fraley aj, 1991), který je sem zahrnut touto referencí, popisuje takové použití.

Jsou známy promotory, které omezí vyjádření na jisté

části rostlin, nebo na odpověď na zvláštní stimuly. Například promotory specifické pro hlízy brambor, jako jsou palatinové promotory, nebo promotory pro velké či malé podjednotky ADP pyrofosforylázy glukózy, by se mohly použít k dosažení vyjádření primárně v hlízách a tak v kombinaci s AGO zajistit resistenci proti útokům na hlízy, například *Erwinii*. Promotor specifický pro ovoce by byl žádoucí pro zajištění resistance proti *Botrytis* u malin nebo hroznů. Promotor specifický pro kořeny by byl žádoucí pro vyjádření AGO v pšenici a ječmeni pro zajištění resistance proti Ggt. Odborník bude vědět o mnoha takových promotorech specifických pro rostliny, které by byly užitečné podle tohoto vynálezu.

Alternativně lze promotory použité v dvojité šroubovnici DNA molekuly vybrat tak, aby se dosáhlo specifického vyjádření AGO jako odpověď na infekci houbami. Infekce rostlin patogeny hub spouští indukci řady proteinů zvaných obranných nebo patogen obranných (PR) (Bowles, Bol aj., Linthorst). Takové obranné nebo PR geny mohou kodovat enzymy fenylpropanoidového metabolismu (jako je lyáza fenylalanin amonia, chalkonová syntáza, coAligáza 4-kumarátu, 4-hydroxyláza kumarové kyseliny), proteiny modifikující stěny buněk rostlin (jako jsou glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin, proteiny bohaté na glycin, peroxidázy), enzymy (jako jsou chitinázy a glutanázy), které degradují stěnu houby, proteiny podobné thamatinu nebo proteiny s dosud neznámou funkcí. Obranné nebo PR geny se isolovaly a charakterizovaly z řady druhů rostlin. Promotory těchto genů se mohou použít pro vyjádření AGO v transgenních rostlinách, když jsou napadeny patogeny, zejména houbovým patogenem, jako je *Pi*. Takové

promotory lze odvodit od obranných nebo PR genů izolovaných ze samotných brambor (Fritzmeier aj., Cuypers aj., Longeman aj., Matton a Brisson, Taylor aj., Matton aj., Schroder aj.). Aby se umístil AGO gen pod kontrolu promotoru indukovaného infekcí *Phytophora infestans*, lze dát přednost promotoru popsanému Taylorem aj. (1990).

Vybraný daný promotor by měl být schopen působit dostatečné vyjádření sekvence kodující enzym, aby vedly k produkci účinného množství AGO.

Promotory použité v DNA konstrukcích (například chimérní geny rostlin) podle tohoto vynálezu lze modifikovat, pokud je to žádáno, aby se ovlivnily jejich kontrolní charakteristiky. Například promotor CaMV35S lze spojit s částí genu ssRUBISCO, která potlačuje vyjádření ssRUBISCO při nepřítomnosti světla, aby vznikl promotor, který je aktivní v listech, ale ne v kořenech. Vzniklý chimérní promotor lze použít, jak je zde popsáno.

Pro účely tohoto popisu fráze "CaMV35S" promotor tedy zahrnuje variace CaMV35S promotoru, například promotory získané vázáním s operátorovými oblastmi, náhodnou a kontrolovanou mutagenezí, atd.. Promotory lze dále měnit, aby obsahovaly mnohonásobné "zvýrazňovací sekvence", aby podporovaly zvýšené vyjádření genu. Příklady takových zvýrazňovacích sekvencí byly uvedeny Kay aj.

Zvýrazněný CaMV 35S promotor lze konstruovat následovně. Fragment CaMV 35S promotoru prostírající se mezi polonukleotidy -343 a +9 se nejprve konstruuje v pUC13 (Odell aj.). Tento segment obsahuje oblast identifikovanou jako nutnou pro maximální vyjádření CaMV 35S promotoru. Byl vyříznut jako Cla-

I- HindIII fragment, otupen na konci DNA polymerázou (ClaI-fragment) a vložen na HincII místo pUC18. Oblast po proudu 35S promotoru se vyřizla z tohoto plasmidu (prostírajícího se mezi polohou -343 a -90) a vložila se do stejného plasmidu mezi místa HindIII a PstI. Zvýrazněný CaMV 35S promotor dále CaMV E35S) tedy obsahuje duplikaci sekvence mezi -343 a -90 (Kay aj.).

RNA produkovaná DNA konstruktem podle tohoto vynálezu také obsahuje 5' nepřeloženou vedoucí sekvenci. Tuto sekvenci lze získat z promotoru vybraného k vyjádření genu a lze ji specificky modifikovat, aby se zvýšila translace mRNA. 5' nepřeložené oblasti lze také získat z virových RNA, z vhodných eukaryotních genů, nebo ze syntetických sekvencí genu. Tento vynález není omezen na konstrukce, kde nepřeložená oblast je odvozena z 5' nepřeložené oblasti, která provází sekvenci promotoru. Nepřeloženou vedoucí sekvenci lze spíše odvodit z nepřibuzného promotoru nebo kodující sekvence. Například protein tepelného šoku petunií 70 (Hsp70) obsahuje takovou vedoucí oblast (Winter).

Jak je shora poznamenáno, 3' nepřeložená oblast chimérních rostlinných genů podle tohoto vynálezu obsahuje polyadenylační signál, jehož funkcí v rostlinách je působit adici adenylových nukleotidů na 3' konec RNA. Příklady preferovaných 3' oblastí jsou (1) 3' přepsané, nepřeložené oblasti obsahující polyadenylační signál genů tumory působících plasmidů (Ti) *Agrobacterium*, jako je gen nopalín syntázy (NOS), a (2) rostlinné geny, jako jsou geny zásobních proteinů soji a fazolový ssRUBISCO E9 gen (Fischhoff aj.).

Transformace a vyjádření v rostlině

Chimérní rostlinný gen obsahující strukturní kodující sekvenci podle tohoto vynálezu lze vložit do genomu rostliny každým vhodným způsobem. Vhodné transformační vektory zahrnují ty, které jsou odvozeny z Ti plasmidu *Agrobacterium tumefaciens* jakož i ty, které popsali například Herrera-Estrella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) a EPO publikace 0 120 516 (Schilperoort aj.). Navíc lze u rostlinných transformačních vektorů odvozených z Ti nebo zavádějících do kořenů (Ri) plasmidů *Agrobacterium* použít alternativní způsoby pro vložení DNA konstruktů podle tohoto vynálezu do rostlinných buněk. Takové způsoby mohou zahrnovat například použití liposomů, elektroporace, chemikálií, které zvyšují přijímání DNA, volné dodání DNA bombardováním mikroprojektily a transformaci viry nebo pylem.

Rostliny, které lze chránit podle tohoto vynálezu zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, brambory, rajčata, pšenici, kukuřici, maliny, hrozny a různé okrasné rostliny. Metody tkáňové kultury a regenerace rostlin jsou dostupné pro všechny tyto typy rostlin.

Přechodné vyjádření palatinu v buňkách tabáku

Zvláště užitečný plasmidový kazetový vektor pro transformaci dvojděložných rostlin je pMON999. Kazeta exprese pMON 999 se skládá z CaMV E35S promotoru a 3' konce zahrnující polyadenylátové signály z genu NOS. pMON999 obsahuje BglII, KpnI a EcoRI místa pro vložení kodující sekvence a NotI a NotII místa lemující kazetu pro vyjádření genu.

BglII/KpnI fragment pMON22514 obsahující AGO se vložil do pMON999, aby se vytvořil pMON22515. pMON22515 se elektro-

poroval do protoplastů tabáku. Vyjádření oxidázy glukózy transformovanými buňkami tabáku potvrdila Western skvrnová analýza jakož i enzymatické testy.

Stálá transformace dvojděložných

Nosný vektor pro AGO se vytvořil vyříznutím oblasti kodující AGO jako BamHI/BglII fragment pMON22515. Ten se pak dal do vektoru založeného na pUC a vzniklý plasmid pMON22579 obsahuje FMV promotor, oblast kodující AGO a 3' konec včetně polyadenylátových signálů z genu NOS. NotI/NotI fragment z tohoto vektoru obsahující FMV promotor, oblast kodující AGO a 3' konec včetně polyadenylátových signálů se přenesl do NotI omezující oblasti pMON17227 (WO/0449, Barry aj.), aby se získal konečný Ti vektor pMON22587.

Jak se diskutovalo shora, Gen AGO se může také vyjádřit ve specifických částech rostlin pomocí specifických tkáňových promotorů. Promotor pro palatin se vyjádřuje primárně v hlízách brambor. Fragment KpnI/XbaI obsahující oblast kodující AGO se vyřízl z pMON22514 dal se do vektoru založeného na pUC obsahujícího 1.0 promotor palatinu (Bevan aj., 1986) a 3' konce zahrnující polyadenylátové signály z genu NOS, aby se vytvořil pMON22516. Fragment NotI pMON22516 obsahující promotor palatinu, oblast kodující AGO a 3' konec NOS včetně polyadenylátových signálů se pak přenesl do NotI omezující oblasti pMON17227, jak bylo popsáno shora, aby se získal plasmidový Ti vektor pMON22517.

Tyto vektory lze vložit do odzbrojeného *Agrobacterium* ABI a použít k transformaci brambor, rajčat nebo jiných částí rostlin v tkáňové kultuře. Po selekci na kanamycin nebo glyfosátovou odolnost a regeneraci rostliny, lze získat celé

rostliny vyjadřující gen oxidázy glukózy. Vyjádření oxidázy glukózy transformovanými buňkami tabáku lze potvrdit Western skvrnovou analýzou, enzymatickými testy nebo biotesty.

Vyjádření AGO v transformovaných rostlinách brambor

Z hlíz brambor transformovaných plasmidovým Ti vektorem pMON22517 se extrahoval protein a zkoušel se na přítomnost oxidázy glukózy Western skvrnovou analýzou. Zjistily se vysoké hladiny vyjádření oxidázy glukózy v některých rostlinách. Tyto hladiny vyjádření se potvrdily enzymatickými testy pomocí soustavy 4-aminoantipyrinu. Celkový protein se extrahoval z řady těchto hlíz rozemletím v 25 mM ústoji fosforečnanu sodného pH 7,0 + 5mM EDTA + 100 mM KCl. Protein se koncentroval a promyl 12,5 mM ústojem fosforečnanu sodného pH 7,0.

Protein extrahovaný z hlíz se testoval s *Phytophthora infestans* na deskách s 96 mikrotitračními jamkami v 12,5 mM ústoji fosforečnanu sodného pH 7,0. Výsledek je ukázán v Tabulce 1. Při nejvyšší hladině zjištěného proteinu, 21,2 mg/ml, Pi spóry buď zůstávaly neplodné, nebo růst z těchto spór byl silně zmrzačen ve srovnání s prázdným vektorem (pMON17227) nebo s ústojnými extrakty z kontrolních rostlin.

Tabulka 1

<u>Ošetření</u>	<u>Inhibice hub*</u>
Kontrolní ústoj	0
Kontrolní prázdný vektor	2
pMON22517, linie 9	3
pMON22517, linie 30	3

* Stupnice: 0 = bez inhibice, 1 = lehká inhibice, 2 = mírná inhibice, 3 = silná inhibice.

Listy rostlin brambor transformovaných plasmidovým Ti vektorem pMON22587 se zkoušely na přítomnost AGO enzymatickými testy. Výsledek je ukázán v Tabulce 2. Jako shora, rostliny brambor transformované pMON17227 se použily jako kontrolní rostliny s prázdným vektorem.

Tabulka 2

Linie číslo	Vyjádření oxidázy glukózy		Ekvivalent
	úroveň ^a	aktivity ^b	k ^c
	%	(U/10 ng X 10 ⁻⁴)	(U/gFW)
Rus. Bur.	0	0	0
22587-2	0.075	72.2	7.22
22587-3	0.150	126.4	12.64
22587-4	0.007	6.0	0.6
22587-12	0.125	88.2	8.82
22587-31	0.350	140.4	14.04
22587-32	0.350	121.0	12.10
22587-33	0.450	181.8	18.18
22587-34	0.003	1.2	0.12

^a Hladina vyjádření je ukázána jako procento oxidázy glukózy v celkovém extrahovatelném proteinu.

^b Aktivita oxidázy glukózy v extraktu se stanovila testem enzymatické aktivity a vypočetla se jako jednotky enzymatické aktivity v celkovém proteinu.

^c Jednotky oxidázy glukózy na gram čerstvé hmotnosti tkáně listů (U/gFW) se vypočetly z aktivity v celkovém proteinu pomocí konversního faktoru 0,010 mg celkového proteinu

na gram čerstvé hmotnosti tkáně listů.

Listy rostlin brambor transformovaných plasmidovým Ti vektorem pMON22587 se zkoušely na úroveň H_2O_2 srážením oxidu titaničitého. Bylo zjištěno, že ve dvou liniích listy měly úroveň H_2O_2 dva až čtyřikrát vyšší než listy netransformovaných kontrolních rostlin.

Brambory odolné nemocím

Hlízy vyjadřující AGO se testovaly proti e *Erwinia carotovora* v deskovém testu hlíz. Hlízy z 34 linií transformovaných pMON22517 se testovaly na odolnost proti měkké hnilobě. Linie se také testovaly na hladiny vyjádření Western skvrnovou analýzou. Hlízy se povrchově sterilovaly podle metody Yanga aj. (1989). Dvě nebo tři hlízy na linii se asepticky rozřezaly na plátky 7-10 mm tlusté, což dalo šest až dvanáct plátků na linii. Plátky se daly na zvlhčený sterilní filtrační papír Whatman číslo 1 v Petriho misce. Střed každého plátku se očkoval 50000 CFU bakterií v 0,010 ml. Misky se udržovaly v prostředí vysoké vlhkosti tři dny při 23 °C. Hodnocení nemoci zahrnovalo měření délky, poloměru a hloubky vzniklých poškození. Zředění macerovaných tkání z poškození se použily ke stanovení konečného počtu bakterií na poškození. Výsledky těchto stanovení jsou ukázány v Tabulce 3. U linií, které se zdály nejvíce chráněné, všechny měřené parametry byly lepší než u prázdného vektoru a ústojných kontrolních hlíz. Hlízy, u kterých se zjistila nejvyšší hladina vyjádření AGO měly obvykle nejnižší hladinu bakterií v poškozeních.

Tabulka 3

Linie číslo	<u>Vyjádření^b</u>	úroveň	CFU ^a *10 ⁹
Kontrolní ústoj		nulová	16.76
Prázdný vektor		nulová	14.32
22517-10		nulová	20.7
22517-24		nulová	20.09
22517-13		nulová	16.3
22517-12		nulová	19.26
22517-9		nízká	9.34
22517-28		nízká	13.56
22517-33		nízká	9.57
22517-14		nízká	8.22
22517-17		nízká	8.36
22517-19		nízká	8.37
22517-32		nízká	7.17
22517-20		nízká	7.4
22517-21		nízká	6.25
22517-34		nízká	4.44
22517-11		nízká	3.06
22517-8		nízká	1.5
22517-7		střední	12.88
22517-31		střední	12.06
22517-1		střední	7.54
22517-15		střední	6.7
22517-25		střední	12.25
22517-35		střední	6.81
22517-2		střední	3.52

22517-3	střední	1.26
22517-5	střední	1.4
22517-6	vysoká	15.74
22517-18	vysoká	2.675
22517-26	vysoká	4.55
22517-29	vysoká	4.35
22517-4	vysoká	4.2
22517-30	vysoká	3.92
22517-16	vysoká	1.12
22517-23	vysoká	2.67
22517-36	vysoká	0.855

^a CFU = Jednotky tvořících kolonii

^b Hladiny vyjádření se stanovily Western skvrnovou analýzou.

Listy rostlin brambor transformovaných pMON22587 a vyjadřující AGO se zkoušely na odolnost proti Pi. Zcela rozvinuté lístky (asi 20 cm²) se očkovaly přidáním kapiček 0,100 ml suspenze sporangii *Phytophora infestans* do středu listu mimo osu. Inokulum mělo hustotu 10⁵-10⁶ sporangii na ml, sebraných z 2-3 týdnů starých desek obsahujících LB-V8 medium. Očkované lístky se udržovaly v Nunc Bio-Assay miskách (243*243*18 cm) s vlhkostí danou vlhkým filtračním papírem na dně a inkubovaly se v růstových komorách asi při 19 °C s 16 hodinovou fotoperiodou. Pozoroval se rozvoj symptomů a nakažené oblasti lístků se měřily překrytím každého lístku transparentní mřížkou s oku 5*5 mm. Pro každou linii lístků se vypočetly průměrná nakažená oblast a standardní odchylka.

Transgenní linie vyjadřující AGO ukazovaly významnou kontrolu symptomů působených infekcí *Phytophora infestans* na

lístcích. Výsledky dvou linií jsou ukázány v Tabulce 4. Redukce symptomů byla 47 a 57 % ve srovnání s kontrolami (jak netransformovaných tak transformovaných prázdným vektorem).

Tabulka 4

Linie číslo	Nakažená oblast ^a			
	3 dpo ^b	4 dpo	5 dpo	6dpo
Russet Bur.	1.2	2.1	4.2	7.1
17227-1 ^c	1.6	2.7	4.7	8.7
22587-3 ^d	0.4	0.8	1.1	3.0
22587-12 ^d	0.5	1.3	2.3	3.7

^a Nakažená oblast je ukázána jako průměr pěti listů.

^b Dny po očkování

^c Kontrolní linie transformovaná prázdným vektorem.

^d Transgenní linie vyjadřující oxidázu glukózy.

Stálá transformace jednoděložných

Pro transformaci jednoděložných se vektor konstruoval s AGO a intronem zvláště užitečným pro zvýšení frekvence získání transformovaných rostlin, které vyjadřují žádaný protein na vysoké úrovni. Použil se intron hsp70, popsany v EP 602 193 (ekvivalent US pořadové číslo 08/181,634, Brown aj., která je sem zahrnuta touto referencí). pMON19477 tam popsany se vyřízl a pak se klonoval 800 bp BglII- BamHI fragment obsahující intron hsp70 do jediného místa BglII v pMON-22515. To dalo pMON22623.

pMON22623 se dal do buněk pšenice bombardováním mikroprojektily podle známých metod (Vasil aj.).

Když se získají transformované rostliny, jejich odolnost vůči plísním, zejména proti Ggt se stanoví známými me-

todami.

Všechny publikace a patenty zmíněné v tomto popisu jsou sem zahrnuty referencí, jako kdyby každá individuální publikace či patent byly specificky a individuálně prohlášený jako zahrnuté referencí.

Z předešlého bude zřejmé, že tento vynález je dobře přizpůsoben k dosažení všech cílů a předmětů shora vytyčených spolu s výhodami, které jsou nasnadě a které jsou vynálezu vlastní.

Rozumí se, že jisté rysy a podkombinace jsou užitečné a lze je použít bez odkazu na jiné rysy a podkombinace. To se vynálezem zamýšlí a je v rozsahu vynálezu.

Protože jsou možná mnohá provedení tohoto vynálezu, aniž by se opustil jeho rozsah, rozumí se, že všechno se má interpretovat v ilustrativním a nikoliv omezujícím smyslu.

REFERENCE

- Barry, G.F., G. Kishore, and S.R. Padgette. "Glyphosate Tolerant 5-Enol-pyruvylshikimate-3-phosphate-Synthases." PCT Appl. WO 92/04449, 1991.
- Bevan, M. et al. Nature, 304:184, 1983.
- Bevan, M. et al. Nucleic Acid Research, 14:4625, 1986.
- Bol, J. et al. Ann Rev of Phytopathol., 28:113-138, 1990.
- Bowles, D. Ann Rev of Biochem., 59:873-907, 1990.
- Cuyper, B. et al. Mol Plant-Microbe Interactions, 1:157-160, 1988.
- Fischhoff, D.A. and Perlak, F.J. "Synthetic plant genes and method for preparation." European Patent Application, Publication Number 0 385 962, 1990.
- Frederick, K. et al. J. Biol. Chem., 265:3793-3802.
- Fritzemeier, K. et al. Plant Physiol, 85:34-41, 1987.
- Gallo. Methods in Enzymology, 71:665-668, 1981.
- Herrera-Estrella, L. et al. Nature, 303:20-9, 1983.
- Kay, R. et al., Science, 236:1299-1302, 1987.
- Keil, M. et al. Nucleic Acids Res., 14:5641 - 5650, 1986.
- Klee, H. J. et al. Bio/Technology, 3:637-642, 1985.
- Kim, K. et al. Phytopathology, 78:488-492, 1988.
- Kim, K. et al. Can. J. Microbiol., 36:199-205, 1990.
- Kriechbaum M. et al. FEBS Lett., 255:63-66, 1989.
- Linthorst, H. J. M. Crit Rev Plant Sci, 10:123-150.
- Logemann, J. et al. Plant Cell, 1:151-158, 1989.
- Matton, D. and Brisson, N. Mol Plant-Microbe Interactions, 2:325-331, 1989.
- Matton, D. et al. Plant Mol Biol, 14:863-865, 1990.
- Nelson, C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1975 - 1979, 1980.
- Odell, J. et al., Nature, 313:810, 1985.
- Schroder, M. et al. Plant J, 2:161-172, 1992.
- Taylor, J., et al. Molecular Plant-Microbe Interactions, 3:72-77, 1990.
- Vasil et al. Bio/Technology 11: 1153-1158, 1993.
- Winter et al. Mol. Gen. Genet., 221(2):315-19, 1988.

Seznam řetězců

(1) Obecná informace

i) Přihlašovatel:

- (A) Název: Monsanto Company
- (B) Ulice: 800 North Lindbergh Boulevard
- (C) Město: St.Louis
- (D) Stát: Missouri
- (E) Země: USA
- (F) PSČ: 63198
- (G) Telefon: (314) 537-7286
- (H) Fax: (314) 537-6047

ii) Název vynálezu: Způsob kontroly rostlinných patogenů

iii) Počet řetězců: 4

iv) Počítačové zpracování

- (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) Operační systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Verze #1.25 (EPO)

vi) Údaje o původní přihlášce:

- (A) Číslo přihlášky: US 08/161041
- (B) Datum podání: 24.listopad 1993

(2) Informace o řetězci SEQ ID NO: 1

Charakteristika řetězce:

- i) A) Délka: 1848 párů bází
- B) Typ: nukleová kyselina
- C) Spirálovitost: dvojitá
- D) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

ix) Rys:

A) Jméno/klíč: CDS

B) Lokace 16..1833

xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 1:

TCTAGAAGAT CTATC ATG CAG ACT CTC CTT GTG AGC TCG CTT GTG GTC TCC	51
Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser	
1 5 10	
CTC GCT GCG GCC CTG CCA CAC TAC ATC AGG AGC AAT GGC ATT GAA GCC	99
Leu Ala Ala Ala Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala	
15 20 25	
AGC CTC CTG ACT GAT CCC AAG GAT GTC TCC GGC CGC ACG GTC GAC TAC	147
Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr	
30 35 40	
ATC ATC GCT GGT GGA GGT CTG ACT GGA CTC ACC ACC GCT GCT CGT CTG	195
Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu	
45 50 55 60	
ACG GAG AAC CCC AAC ATC AGT GTG CTC GTC ATC GAA AGT GGC TCC TAC	243
Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr	
65 70 75	
GAG TCG GAC AGA GGT CCT ATC ATT GAG GAC CTG AAC GCC TAC GGC GAC	291
Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp	
80 85 90	
ATC TTT GGC AGC AGT GTA GAC CAC GCC TAC GAG ACC GTG GAG CTC GCT	339
Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala	
95 100 105	
ACC AAC AAT CAA ACC GCG CTG ATC CGC TCC GGA AAT GGT CTC GGT GGC	387
Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly	
110 115 120	
TCT ACT CTA GTG AAT GGT GGC ACC TGG ACT CGC CCC CAC AAG GCA CAG	435
Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln	
125 130 135 140	
GTT GAC TCT TGG GAG ACT GTC TTT GGA AAT GAG GGC TGG AAC TGG GAC	483
Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp	
145 150 155	
AAT GTG GCC GCC TAC TCC CTC CAG GCT GAG CGT GCT CGC GCA CCA AAT	531
Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn	
160 165 170	
GCC AAA CAG ATC GCT GCT GGC CAC TAC TTC AAC GCA TCC TGC CAT GGT	579
Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly	
175 180 185	

GTT AAT GGT ACT GTC CAT GCC GGA CCC CGC GAC ACC GGC GAT GAC TAT Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr 190 195 200	627
TCT CCC ATC GTC AAG GCT CTC ATG AGC GCT GTC GAA GAC CGG GGC GTT Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val 205 210 215 220	675
CCC ACC AAG AAA GAC TTC GGA TGC GGT GAC CCC CAT GGT GTG TCC ATG Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met 225 230 235	723
TTC CCC AAC ACC TTG CAC GAA GAC CAA GTG CGC TCC GAT GCC GCT CGC Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg 240 245 250	771
GAA TGG CTA CTT CCC AAC TAC CAA CGT CCC AAC CTG CAA GTC CTG ACC Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr 255 260 265	819
GGA CAG TAT GTT GGT AAG GTG CTC CTT AGC CAG AAC GGC ACC ACC CCT Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro 270 275 280	867
CGT GCC GTT GGC GTG GAA TTC GGC ACC CAC AAG GGC AAC ACC CAC AAC Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn 285 290 295 300	915
GTT TAC GCT AAG CAC GAG GTC CTC CTG GCC GCG GGC TCC GCT GTC TCT Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser 305 310 315	963
CCC ACA ATC CTC GAA TAT TCC GGT ATC GGA ATG AAG TCC ATC CTG GAG Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu 320 325 330	1011
CCC CTT GGT ATC GAC ACC GTC GTT GAC CTG CCC GTC GGC TTG AAC CTG Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu 335 340 345	1059
CAG GAC CAG ACC ACC GCT ACC GTC CGC TCC CGC ATC ACC TCT GCT GGT Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly 350 355 360	1107
GCA GGA CAG GGA CAG GCC GCT TGG TTC GCC ACC TTC AAC GAG ACC TTT Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe 365 370 375 380	1155
GGT GAC TAT TCC GAA AAG GCA CAC GAG CTG CTC AAC ACC AAG CTG GAG Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu 385 390 395	1203
CAG TGG GCC GAA GAG GCC GTC GCC CGT GGC GGA TTC CAC AAC ACC ACC Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr 400 405 410	1251
GCC TTG CTC ATC CAG TAC GAG AAC TAC CGC GAC TGG ATT GTC AAC CAC Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn His 415 420 425	1299

AAC GTC GCG TAC TCG GAA CTC TTC CTC GAC ACT GCC GGA GTA GCC AGC Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser 430 435 440	1347
TTC GAT GTG TGG GAC CTT CTG CCC TTC ACC CGA GGA TAC GTT CAC ATC Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile 445 450 455 460	1395
CTC GAC AAG GAC CCC TAC CTT CAC CAC TTC GCC TAC GAC CCT CAG TAC Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr 465 470 475	1443
TTC CTC AAC GAG CTG GAC CTG CTC GGT CAG GCT GCC GCT ACT CAA CTG Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu 480 485 490	1491
GCC CGC AAC ATC TCC AAC TCC GGT GCC ATG CAG ACC TAC TTC GCT GGG Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly 495 500 505	1539
GAG ACT ATC CCC GGT GAT AAC CTC GCG TAT GAT GCC GAT TTG AGC GCC Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala 510 515 520	1587
TGG ACT GAG TAC ATC CCG TAC CAC TTC CGT CCT AAC TAC CAT GGC GTG Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val 525 530 535 540	1635
GGT ACT TGC TCC ATG ATG CCG AAG GAG ATG GGC GGT GTT GTT GAT AAT Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn 545 550 555	1683
GCT GCC CGT GTG TAT GGT GTG CAG GGA CTG CGT GTC ATT GAT GGT TCT Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser 560 565 570	1731
ATT CCT CCT ACG CAA ATG TCG TCC CAT GTC ATG ACG GTG TTC TAT GCC Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala 575 580 585	1779
ATG GCG CTA AAA ATT TCG GAT GCT ATC TTG GAA GAT TAT GCT TCC ATG Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Ser Met 590 595 600	1827
CAG TGATAAGGAT CCGGTACC Gln 605	1848

Informace o řetězci SEQ ID NO: 2

Charakteristika řetězce:

- i) A) Délka: 605 aminokyselin
- B) Typ: aminokyselina
- D) Topologie: lineární
- ii) Typ molekuly: protein

xi) Popis řetězce : SEQ ID NO:2

Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr
20 25 30

Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly
35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro
50 55 60

Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg
65 70 75 80

Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser
85 90 95

Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln
100 105 110

Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val
115 120 125

Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp
130 135 140

Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala
145 150 155 160

Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile
165 170 175

Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr
180 185 190

Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val
195 200 205

Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys
210 215 220

Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr
225 230 235 240

Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu
245 250 255

Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val
260 265 270

Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly
275 280 285

Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys
290 295 300

His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu
305 310 315 320

Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile
325 330 335

Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr
340 345 350

Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly
355 360 365

Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser
370 375 380

Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu
385 390 395 400

Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile
405 410 415

Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr
420 425 430

Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp
435 440 445

Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp
450 455 460

Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu
465 470 475 480

Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile
485 490 495

Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro
500 505 510

Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr
515 520 525

Ile Pro Tyr His Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser
530 535 540

Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val
545 550 555 560

Tyr Gly Val Gln Gly Leu Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr
565 570 575

Gln Met Ser Ser His Val Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys
580 585 590

Ile Ser Asp Ala Ile Leu Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
595 600 605

Informace o řetězci SEQ ID NO : 3

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 33 párů bází

B) Typ: nukleová kyselina

C) Spirálovitost: jednoduchá

D) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 3

CCATCTAGAA GATCTATCAT GCAGACTCTCTC CTT

Informace o řetězci SEQ ID NO: 4

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 36 párů bází

B) Typ: nukleová kyselina

C) Spirálovitost: jednoduchá

D) Topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomická)

xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 4

TGGGGTACCG GATCCTTATC ACTGCATGGA AGCATA

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rekombinantní molekula DNA s dvojitou šroubovnicí obsahující v pracovní sekvenci:

a) promotor, který vyvolává v rostlinné buňce produkci RNA sekvence,

b) strukturní kodující sekvenci, která kóduje produkci AGO,

c) 3' nepřeloženou oblast, která působí v řečené rostlinné buňce to, že se polyadenylátové nukleotidy připojí k 3' konci RNA sekvence.

2. Molekula DNA podle nároku 1 vyznačená tím, že řečená strukturní sekvence je SEQ ID NO: 1.

3. Molekula DNA podle nároku 1 vyznačená tím, že řečený promotor je vybrán z FMV35S a CaMV35S promotorů.

4. Molekula DNA podle nároku 1 vyznačená tím, že řečený promotor je indukován pathogenní infekcí.

5. Způsob produkce geneticky transformovaných rostlin, které vyjadřují antipathogenní množství AGO, zahrnující kroky:

a) vložení do genomu rostlinné buňky rekombinantní molekulu DNA s dvojitou šroubovnicí obsahující:

i) promotor, který vyvolává v rostlinné buňce produkci RNA sekvence,

ii) strukturní kodující sekvenci, která kóduje produkci

č.j.	0 5 4 9 4 4	DOŠLO	2 9 . VII . 9 6	URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.
------	-------------	-------	-----------------	-------------------------------------	-------

AGO,

iii) 3' nepřeloženou oblast, která působí v rostlinné buňce to, že se polyadenylátové nukleotidy připojí k 3' konci RNA sekvence,

b) získání transformovaných rostlinných buněk a

c) regeneraci geneticky transformovaných rostlin, které vyjadřují AGO v množství účinném pro snížení poškození působenému infekcí bakteriálními a houbovými patogeny

6. Způsob podle nároku 5 vyznačený tím, že řečená strukturní kodující sekvence je SEQ ID NO: 1.

7. Způsob podle nároku 5 vyznačený tím, že řečený promotor je vybrán z FMV35S a CaMV35S promotorů.

8. Způsob podle nároku 5 vyznačený tím, že řečený promotor je indukován patogenní infekcí.

9. Způsob podle nároku 5 vyznačený tím, že řečené rostliny jsou rostliny brambor nebo pšenice.