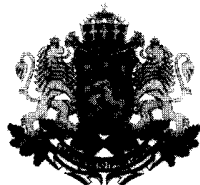


РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

(11) 97604A

(51) C12N 15/82

C12N 15/29

A01N 65/00

A01H 5/00

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 97604

(22) Заявено на 05.04.1993

(24) Начало на действие  
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 9019736 (32) 10.09.1990 (33) GB  
9108471 (32) 19.04.1991 GB

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 3 | 31.03.1994

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №  
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):

ADVANCED TECHNOLOGIES  
(CAMBRIDGE) LIMITED, ., ,  
STAINES, MIDDLESEX, ,  
STAINES, MIDDLESEX ( GB );

(72) Изобретател(и):

GURR , SARAH J . , COLGATE  
ROAD, YOR ( GB ); MCPHERSON , MICHAEL  
J . , THORNHILL, DEWSBU ( GB );  
ATKINSON , HOWARD J . , LEEDS ( GB );  
BOWLES , DIANNA J . , UPPER NIDDERDALE  
( GB );

(74) Представител по индустриална  
собственост:

Фани Владимирова Божинова , 1000  
София , п.к.728

(86) № на PCT заявка:

PCT/ GB91/0 / 1540 , 10.09.1991

(87) № и дата на PCT публикация:

92/044 / 53 , 19.03.1992

(54) МЕТОД ЗА БОРБА С НЕМАТОДИ ПО РАСТЕНИЯТА

(57) По метода се идентифицира генът, индуциран в растението в резултат на нематодна инфекция, който се модифицира, за да се създаде резистентност към нематоди. 16 претенции 16 претенции , 0

BG 97604A

## МЕТОД ЗА БОРБА С ПАРАЗИТИРАЩИ ПО РАСТЕНИЯТА НЕМАТОДИ

Изобретението се отнася до борба с паразитиращи по растенията нематоди, по-специално до метод за борба с коренови цистообразуващи нематоди. Изобретението се отнася също така до въвеждане на резистентност по отношение на нематоди в различни видове растения, чувствителни към коренови цистообразуващи нематоди, например картофи (*Solanum tuberosum*).

Цистообразуващите нематоди (главно *Heterodera* и *Globodera* spp) са ключови вредители за много културни растения. Те са причина за директни загуби от добиви, както и за недиректни загуби като например разходи за пестициди и неоптимално използване на земята при селскостопанската дейност. Картофените цистообразуващи нематоди (*Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*) са ключови вредители при картофите във Великобритания, в много други части на Европа и в други райони където се отглеждат картофи. *Heterodera glycines* (соевицистообразуващи нематоди) има икономически ефект при соята който само в САЩ може да надхвърли 500 милиона долара годишно. *Heterodera schachtii* (цвеклови цистообразуващи нематоди) представлява огромен проблем за

стопаните на захарно цвекло в Европа и САЩ. *Heterodera avenae* (житни цистообразуващи нематоди) имат икономическо значение по целия свят.

Значителни икономически плътности от цистообразуващи нематоди обикновено предизвикват закърняване на културните растения. Кореновата им система е по-малка от тази на незаразени растения, което се отразява в появяване на симптоми на минерален дефицит в листата и повишен риск от засушаване и повехване при сухи почвени условия. Загубите в добива са свързани с плътността на наличните в растенията цистообразуващи нематоди и при силна зараза могат да бъдат чувствително над 50 % при култури като картофи и соя.

Понастоящем борбата се води с химически средства, с културални техники и резистентни видове като всички тези начини могат да се използват интегрирано. Необходими са обаче по-ефективни начини на борба. Нематоцидите могат да се приемат само за ограничено приложение, не и за широка употреба. Така например алдикарб и продуктите му на разграждане са високо токсични за топлокръвни организми и замърсяват подпочвените води. В резултат на това, правителствата на няколко щата в САЩ са поставили ограничения при прилагането на този нематоцид. В Холандия се води политика за намаляване прилагането на нематоциди за период от пет години. Културалните техники също така не представляват идеалното решение на проблема тъй като мерки като сеитбооборот крият скрити загуби, които са неприемливи за селските стопани или тези които разполагат с малко икономически изгодни алтернативни култури.

Резистентност на едно растение към нематоди може да се получи чрез невъзможността на нематода да възпроизвежда един генотип върху видовете гестоприемни растителни видове и доминантни, частично доминантни и рецесивен начин на наследяване се появява на базата на един до няколко растителни гена. Тяхната търговска стойност е обаче ограничена за селскостопанския производител. Така например, при картофите се появяват различни източници на резистентност и създават в

Европа подраздели от популации, какъвто е случая на единичния доминантен ген Н 1, който придава резистентност срещу *G. rostochiensis*, (Ro 1 и Ro 4) но не други форми от този вид (Ro 2, Ro 3 и Ro 5).

Култиварният сорт Марис Пайпер изразява Н 1 и широко се използва във Великобритания срещу *G. rostochiensis*, но използването му води в определено съотношение до увеличаване превеса на *G. pallida* който има възможност да се възпроизвежда в присъствие на Н 1. Проблемът, поставен при нарушаващи резистентността патотипове, се появява и при други чистообразуващи нематоди и източниците на резистентност са известни. В някои случаи, източниците на резистентност са полигени, като представляват повече затруднения за селскостопанския производител. В допълнения, резистентността при някои култиварни сортове е по природа по-скоро количествена отколкото качествена и така с времето, при често използване на такива култиварни сортове, може да се появи повишена мултипликатност.

Допирните точки между растението и патогена е местоположение от ключова важност при определяне на чувствителността или резистентността към инвазия. При по-ранното определяне на етапите на инвазионния процес, допирните точки се ограничават до много малък брой растителни клетки на локалното местоположение на инфекцията. По-късно, при отново диференциране на съществуващите растителни клетки, се образува синцитиум (многоядрена маса от протоплазма получена в резултат на кондензиране на клетки), от който се хранят животните. Синцитиумът се индуцира от ювенилни форми във втори стадий на развитие след като са мигрирали в корените на гостоприемника, вероятно в резултат на секретията, освободена от животното в първоначалната клетка от която се храни. Когато растението е чувствително, синцитиумът се увеличава в обем и се поддържа през време на периода на хранене на нематода. При женски, това може да продължи няколко седмици. Клетъчната биология на синцитиума е добре охарактеризирана.

Настоящото изобретение търси да открие метод за предаване на нематодна резистентност в растение, която да бъде универсална срещу цистообразуващи нематоди и има продължителна устойчивост. Изобретението се различава от другите методи, които могат да включват използването на познат резистентен ген вместо използването на гени, които са специфична част от чувствителността към нематодното нападение.

Изобретението може да е свързано с идентифицирането на преди непознати гени експресирани специфично на местоположението на хранене на цистообразувания нематод и като резултат на прикрепяването на нематода. Идентифицирането на гените може да се постигне чрез използване на полимеразна верижна реакция (PCR). По-рано ограничените клетъчни допирни точки между растението и патогена ограничаваше разбирането на молекулярната биология на допирните точки. Освен това, изобретението се отнася до ново използване на такива гени за <sup>направляване</sup> ~~направляване~~ при нападение, освобождаването на вещества, специфично на мястото на хранене, които са токсични както за растителните клетки, така и за нематодите. Специфичното освобождаване на такива вещества дава възможност за използване на съединения, които ако присъстват като съставна част на растението, биха повлияли неблагоприятно на неговия растеж или биха представлявали неприемлив токсикологичен риск. Серия от такива съединения са вече известни, достъпни са и стандартни биологически техники за тяхното приложение съгласно изобретението.

Съответстващи нематодни специфични гени могат да се демонстрират при многобройни растения и е възможно да се защити всяко културно растение, което има възможност да бъде генетично манипулирано да експресира промотори на характерни гени на местоположението на хранене, които да са свързани с последователност която има способността да нарушава репродуктивната способност на нематодите. Няколко илюстративни, но не ограничаващи примери включват картофи, домати, захарно цвекло и тютюн.

Известно е, че проявяването на синцитиум е подобно за различни цистообразуващи нематоди. Използването на специфично подреден ген има поради това универсално приложение при всички цистообразуващи нематоди. Те са, без да се ограничава до тях: *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis* (картофен цистообразуващ нематод), *Heterodera shachtii* (цистообразуващ нематод по соя), *Heterodera glycines* (цвеклов цистообразуващ нематод), *Heterodera avenae* (цистообразуващ нематод по зърнените култури), *Heterodera oryzae* (оризов цистообразуващ нематод) и *Globodera tabacum* (тютюнев цистообразуващ нематод).

В настоящето описание терминът "ген" се отнася до ДНК последователност която включва (1) нагоре по течението (5') регулиращи сигнали включително промотера, (2) кодиращ регион специфициращ продукта, протеин или РНК на гена и (3) надолу по течението (3') региони включващи транскрибиращи терминационни и полиаденилационни сигнали (4) асоциирани последователности необходими за продуктивна и специфична експресия.

Терминът "промотор" се отнася до регион в ДНК последователност който включва необходимите сигнали за продуктивната експресия на кодиращата последователност. Това може да включва последователности към които РНК полимераза се свързва, без да се ограничава до такива последователности, и може да включва региони към които други регулаторни протеини се свързват, заедно с региони включени в контрола на протеиновата трансмембрана и могат да включват кодиращи последователности.

Съгласно първия аспект на настоящето изобретение, осигурен е метод за борба с нематоди, метод включващ етапите на идентифициране на гена, индуциран в заразено растение чрез нематодната инфекция на това растение и модифициране на гена за да предаде нематодна резистентност на растението.

Предпочитаните методи включват идентифициране на гените индуци-

рани на местоположението на хранене от нематодната инфекция в растението, като тези гени са характерни за нематодната инфекция.

Предпочитан метод за идентифициране на гените включва следните етапи:

изграждане на cДНК библиотека при използване на полимеразна верижна реакция (PCR),

сравняване на тази библиотека със cДНК на инфектирани и неинфектирани растения и

идентифициране на cДНК клона представяващ ген експресиран на местоположението на хранене и използване на cДНК клона за изолиране на кореспондиращ геномен клон.

Генът или част от него може да съдържа ДНК последователност състояща се главно от последователност подбрана от групата включваща:

GCCCAAACTTTCGGGTGTAACCTTGTCCTTGTCTTTTGTAGTCTTTTACCTATCCCAAC

AAAAATTTCTCGCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(Формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAG<sup>GA</sup>GAAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATTT

CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(Формула 2)

GATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG

CAGTTGGAGAAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT

TAAATTAAAGTTAGCAACGG (Формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTTGAGGAACTGGATAACACCGNCGGCTGCCGGGGCTGGC

GAATCTGTGGGTNCGGCCAATTCCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(Формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT

ACTTTTCCGGAACSTATGCACACCGGCTGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(Формула 5)

GTGCTACCTTTCCGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGACTCACCTACCGCT

TTGAATGAC (Формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTTGCGGAC  
GCAAATAAACGCGCAACAACAATCGG (Формула 7)

CGTGAGTCAGTNACTCGCTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT  
GGGAAAACCC (Формула 8)

В която А означава аденин

С означава цитозин

Т означава тимин

Г означава гуанин

и N е неопределен нуклеотит

ДНК последователността спомената по-горе или по-нататък в описанието на изобретението може да се състои по същество от всяка от горните последователности (Формули 1 до 8) или еквивалентни нуклеотидни последователности, представляващи алели или полиморфни варианти на тези гени.

Съгласно втори аспект на настоящето изобретение, резистентно на нематоди растение съдържа един ген или част от него като гена включва ДНК последователност състояща се по същество от последователност подбрана от групата включваща:

GCCCAAACTTTCGGGTGTAATCCTTGTCCTTGTTTTTTGTAGTCTTTTACCTCTCCAAC  
AAAAATTTCGCGCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG (Формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAAGCATTT  
CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG (Формула 2)

GTATCCACGCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTTG  
CAGTTGGAGAAATAACGACCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCCAAGCGATCAAAAT  
TAAATTAAAGTTAGCAACCC (Формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCGGNNCGGCTGCCCGGGCTGGC  
GAATCTGTGGGTTCGCGCAATTCTGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTA AAA  
(Формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAAMANNNCCTGGT  
ACTTTTCGGAACATATGCACACCGGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA



(Формула 5)

GTGGCTACCTTTCCGGACGCAATACCGTATTGCTGGCTTCCAGAGAGTCACTACCGCT  
TTGAATGAC (Формула 6)

GCGCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACCTGCGGAC  
GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (Формула 7)

CGTGAGTCAGTNAGTCTATTACAAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCTGACT  
GGGAAACCC (Формула 8)

В която А означава аденин

С означава цитозин

Т означава тимин

Г означава гуанин

и N е неопределен нуклеотид

Съгласно трети аспект на настоящето изобретение, осигурено е използването на растителен генен промоторен регион, идентифициран чрез метод от предишен аспект на това изобретение, за предаване на растението резистентност по отношение на коренова цистообразуваща нематода..

Методът може да включва етапите на модифициране или трансформиране на растението с промоторите до гени от предишния аспект на настоящето изобретение и след това модифициране на растението чрез свързване към средство убиващо растителна клетка която опитва редиференциация по отношение синциално развитие, последвано от стимулиране чрез нематод.

Промоторна последователност на един генен клон, която е експресирана в местоположението на хранене, може да се използва за да промовира следните вещества:

а) токсичен протеин, пептид или ензим като DNase, RNase или протеиназа

б) мултигенен токсичен синдром, при което например, промоторът може да експресира протеин или пептид който е неактивен докато се ак-

тивира чрез протеин, произведен от ген свързан с друга промоторна последователност, идентифициран като специфичен за местоположението на хранене. Продуктът на първия ген А може да е неактивен докато не се атакува от продукта на втория ген В за да образува един нов А°, който представлява активен токсин или протеаза. Алтернативно, А може да бъде неактивен без В, така че само А-В молекулите са активни.

с) Антисензитивна РНК, включително един или повече антисензитивни РНК гена, които могат да са еднакви като генна последователност съгласно изобретението или с <sup>други</sup> специфични гени от местоположението на хранене. По този начин промоторът може да се използва за направляване производството на неговата нова антисензитивна РНК. Това съществено намалява нивото на нормалния продукт. Алтернативно, промоторът може да се използва да направлява експерсирането на античувствителна РНК за общите клетъчни гени, като АТР синтетаза, съществена за жизнеспособността на клетките.

Резистентност по отношение на цистообразуваща нематода може да се предаде на растение специфично на местоположението на хранене, методът включва етапите на модифициране или трансформиране на растението с промотори до гени от предишния аспект на настоящето изобретение във връзка с ген, чиито продукт има директен летален или изявен сублетален ефект върху нематода след поглъщане (т.е. антинематоден генен продукт). Примери на потенциално приложими гена, които могат да се използват във връзка с настоящето изобретение са:

а. протеинов токсин от *Bacillus thuringiensis* (или подобен на него организъм), притежаващ антинематодна активност.

б) ген за нематодно токсичен протеин в съответствие с патент на Великобритания № 9104617.7

с) антитело, което нарушава храненето чрез взаимодействие с поемането и храносмилането на храната, каквито са антителата, описани за цистообразуващ нематод при соята, включително това срещу дорсалната

Фарингеална жлеза (Atkinson et al. 1988 Annals of Applied Biology 112, 459 - 469), при използването на метода за трансгенна експресия на антитела в растения, описан от Hiatt, A., Cafferkey, R.C. & Bowdler K. (1989 Production of Antibodies in Transgenic Plants, Nature 342, 767-768)

д) протеин или пептид, какъвто е невропептида, който би имал токсичен ефект при хранене с цистообразуващи нематоди след поемането на храната.

Трябва да се разбира, че нивото на резистентност не трябва да е абсолютно. Достатъчно е то да бъде на степен на селскостопанската и икономическа целесъобразност за даден вид растение.

Изобретението осигурява средство за нематоцидна резистентност което е локализирано на местоположението на хранене на нематода или близко до него. Преодоляна е необходимостта растението да произвежда анти-нематоден генен продукт (като например от изброените в третия аспект на изобретението). Това ограничава всякакъв вреден ефект върху растението, който би могъл да се появи от конституционна експресия. Чрез това изобретение могат да се защитят много културни растения от цистообразуващи нематоди и поради това могат да се генетично манипулират за да експресират промотори на синтициум-характерни гени свързани към последователности, които или разрушават редиференцирането на растителни клетки за да образуват синтициум или експресират анти-нематоден генен продукт в синтициума. Това се отнася до културни растения към които се прикрепят нематоди като например *Globodera pallida* и *Globodera rostochinensis* (картофен цистообразуващ нематод), *Heterodera glycines* (цистообразуващ нематод при соята), *Heterodera schachtii* (цвеклов цистообразуващ нематод), *Heterodera avenae* (цистообразуващ нематод по житните култури), *Heterodera carotae* (цистообразуващи нематоди по морковите), *Heterodera oryzae* (оризов цистообразуващ нематод) и *Globodera tabacum* (тютюнев цистообразуващ нематод). Няколко илюстриращи, но не ограничавачи примери на

културни растения, които могат да се защитят съгласно настоящето изобретение от цистообразуващи нематоди са картофи, домати, соя, захарно цвекло, маслодайна рапица, пшеница, овес, ечемик, ориз, моркови, зелени видове и тютюн.

Изобретението е илюстрирано по-нататък с примери, без те да го ограничават.

Първият пример описва методите които се използват за идентифициране, охарактеризиране и манипулиране на картофени гени за да дадат резистентни трансгенни картофени растения.

#### ПРИМЕР 1

Този пример илюстрира използването на чувствителен култивар от картофи към *Globodera rostochiensis* патогенен тип Ro2, който позволява идентифициране на гените експресирани на местопоможението на хранене на нематода. Секциите 1 до 5 осигуряват елементи за производство на инфектираната коренова тъкан. Най-малкото количество от местно инфектирана тъкан осигурява количества от РНК (секция 6) най-подходящи за изграждане на cDNA библиотека чрез RSE начин на увеличаване (секции 7.1 до 7.4). Изолване на специфични cDNA клони от клетките на хранене се постига чрез диференциално хибридизационно сиване с cDNA **проби** от инфектирани и не-ефектирани тъкани (секция 7.5). Позитивните cDNA клони се анализират чрез ДНК последователности (секция 10) и включванията се използват като **проби** в следващите етапи. Изследване на преходните и спатни експресии на гените се извършва чрез анализ на Нортър (секция 8) като се използва обхват от растителни тъкани в продължение на инфекцията. По-нататъшно локализиране на генната експресия се постига чрез *in situ* хибридизационни изследвания (секция 12). Генни клони, отговарящи на специфичните cDNA клони от клетките на хранене, се изолират от геномна ДНК библиотека (секция 11). Промоторите се идентифицират чрез анализ на ДНК последователността (секция 11) за да се развият конструкции подход

щи за получаване на трансгенна експресивна нематодна резистентност в картофените растения (секция 13) на мястото на което става храненето.

### 1. Растителни материали

*Solanum tuberosum* сорт Марис Пайпер (шотландски семенни картофи, клас А) се оставят да пуснат израстъци в продължение на 24 дни (Hammond-Kozack K.E., Atkinson H.J., Bowles D.J., 1990 Changes in abundance of translatable mRNA species in potato roots and leaves following root invasion by cyst - nematode *Globodera rostochiensis* pathotypes *Physiol Mol Plant Pathol*).

Отделните издънки се изрязват или цялите грудки се използват като растещ материал в саксии.

### 2. Нематоди

Популация от *Globodera rostochiensis* патотип Ro1 и Ro2 цисти се съхраняват като сух материал при 4°C. Цистите се накисват в чешмена вода в продължение на 7 дни при 4°C. Прибавя се дифузат от картофени корени (Shepherd A M 1986 In: Southey J. F., (ed) *Laboratory methods for work with plant and soil nematodes: MAFF reference book 402, 6th edn*)

и излюпването става след 4 - 7 дни при стайна температура.

### 3. Инфекция

Материал от торбички: Отделни издънки се поддържат в готови торбички (Нортъл-Кинг, Минесота). Ленти с размери 1 см x 0.5 см от Вуотман GFA хартия се поставя под всяки връх на издънка. Отпипетира се 10 мкл коренов дифузат в който се съдържат 50 червеи върху всеки връх на корен и отгоре се поставя втора хартиена лента от горния тип. След 24 часа GFA филтърната хартия се отстранява за да се синхронизира инфекцията след инокулацията. Базата се птрязва и торбичките се промиват с чешмена вода.

Материал в саксии: прорасли грудки от картофи се засажат в

25 см дълбоки саксии в пръс плюс значителен брой неизлюпени цисти за да се получи популация от 50 яйца на грам почва.

Шам-инокулирани торбички и саксии се поставят при идентични условия, но без цисти.

#### 4. Условия на растеж

Заразените картофи се поддържат при режим от 18 часа светлина при  $22^{\circ}\text{C}$  и 6 часа на тъмно при  $18^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Резултати и анализиране

Тъканта, израсла в торбичките се събира на 4, 7, 15 и 24-ия ден след заразяването. Обезцветените, локално инфектирани корени се нарязват директно в пликчета от фолия в течен азот. Коренните тъкани, непосредствено до мястото на заразата, също се изрязват и се замразяват отделно.

Тъканите израсли в сакциите също се събират 26 дни след инвазията с  $\text{Eo2}$ . Появилите се женски и цисти се отстраняват с фина четчица за рисуване и локално заразените тъкани се изрязват директно в течен азот в отделни опаковки от фолия.

#### 6. Изолитране на обща РНК

Фолиините опаковки внимателно се стриват с пестик за да се получи прах от тъкани който прах се съхранява при  $-70^{\circ}\text{C}$  до по-нататъшна необходимост от него. Прахообразната тъкан (12 мг) се прехвърля в предварително охладени 20 милилитрови пластмасови Сарстедт епруветки в течен азот и се прибавя 0.5 мл фенол/ $\text{CH}_3\text{Cl}$ /изоамилов алкохол (25:24:1) и 0.5 мл 6M HCl буфер (8 M гуанидин хидрохлорид, 20 mM MOPS (4-морфолино-етанол-сулфонова киселина), 20 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , нагласено pH 7 с натрева основа и 2-меркаптоетанол се прибавя до 50 mM, непосредствено преди употреба). След разиразяването на епруветките, тъканите се хомогенизират чрез 15 удара в Политрон - смесител (Кинематика, Швейцария). Водната фаза се екстрахира три пъти с фенол преди да се остави при  $-20^{\circ}\text{C}$  една нощ да се утаи. След това се прибавят 0.2

обема 1 М оцетна киселина и 0.7 обема студен 96 %-ен етанол. При центрофугиране в микроцентрифуга с приблизително 13 000 оборота в минута в продължение на 15 минути се получава РНК, промива се с 400 мкл 3 М натриев ацетатен разтвор (рН 5.5) при 4° С и след това със студен 70 %-ен етанол и накрая се разтваря в 30 - 50 мкл обработенас DEPC вода и се съхранява при -70° С.

## 7. Конструкция на базирана на РСЕ сДНК библиотека

### 7.1. сДНК синтеза

1 милиграм обща РНК от картофени корени се събира 26 дни след заразяването с *G. rostochiensis* патотип Ec2 и се денатурира в продължение на 5 минути при 70° С на водна баня и след това бързо се охлажда върху лед. Тази проба се прибавя към реакционна смес състояща се от 4 мкл 5 х AMVET буфер (250 mM трис-HCl, рН 8.3, 250 mM KCl, 50 mM магнезиев хлорид, 5 mM ДДТ, 5 mM ЕДТА, 50 мкл/мл говежди серумен албумин), 2 мкл Олиго (*d* T<sub>17</sub>) (100 мкг/мл), 2 мкл *d* NTP смес (10 mM от всяки ATP, *d*CTP, *d*GTP, *d*TTP), 1 мкл 10 mM спермидин хидрохлорид, 1 мкл 80 mM натриев пирофосфат и 125 единици човешки плацентен рибонуклеазен инхибитор (RNENI). 10 единици птичи миобластома вирус (А. реверсивна транскриптаза се прибавят за да се получи краен обем на реакционната смес 20 мкл след което се инкубира 1 час при 42° С. Реакцията се приключва като се прибавят 20 мкл 0.1 М натриев хлорид, 40 mM ЕДТА. Дължината и качеството на продуктите се оценява като се проведе паралелна реакция съдържаща 50 мкCi от <sup>32</sup>P-белязан *d*CTP (3000 Ci/ммол). Белязаните реакционни продукти се фракционират през алкален гел, който след това се автордиографира. По-голямата част от белязаните продукти попада в размерите 200 до 2000 bp, като ясно се виждат и по-голями продукти.

Олиго *d* T примера се отстранява чрез селективно утаяване. Към реакционната смес се прибавя 0.5 мкг поли I. поли C (Фармация) и 3

мкл 10 % (т/о) СТАВ и след това се центрофугира на микроцентрофуга при стайна температура в продължение на 20 минути. Течността над утайката внимателно се отстранява и твърдата фаза се суспендира отново в 14 мкл 1 М натриев хлорид към който се прибавят 25 мкл  $H_2O$  и 1 мкл 10 % СТАВ и пробата отново се центрофугира на микроцентрофуга. В края утайката се суспендира в 10 мкл 1 М натриев хлорид и се утаява в 2.7 обема етанол в продължение на една нощ при  $-20^{\circ}C$ . Утайката се промива с 70 % етанол и се разтваря в 7 мкл вода. dg тайлираща реакция се провежда като към пробата се прибави: 4 мкл 5 х тайлиращ буфер (1 М калиев какодилат, 125 mM трис HCl, pH 7.2), 1 мкл 2 mM ДТТ, 2 мкл 5 mM кобалтов хлорид, 5 мкл 20 М dGTP и 25 единици Терминална трансфераза (Бьорингер). Инкубира се 20 минути при  $37^{\circ}C$  и след това се прибавят 4 мкл 100 mM EDTA и 2 мкл 1 М натриев хлорид. Излишъците от нуклеотиди се отстраняват чрез прибавяне на 1 мкл 10 % (т/о) СТАВ и след това се центрофугира в микроцентрофуга 20 минути при  $4^{\circ}C$ . Утайката се разтваря в 10 мкл 1 М натриев хлорид преди да се прибави 0.25 мкг глюкоген и 30 мкл студен етанол. Остава се една нощ да се утаи при  $-20^{\circ}C$ . Утайката се промива в 70 % етанол и се разтваря в 20 мкл 50 mM натриева основа, 2 mM EDTA и се държи при  $65^{\circ}C$  в продължение на 60 минути за да се хидролизират РНК. сДНК отново се утаява с етанол, промиват се и утайките се разтваря в 20 мкл вода.

## 7.2. PCE разработване

PCE разработването на хомополимерно тайлиран първи отрязък сд при използване на амплимери:

<sup>+</sup>A (олиго dT<sub>17</sub>-Not I); GGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTT

<sup>+</sup>B (олиго dC<sub>14</sub>-Eco E I); AAGGAATCCCCCCCCCCCCCCCC

PCE реакцията съдържа 10 мкл 10 х PCE буфер (100 mM трис HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 40 mM магнезиев хлорид, 0.1 % желатин), 10 мкл 10 х dNTP смес (по 5 mM от dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 pmoles амплимер А, 100 pmoles амплимер В, 2 единици Taq полимеразата и 1 -



ng олиго (d G) тайлирани сДНК в общ реакционен обем 20 мкл и се наслоява отгоре с 20 мкл минерално масло. След това се подлага на следния термален цикличен режим; 1 цикъл  $96^{\circ}\text{C}$ , 2 минути за денатурация на продуктите; ( $96^{\circ}\text{C}$ , 2 минути,  $58^{\circ}\text{C}$ , 2 минути,  $72^{\circ}\text{C}$  3 минути за да се позволи синтезата на втория отрязък, 1 цикъл ( $96^{\circ}\text{C}$ , 2 минути,  $40^{\circ}\text{C}$  2 минути,  $72^{\circ}\text{C}$ , 2 минути) за да се осигури добро зареждане от олиго (dT) края; 15 цикъла ( $96^{\circ}\text{C}$ , 2 минути;  $58^{\circ}\text{C}$ , 2 минути;  $72^{\circ}\text{C}$  3 минути) за разрабстване на продуктите. Реакционната смес се фракционира чрез електрофореза през Nu сито GTC CLR (ГМС Биопродъктс) гел при използване на 123 bp ДНК стълба като маркировач на големината и региони на гела отговарящи на размери от класите  $< 500$ , 500 до 1500, 1500 до 2000 и  $> 2000$  bp се изрязват и се отделят от гела чрез замразяване при  $-20^{\circ}\text{C}$ , след това се центрофугира в микроцентрофуга 10 минути в Спин-Х филтри (Костар). PCR продуктите се оцветяват със Саутерн и се хибридизират до 3 клона, за които е известно че са конституционно експресирани в корените на картофите. сДНК пресучванията на дълги и къси, високи и ниски транскрипти, хибридизирани до PCR продукти отразяват представителството на различни транскрипти в библиотеката.

### 7.3. Строеж на библиотеката

Възстановената ДНК (по-голяма от 200 bp) се разгражда с EcoEI и Not I и се свързва с по подобен начин разграден lambda-ZAP пред опаковане in vitro при използване на Стратеген Гига Плюс опаковки съгласно указанията на производителя. Определя се титъра на библиотеката върху E. coli щам XL 1-синьо при използване на плочки LB покрив с 1 % агар съдържащ 12.5 mM IPTG и 6.25 mg/ml X-гал.

### 7.4. Оценяване на библиотеката

Качеството на PCR, базирано на cDNA библиотека, се оценява по два начина 1) приблизително 96 % плаки които се доказва че са рекомбинанти, както е показано чрез вътрешната инактивация на бета-галакта

зидазна алфа-комплементация; 2) плаки подбрани случайно, в РСВ бу-  
фер и разработени при използване на комплементарни М 13 амплимери,  
казват отделни вмъквания (включвания) от порядъка на 230 bp - 1000 bp,  
като средния размер на включванията е 470 bp.

#### 7.5. Диференциално отсяване

Библиотеката дава  $3.5 \times 10^5$  рекомбинантни фаги от които  $6 \times 10^4$   
се отсяват с  $^{32}\text{P}$  дСТР-белязани проби, синтезирани като първи отрязък  
сДНК от 10 мкл обща РНК, получена било от инфектирани коренови тъкани  
26 дни след Ro2 инвазията или от здрави корени на същата възраст (G  
S.J., McPherson M.J.1991, PCR-based cDNA library construction. In:  
McPherson M.J., Quirke P., Taylor G.R. (eds) Polymerase chain reac-  
tion: A practical approach. IRL Press at Oxford University Press,  
Oxford). Невключеният изотоп се отстранява чрез утаяване с амон-  
иев ацетат и пробите се жустират за да имат еквивалентно на сгм/мкл  
сДНК/мл хибридикационна течност след което се преброяват точносно  
сцинтилационно. Разработването на плаките се извършва в повторение  
и те се денатурират в 0.5 М натриева основа, 1.5 М натриев хлорид и  
се неутрализират в 1.5, 0.5 М трис рН 7.2 и 1 mM ЕДТА и се нагриват  
(80° C, 2 часа), Филтрите се прехибридизират в отделни "здравя" и  
"инфектирана" прехибридикационна течност съдържаща 5 X SSPE, 6% PEG  
6000, 0.5 % Марвел (обезмаслено прахообразно мляко), 1 % SDS, 0.1  
натриев пирофосфат и 250 мкг/мл обработено с ултразвук и денатурира-  
на херингова сперма ДНК при 65° C в продължение на 6 часа. Хибриди-  
зацията се извършва при 65° C 24 часа след което се прибавя съответ-  
ната радиобелязана проба от 1-вия отрязък. След хибридиране филт-  
рите се промиват последователно в 5 x SSC, 0.1 % SDS, след това в 1  
SSC, 0.1 % SDS при 65° C, за 2 x 20 минути във всяки разтвор. Пе-  
ната се излагат на рентгенов филм, с интензификационно отсяване пр-  
-70° C. Плаките се хибридизират към Ro 2 дни 26 проба и не съвсем зд-  
вите 26 дневна проба и се пресчитват до хомогенност чрез 2 допълнителни

кръга на отсяване на плаките.

#### 8. Нортърн и Саутърн хибридизация и получаване на пробите

РНК заредена 10  $\mu$ г на трак се разделя чрез 0.6 М формалдехиден агарозен гел при протичане с  $7.5 \text{ V cm}^{-1}$ . Гелът се фотографира и промива 2 x 20 мин в 10 x SSC и се нанася върху Хайбонд-N мембрана (Амершам) с 10 x SSC. Филтрите се нагреват ( $80^{\circ} \text{C}$ , 2 часа) и се пре-хибридизират в продължение на 12 часа при  $42^{\circ} \text{C}$  в 50 % формамид, 5 x SSC, 1 x Денхардс, 100  $\mu\text{g/ml}$  ДНК от сперма на херинг и 250 mM фосфатен буфер, (pH 6.5). Хибридизацията се извършва в пресен прехибридиращ буфер включително топлинно денатуриран  $^{32}\text{P}$ -хексаприм-белязан pPS E 2 - 4 проба (25  $\mu\text{g}$ ) (Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983 Nucleic Acids Research <sup>2229</sup> 14, V. при  $42^{\circ} \text{C}$  в продължение на 24 часа. Филтрите се промиват последователно в 5 x SSC 0.1 % SDS при  $42^{\circ} \text{C}$ , след това 2 x SSC 0.1 % SDS при  $42^{\circ} \text{C}$  и накрая една последно промиване при  $65^{\circ} \text{C}$  в 2 x SSC 0.1 % SDS. Петната се излагат на рентгенов филм, с интензифициращи отсявания при  $70^{\circ} \text{C}$ . РМЖ 1 включване се получава като се вземе една единствена пречистена плака в РСБ буфер и се амплифицира с комплементарен M13 амплимери съгласно Gussow, D. & Clackson, T., (1989 Nucleic Acids Research 17, 4000).

Геномна ДНК се получава от ядра изолирани от млади картофени листа (сорт Марис Пайпер), както е описано от Jofuku, K. D. & Goldberg, R. B. (1989, In Plant Molecular Biology: A Practical Approach pp 37 - 66).

ДНК с високо молекулно тегло се фракционира по размери през 0.8 % агарозен гел след което се разгражда с рестриктивни ензими. За анализиране на генната експресия в цялото растение, РНК се екстрахира от стеблата, от дръжките на листата, от листата, от цветовете и корените на инфектираните и от незаразените растения. За да се анализира реакцията след откъсването (нарязването), корените или листата на растението се надробяват и РНК се екстрахира от третирани тъкани в периоди от време (3, 6, 9 и 12 часа след надробването). Пробите

се сравняват чрез Нортенова анализа с РНК, екстрахирана от корени, разени с нематоди. Геловите се онечистват, денатурират и се нанасят върху Хайбонд-Н мембрана (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989 Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd edn. Cold Spring Harbour Press). Филтърът се нагрива (80°C, 2 часа) и се прехибридизира в продължение на 6 часа при 65°C в прехибридизационна температура, както е описано при диференциалното отсяване на плаки. Описани са условията на хомогенна хибридизация и промиване за нортено блот филтри. Хетерологусна хибридизация се извършва при 56°C и напълнителите се промиват в 5 x SSC при 56°C.

#### 9. Изрязване на рБлустрипта от ламбда ZAP и пречистване на плазмид

рБлустрипт клона PMR1, ~~нодец~~ включението чиято последователност е показана в една от формулите 1 до 8, се изрязва от позитивно хибридизация ламбда ZAP клон и се освобождава съгласно указанията в Стратегеновия наръчник. Плазмидът ДНК се пречиства чрез цезиев хлориден плътностен градиентно центрофугиране (Davis L., Dibner M. D., Bateman J.F. 1986 Basic methods in molecular biology, Elsevier Science Publishers, New York).

#### 10. Анализ на последователността

Анализът на ДНК последователността се извършва върху алкално денатуриран плазмид ДНК, съгласно методите описани в протоколите на производителите за сиквенса (вариант 2.0) реакциите (Юнайтет Стайтс Биохемикъл Корпорейшън). Данните от ДНК последователността се сравняват с базисните данни на EMBL и Генбенката (прилиз 23) при използване на QUICKN програма която прилага алгоритмите на Lipman и Pearson (Lipman d.j.k., Pearson W.R., 1985 Rapid and sensitive protein similarity searches, Science 227: 1435 - 1441) протичащи на VAX 11/750 компютър VM5 оперираща система.

#### 11. Изолиране на геномния клон

Ламбда EMBL 3 геномна ДНК библиотека се създава като се из-

ползва частично EcoRI разградена с Марис Пайпер геномна ДНК, съгласно методите описани от Sambrook et al. (1989) *ibid*.

Библиотеката се отсява чрез покриване приблизително на  $1.8 \times 10^5$  клонна, като се приготвят дубликатни плочести лифт филтри. Те се прехибридизират и след това хибридизират и промиват по начина, както вече беше описан в раздел 7.5, с изключение на това, че пробата се получава чрез хекса-прим белязано ДНК включение, PCR амплифицирано (Gussow D., Clackson T., 1989 Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction, *Nucleic Acids Research* 17 : 10)

от cДНК клоните, pPMP1, pPMP2 или pPMP3.

Позитивни хибридизационни клонна, получени след 3 рунда на хибридизационно отсяване, по-нататък се характеризират чрез рестрикционен анализ и ДНК последователност Sambrook et al., (1989 *ibid*), за да се локализируют промоторните последователности.

## 12. Хибридизация in situ

Тъкани от заразени и незаразени корени се поставят във водни, секционирани, прехибридизирани и след това хибридизирани до сенз и антисенз проби от pPMP1, pPMP2 и pPMP3, както е описано от Jackson D., (In *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach* (ed. S. J. Gurr, M. J. McPherson and D. J. Bowles IRL Press, Oxford, 1991

## 13. Произвеждане и регенериране на трансгенни растения

Трансгенни картофи се получават съгласно методите описани от Harsh et al. (1985 *Science* 227,1229-1231) при използването на *Agrobacterium* щам GV 3101, съдържащ pGV 3850, носещ захранващи клетките специфични промотори споени със съответния разграждащ ген, избран с тези споменати във въведението на настоящето описание и малките растения се получават преди да се изследват за нематодна резистентност.

## ПРИМЕР 2

Присъствие на еквивалентни гени в други растителни видове

Гени от един вид растение могат да се експресират в коректен п време и пространство начин в друг вид растение, дори когато видовете принадлежат към различни растителни семейства. Благодарение на подотното по физиология и патология установяването на синцитиум в дивият не развитие на цистообразуващите нематоди в растенията от много семейства, генът експресиран в синцитиума на едно растение, ще се експресира коректно и при въвеждането му в различни растителни видове.

Потвърждение се получава при идентифициране на еквивалентни гени в други растителни видове. Геномни ДНК разграждания при тютюн, домати и захарно цвекло се изследват чрез хибридизиране към pRME1 (като се следва метода от раздел 8). Във всички случаи се наблюдава кръстосана хибридизация което показва, че съществуват в тези растения еквивалентни гени. Конструкция, включваща промотора на гена представен чрез pRME1, в поради това способна да направлява точното локализирано експресиране на подходящ анти-нематоден ген в редица културни растения. Тези опити осигуряват пътя за изолиране на еквивалентен ген от други видове растения за да се експресираща анти-нематоден защитен механизъм в тях.

#### Патентни претенции

1. Метод за борба с нематоди, като метода включва етапите на идентифициране на гена индуциран в успешно заразеното с нематодна инфекция растение и модифициране на гена за да предаде нематодна резистентност на растението.

2. Метод за борба с нематоди, съгласно претенция 1, характеризира се с това, че включва етапа на идентифициране на гените характерни с това, че се индуцират от нематодната зараза на местоположението на хранене в растението .

3. Метод за борба с нематоди съгласно претенции 1 или 2, характеризира се с това, че включва етапите:

изграждане на cДНК библиотека при използването на полимеразна верижна реакция (РСР);

сравняване на тази библиотека с cДНК от заразени и незаразени растения и

идентифициране на cДНК клона представляващ ген експресиран на местоположението на храненето и използване на cДНК клона за изолиране на съответен геномен клон.

4. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че този ген или част от него включва ДНК последователност състояща се по същество от или еквивалентна на някоя от групите включващи:

GCCCAAACTTTCCGCTGTACTCCTTGTCTTGTGTTTGTAGTCTTTTACSTATCCAAAC  
AAAAATTTCTCCCAAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(формула 1)

AACATCCGGTCCCAAGAGAGGAAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATTT  
CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(формула 2)

GTATCCACGCCTCTGAATAGCACAGAAACAGAGTGATACAAGAAAAGCACACATATTTTTG  
CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT  
TAAATTAAAGTTAGCAACGG

(формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACTGGATAACACCCGNNCGGCTGCCGGGGCTGGC  
GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCCGTAAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGCATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNNCCTGGT  
ACTTTTCCGGAACATATGCACACCCCGCTGCTATCAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCCGTACSTTTCCGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGAGTCACTACCGCT  
TTGAATGAC

(формула 6)

GCGCCCGGGCAGATCGGGGGCTCGGNGGCTACGGCTACGGAGGTTGCACAACTGCGGAC  
GCAAAATAACGCGCAACAATCGG

(формула 7)

CGTGAGTCACTNAGTCTGATTACAATTCACTGGCCGTCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTCGACT  
GGGAAACCC (формула 8)

в които А означава аденин

С означава цитозин

Т означава тимин

Г означава гуанин

и N означава неопределен нуклеотид

5. Метод за борба с нематоди включващ етапа на съчетаване на промоторен регион, получен от ген добит по метод от някоя от предишните претенции, с други региони кодирани за продукти на разграждане в резултат на нападението от нематоди.

6. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 5, характеризира се с това, че включва етапа на комбиниране на промоторен регион на горния ген с регион, кодиран за средства адаптирани да унищожават клетка, която се залавя да редиференцира към местоположението на хроненето.

7. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 6, характеризира се с това, че средствата адаптирани да унищожат клетка са избрани от група включваща:

- ДНКаза, РНКаза или протеиназа, токсичен протеин или токсичен пептид,

- мулти-генен токсичен синдром

- нечувствителна РНК към редиференцираните клетки

8. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 5, характеризира се с това, че другите региони кодират продукт притежаващ летален или добре проявен сублетален ефект при поемане от нематоди.

9. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 8, характеризира се с това, че продукта е избран от група състояща се:

- токсичен за нематода протеин

- антитело което действа вредно при поглъщането му от нематода



- токсичен за нематодите невропептид

10. Резистентно на нематоди растение съдържащ ген или модифициран ген получен по метод съгласно всяка от предишните претенции.

11. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че нематодите са цистообразуващи нематоди.

12. Метод за борба с нематоди съгласно всяка от предишните претенции, характеризиращ се с това, че растенията са избрани от рода *Solanum*.

13. Метод за борба с нематоди съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че растението е *Solanum tuberosum*.

14. Резистентно на нематоди растение характеризиращо се с това, че съдържа модифициран ген създаден от ген включващ ДНК последователност, състояща се предимно от последователност избрана от групата включваща:

GCCCAAACTTTCCGGTGTACTCCTTGTCTTCTTTTCTAGTCTTTTACCTATCCAAC  
AAAAATTTCTCGCCAAAAAGGGTTATAACACCGCGATAAAGCTCTTAAATAATG

(формула 1)

AACATCGGGTCCAAGAGAGGAAAAGGCACGAAGAATGGACAATTTTACCAAAAGCATT  
CCTTAGGCTCATAAAGCATTTTAAACCCCGATGCTGTTGTTGTTTTGAAGG

(формула 2)

GTATCCACGCTCTGAATAGCAGAGAAACAGAGTCTACAAGAAAAGCACACATATTTTG  
CAGTTGGAGAAATAACGAGCCATTGTAATTGNCGGTTCTAAGNNTCGAAGCGATCAAAAT  
TAAATTAAAGTTAGCAACGG

(формула 3)

CATGACGATGGACAAAATCATTGAGGAACCTGGATAACACCCNCGGCTGCCGGGGCTGGC  
GAATCTGTGGGTNCCGCCAATTCCGTAACCGTATCGATATGCTCTCAACCGGCATTAAAA

(формула 4)

CAGGATTACACTGGCCCAGGTGCAGTACAGCATGTGGGTGACGNGGAAANANNCCTCGT  
ACTTTTCCGAACCTATGCACACCGGCTGCTATCAAAGCCTGAAGGCCTGCATA

(формула 5)

GTCTGCTACCTTTCTGGGACGCAATACCGTATTGCTGCGCTTCCAGAGAGTCACCTACCGCT  
TTGAATGAC (формула 6)

GGCCCGCGGCACATCGGGGGCTCGGNGGCTACCGCTACGGAGGTGACAACTTGCGGAC  
GCAAATAAACGCGCAACAATCGG (формула 7)

CGTGAGTCAGTNAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTCGTGACT  
GGGAAACCC (формула 8)

в които А означава аденин

С означава цитозин

Т означава тимин

Г означава гуанин

и N означава неопределен нуклеотид

15. Резистентно на нематоди растение от рода *Solanum* **кади**  
теризиращо се с това, че съдържа генна последователност съгласно пр  
тенция 14.

16. Използване на растително генен промоторен регион идентифиц  
ван чрез метода на всяка от претенциите от 1 до 13 или в съответств.  
с претенция 14 за предаване на резистентност на растението по отноше  
ние на цистообразуващи нематоди.