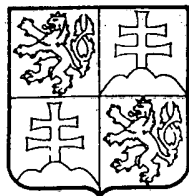


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00165-91.H

(13) A3

5(51) C 12 N 15/82
C 12 N 15/63

(22) 25.01.91

(32) 26.01.90

(31) 90/0101537

(33) EP

(40) 15.09.91

(71) HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, Frankfurt am Main, DE

(72) Dudits Denes prof. dr., Szeged, HU; Paulovics Katalin, Szeged, HU; Kalman Katalin, Szeged, HU; Györgyey János, Szeged, HU; Nagy Ferenc, Szeged, HU; Bako László, Szeged, HU; Horvath Gábor, Szeged, HU; Eckes Peter dr., Kelkheim/Taunus, DE; Donn Günter dr., Hofheim am Taunus, DE;

(54) Způsob přípravy transgenních rostlinných buněk

(57) Gen *asnA*, který kóduje prokaryotickou amoniak-specifickou asparaginsyntetázu (*ASN-A*) může být zaveden do rostlinných buněk. Takto transformované buňky a z nich vyvinuté rostliny nejen tolerují inhibitory glutaminsyntetázy, ale jsou takovými herbicidy účinně stimulovány.

PV 165-914

č.j.	004134
DOŠLO	25. 1. 9
ÚŘAD PRO VÝMA A OBSEV	
PŘIL.	

Způsob přípravy transgenních rostlinných buněk

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu přípravy transgenních rostlin, produkujících prokaryotickou, na amoniaku závislou asparaginsyntetázu.

Dosavadní stav techniky

Asparagin hraje důležitou roli jako transportní forma dusíku a v mnoha rostlinách - včetně těch, které fixují dusík - je základní sloučeninou v transportu dusíku z kořenů do transpiračního proudu. V rostlinách se asparagin tvoří z glutaminu, aspartátu a ATP za katalýzy asparaginsyntetázou ASN (E.C.6.3.5.4) přičemž jsou vedlejšími produkty glutamát, AMP a pyrofosfát.

Nyní bylo zjištěno, že prokaryotická, na amoniaku závislá asparaginsyntetáza ASN (E.C.6.3.1.1) může být zaváděna do rostlinných buněk, což vede k transgenním rostlinám, které vykazují značné přednosti: rostliny vykazují účinnější fixaci fotosyntetického CO_2 v pletivu, zvýšenou rychlost růstu, zrychlený vývoj, časnější tvorbu květů, zvětšenou zelenou hmotu a hmotnost suché rostliny. Plochy, na kterých rostliny rostou tak mohou být rozšířeny do oblastí s méně příznivým klimatem a v oblastech s teplým klimatem jsou například možné tři sklizně místo dvou. Dále transgenní rostliny tolerují aplikaci inhibitorů glutaminsyntetázy (GS), např. fosfinotricinu (PPT) nebo methioninsulfoximinu (MSX) a vždy vykazují stimulaci fotosyntézy a růstu při aplikaci takových inhibitorů.

Oproti ASN kódujícímu genu (nebo genům) vyšších rostlin (asn gen) kóduje asnA gen E.coli různé typy ASN, které využívají amoniak spíše než glutamin pro produkci asparaginu (Cedar a Schwartz (1969) J.Biol.Chem. 244, 4112-4121). Gen pro tento enzym byl izolován a charakterizován Nakamurou a spol. (1981) Nucleic Acids Research 9, 4669-4676. Bylo zjištěno, že tento prokaryotický enzym je aktivní v rostlinách a byla tak otevřena nová cesta asimilace amoniaku v těchto transgenních rostlinách. Vede ke změně metabolismu v rostlinách se stimulačním účinkem na růst a tvorbu zelené hmoty.

Na normálních podmínkách v transformantech jak GS tak ASN-A využívají amoniak. Výhoda bakteriálního způsobu bude zřetelnější během nepřístupu světla, kdy je limitována aktivita chloroplastové GS snížením dostupnosti ATP, energetického zatížení a iontů hořčíku (O'Neal a Joy (1974), Plant Phys. 54, 773-779; Joy (1988) Can.J.Bot. 66, 2103-2109). Navíc exprese bakteriálního asn-A genu v rostlinách ještě umožňuje asimilaci amoniaku, jestliže je rostlinná GS blokována specifickými inhibitory podobnými PPT. V netransformovaných rostlinách narušuje inhibice aktivity GS využití amoniaku hlavním kořenem a akumulace amoniaku je jedním z klíčových faktorů letality ošetřených rostlin (Tachibana a spol (1986) J. Pesticide Sci. 11, 33-37). Přítomnost bakteriálního enzymu tak snižuje akumulaci v PPT-ošetřených transgenních rostlinách, které nejen mohou přežívat dávky herbicidů, které jsou letální pro divoký typ rostlin, ale takto ošetřená transgenní rostlina vykazuje stimulaci růstu.

Odborníkům bude zřejmé, že tyto pozitivní účinky nejsou omezeny na asnA gen z E.coli jelikož stejný gen nebo gen mající stejnou schopnost amidace asparaginové kyseliny a je-

jich solí za vzniku asparaginu obsahují i jiné bakterie.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká použití prokaryotického *asnA* genu v rostlinné buňce, konstruktu genu, obsahujícího gen, kódující prokaryotickou *asnA*, operativně připojenou k regulátorové sekvenci, který umožňuje expresi tohoto genu v rostlinné buňce, vektoru, obsahujícího takový konstrukt genu, rostlinné buňky transformované takovým konstruovaným genem nebo vektorem a exprese prokaryotické amoniak specifické asparaginsyntetázy v rostlině, zejména kulturní rostlině a semen nebo rozmnožovacího materiálu rostlin, které obsahují výše definované transformované buňky.

Výhodná provedení zahrnují použití *E.coli* *asnA* genu kódujícího uvedený enzym a syntetických genů, kódujících tento enzym, zvláště genů, obsahujících kodony, které jsou zvláště vhodné pro rostliny. Vynález také zahrnuje geny, které kódují enzymy, mající různé složení aminokyselin, než přírodní enzymy, ale v podstatě se stejnou katalytickou aktivitou delecí nebo adicí kodonů nebo přemístěním kodonů v přírodních genech, které kódují různé aminokyseliny. Všechny tyto modifikace budou odborníkům zřejmé.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Expresa *E.coli* *asnA* genu v tabáku s malou podjednotkou promotoru RUBISCO

1. Produkce transgenních rostlin tabáku

Vztaženo na celou nukleotidovou sekvenci *asnA* genu z *E.coli* (Nakamura a spol., (1981) *Nucleic Acids Research*

18, 4673, obr.3) byl reklonován PstI-HgaI fragment z plasmidu pMY114 do pUC9. Pak byl asnA gen (1,1 kb) připojen k promotoru malé podjednotky genu pro hrachovou ribulozu 1,5-bifosfát-karboxylázu ("RUBISCO", Herrera-Estrella a spol. (1984) Nature 310, 115-120) a celý fragment byl zaveden do Agrobacterium vektoru pPCV001 (Koncz a Schell (1986) Mol.Gen.Genet. 204, 383-396). Po listové diskové transformaci SRI tabákových rostlin byly transgenní rostliny identifikovány na základě jejich rezistence vůči kanamycinu. Z transformantů byly vybrány dvě rostliny (ASP4, ASP5), které vykazovaly toleranci vůči ošetření 1 kg/ha PPT. Následkem tohoto PPT ošetření byly SRI kontrolní rostliny úplně zničena a nebylo možno nalézt takové, které by byly schopny kvést a produkovat semena. ASP4 a ASP5 transformanty vykazují symptomy pouze na menších a starších listech, zatímco meristematická oblast inhibici překonává. Při pokračování v růstu tyto rostliny kvetou a produkují semena.

Přirozenou selekcí ASP4 a ASP5 transgenních tabákových rostlin došlo k rozdělení populace semenáčků na sexuálně rezistentní a senzitivní potomstvo. Za podmínek in vitro za použití přítomnosti 10 μ M L-PPT v kultivačním mediu bylo zřejmé rozdělení mezi dvěma fenotypy.

Přítomnost asnA sekvence v genomu transformantů byla také prokázána hybridizací DNA dle Southerna. Po digesti rostlinných DNA EcoRI byl v transformovaných rostlinách zjištěn hybridizační fragment. Northern-hybridizační analýzou bylo v RNA izolované z ASP5 transformantu in vitro detegováno malé množství mRNA, která je homologní s asnA genem.

2. Redukovaná akumulace amoniaku v transgenních tabákových rostlinách

Inhibice GS aktivity PPT ošetřením vyvolává rychlé zvýšení koncentrace amoniaku v listech kontrolních tabákových rostlin. Rychlost akumulace amoniaku měřená mikrodifuzní metodou a následující Nesslerovou metodou (Shelp a spol. (1985) Can.J.Bot.63, 1135-1140) závisí na koncentraci aplikovaného herbicidu.

Při dávce 0,5 kg/ha překonávají transgenní rostliny působení ošetření PPT (tab.1).

Tabulka 1

Akumulace amoniaku v kontrolních tabákových rostlinách (SR1) a v transgenních rostlinách s asnA genem po postřiku 0,5 kg/ha PPT

Hodiny	koncentrace amoniaku (mM)		
	SR1	ASP4	ASP5
do 4	0,58	0,42	0,40
6	1,20	0,82	0,78
24	1,70	0,70	0,75
48	1,95	0,60	0,50

Snížená hladina akumulace je také zřejmá u těchto rostlin ve srovnání s SR1 tabákovými rostlinami po postřiku dávkou 1 kg/ha (tabulka 2). Stanovená nižší hladina amoniaku odpovídá nižšímu předpokládanému poškození transformovaných rostlin.

Tabulka 2

Účinky 1 kg/ha PPT na koncentraci amoniaku v tabákových (SR1) a transgenních rostlinách (ASP4, ASP5)

Hodiny	koncentrace amoniaku (mM)		
	SR ₁	ASP4	ASP5
až do 6	0,8	0,78	0,88
8	2,2	0,87	0,95
24	4,9	2,0	1,40
48	8,6	4,1	3,6

3. Stimulace růstu a vývoje rostlin

Detailní porovnání růstu mezi kontrolou a ASP rostlinami vykazuje výrazné rozdíly: pro transgenní rostliny byla charakteristická zvýšená rychlost růstu, ale výraznější stimulace byla dosažena ošetřením ASP rostlin malými dávkami PPT.

Základní jakož i PPT indukovaná akcelerace růstu může být demonstrována různými typy růstových křivek. Obr.1 ukazuje, že zatímco postřik 0,025 kg/ha PPT již inhibuje růst SR₁ rostlin, byla detegována u obou transformantů velká stimulace. Postřik 0,05 kg/ha PPT měl negativní vliv na všechny rostliny. Každý bod představuje průměr výšky tří rostlin.

Rozdíl mezi různými křivkami za kontrolních a ošetřených podmínek je také detegovatelný, jestliže se růst rostlin charakterizuje Baule Mitsdherichovými křivkami (obr.2) za podmínek růstu ve skleníku. Inhibice a stimulace růstu může být také vyjádřena sklonem grafu, který je charakterizován úhly alfa uvedenými na obr.2.

4. Zvýšení suché hmotnosti u transgenních rostlin

Mimo rozdílů ve výšce rostlin byly stimulační účinky také detegovány měřením suché hmotnosti. Údaje uvedené v tabulce 3 dokládají vyšší produktivitu asna transformantů:

Tabulka 3

Konečná suchá hmotnost (g) kontroly (SR1) a transformantů (ASP4, ASP5)

Linie	ošetření			
	kontrola		0,025 kg/ha PPT	
SR1	3,19	100 %	2,76	100 %
ASP4	3,85	120 %	4,79	173 %
ASP5	3,74	117 %	5,05	183 %

Příklad II

Působení *asnA* genu řízeného *CaMV35S* promotorem v transgenních rostlinách

1. Selektce transgenních rostlin

V alternativním pokuse byly zavedeny plasmidové molekuly (pUC) nesoucí *E.coli* *asnA* gen s *CaMV35S* promotorem do SR1 listových protoplastů přímým příjmem DNA (R.X.Fang a spol. (1989) *The Plant Cell* 1, 141-150). Transformanty byly přímo vybrány na základě jejich PPT rezistence. Rostliny byly regenerovány z mikrokalů kultivovaných za přítomnosti 10 μ M L-PPT. Southernova hybridizace potvrdila přítomnost *asnA* genu v DNA izolované z PPT rezistentních regenerantů.

2. Snížená akumulace amoniaku a zlepšená PPT tolerance v transgenních rostlinách

Přirozená selektce transformantů vede k rozdělení potomstva s různými hladinami PPT rezistence (medium doplněné až do 30 μ M L-PPT). V souladu s rezistentním fenotypem akumulují transformované rostliny méně amoniaku než SR1 rostliny, jestliže jsou postříkány 1 kg/ha PPT (tabulka 4).

Tabulka 4

Akumulace amoniaku po postřiku rostlin 1 kg/ha PPT

Hodiny	koncentrace amoniaku (mM)		
	SR1	ASP70	ASP95
6	6,85	2,92	1,95
24	9,50	5,60	5,10
48	22,3	13,60	17,40
120	58,60	28,30	35,6
144	113,00	39,40	50,00

3. Účinnost fotosyntézy

Kontrolní SR1 a transgenní tabákové rostliny byly charakterizovány různými parametry fotosyntézy jako je rychlost fixace CO_2 (Szajko a spol., Acta Agr. Acad. Hung. 20, 247-260) a indukce fluorescence (Hideg a spol., 1986, Photobiochem. Photobiophys. 12, 221-230). Za podmínek pěstování ve skleníku byly rostliny ošetřeny různými dávkami PPT a byl rovněž stanoven obsah amoniaku. Jak je zřejmé z tabulky 5 vykazují transgenní rostliny s ASN-A genem vykazují značné zvýšení účinnosti pletivové CO_2 fixace ve srovnání s kontrolními rostlinami. Aplikace nízké dávky PPT při ošetření může dále stimulovat CO_2 fixaci, zatímco rozdíl mezi SR1 rostlinami s nebo bez PPT (50 g/ha) ošetřením není statisticky významný. Tabulka 5 poskytuje také údaje o tom, že v případě tabákových rostlin inhibiční koncentrace PPT vyvolává akumulaci amoniaku s vážným poškozením fotosyntézy inhibicí transportu elektronů a 50% redukcí fixace CO_2 . Za stejných podmínek transformované rostliny (ASP70) mohou tolerovat ošetření v souvislosti s funkcí fotosyntézy.

Tabulka 5

Parametry fotosyntézy

Linie	PPT	kon-	fixa-	indukce fluorescence (v % kontroly SR1)			F_m	F_o	$F_i \cdot F_o / F_m \cdot F_o$
				ošet-	cen-	ce CO_2 ření trace ($\mu mol CO_2 / dm^2 \cdot h$)			
				(g/ha)	(mm)	$\bar{x}$ $\pm s_x$ n P 1%			
SR1	0	0,37	38,17	12,05	20	-	100	100	0,45
	50	2,00	44,23	17,73	20	-	101	102	0,44
	750	34,35	19,54	12,42	20	+	80	194	0,59
ASP70	0	0,47	49,32	7,86	20	+	98	114	0,38
	50	2,70	58,07	6,06	20	+	99	110	0,42
	750	15,80	31,61	14,16	20	-	92	144	0,49

Analýzy byly provedeny 4 dny po PPT ošetření.

4. Růst asnA rostlinných transformantů

Analýzy rychlosti růstu (mm/den) reprodukovatelně prokazují zrychlený růst transformantů během časného vývoje rostliny. Údaje uvedené v tabulce 6 se týkají rostlin ve skleníku.

Tabulka 6

Rychlost růstu (mm/den) během různých period vývoje rostlin (skleník)

Linie	periody (6 dní)								konečná výška rost- lin (cm)
	I	II	III	IV	V	VI	VIII	VIII	
SR1	0,29	0,45	0,27	0,52	0,75	1,31	1,93	1,37	41,08
ASP70/									
1	0,60	1,15	0,43	1,23	1,83	2,08	1,53	0,50	58,0 141%
Asp70/									
2	0,61	0,93	0,50	0,75	1,18	1,51	1,83	0,25	48,5 118%

SR1: průměr z 5 rostlin

ASP70/1 a ASP/2: jednotlivé rostliny

Analýzy rostlin za polních podmínek vykazují podobné rozdíly, jaké byly pozorovány ve skleníku (tabulka 7). Rychlost růstu ASP rostlin během periody I-III byla značně vyšší než v případě SR1 rostlin. V tomto pokuse byl stimulační účinek PPT na transgenní rostliny také potvrzen zejména v poslední růstové periodě. Baule-Mitscherlichovy křivky (obr.3) zřetelně dokládají, že ASP rostliny vykazují rychlejší růst než kontrolní SR1 rostliny v polních podmínkách.

Tabulka 7

Rychlost růstu (mm/den) během různých period vývoje rostlin (polní pokus)

Ošetře- ní	linie	periody (7 dní)				konečná výš- ka rostliny	
		I	II	III	IV	(cm)	
kontrola	SR1	0,36	0,85	1,31	3,24	42,5	100 %
	Asp70	0,45	1,07	1,50	3,14	47,6	112 %
	Asp95	0,45	1,14	1,92	3,24	51,5	121 %
25 g/ha PPT	SR1	0,29	0,56	1,15	2,74	35,0	100 %
	Asp70	0,44	1,02	1,69	3,84	53,8	154 %
	Asp95	0,31	0,88	1,27	3,78	48,7	139 %

Průměr ze tří rostlin

5, Produktivita asna transformantů

Jak je zřejmé z tabulky 8 zvýšila se celková zelená hmota jakož i suchá hmotnost u ASP rostlin ve srovnání s SR1 rostlinami. Bylo také zřejmé, že transgenní rostliny jsou významně stimulovány ošetřením PPT. Současně již byly kontrolní SR1 rostliny již postřikem inhibovány.

Tabulka 8

Zelená hmota (g)

polní test

Linie	kontrola				25 g/ha PPT			
	celkem		listy		celkem		listy	
		%		%		%		%
SR1	86,5	100	57,4	100	78,7	100	43,4	100
ASP70	95,2	110	62,3	108	139,9	178	92,41	213
ASP95	103,8	120	68,4	119	105,0	133	71,56	165

Suchá hmotnost (g)

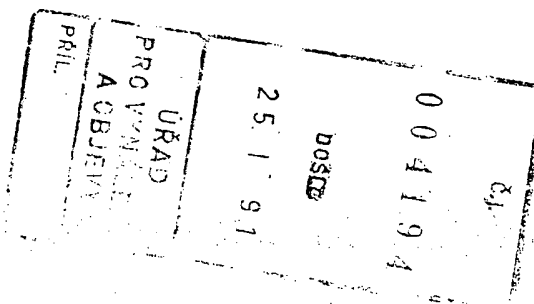
polní test

Linie	kontrola				25 g/ha PPT			
	celkem		listy		celkem		listy	
		%		%		%		%
SR1	6,66	100	4,83	100	6,42	100	5,05	100
ASP70	8,05	121	5,82	120	10,99	171	8,56	169
ASP95	8,48	127	6,34	131	8,96	140	6,78	134

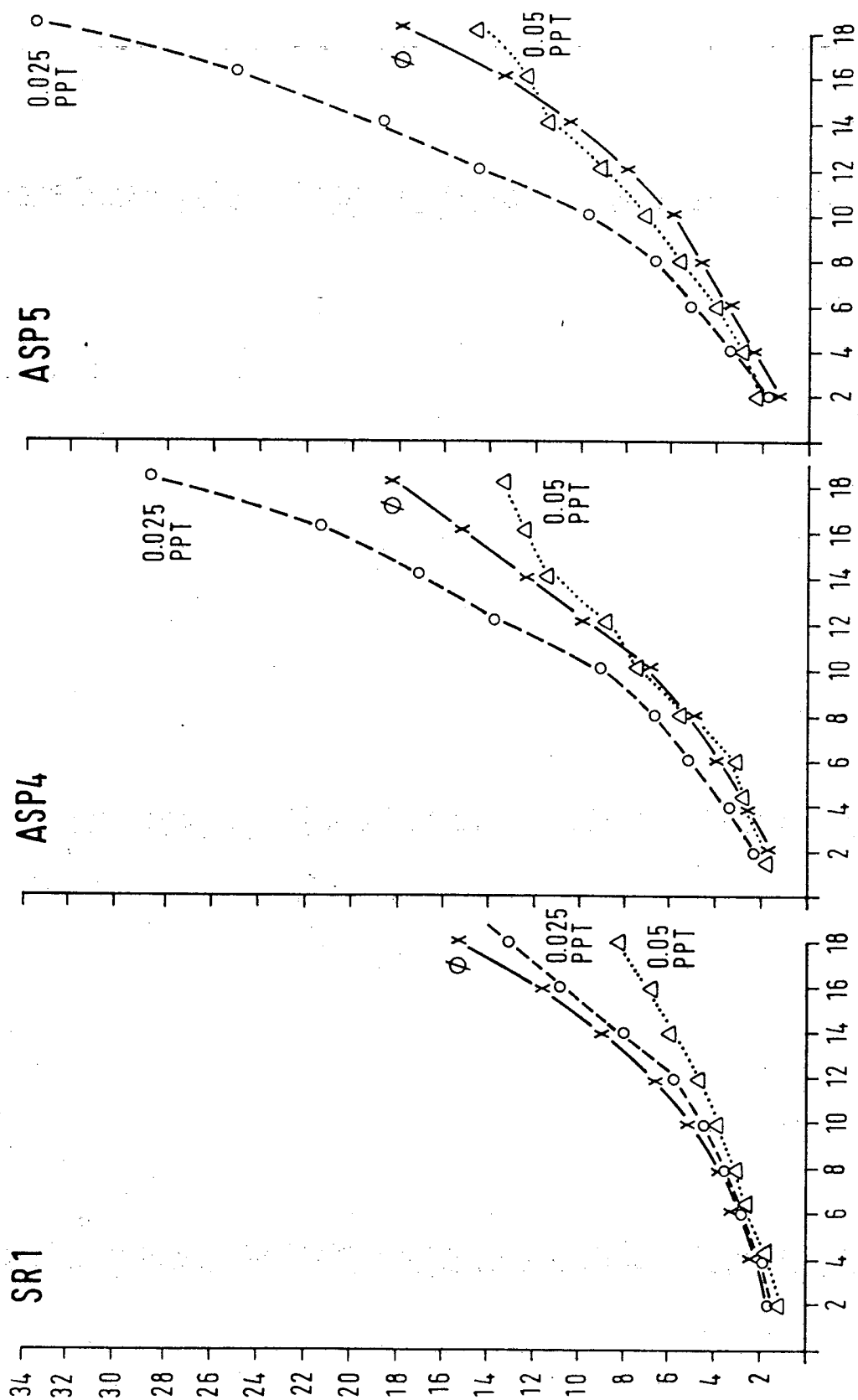
Všechny údaje jsou průměry z 5 rostlin.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy transgenních rostlinných buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje zavedení prokaryotické amoniak-specifické asparaginsyntetázy (ASN-A) do těchto buněk.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje zavedení genového konstruktů, obsahujícího gen kódující prokaryotickou ASN-A, operativně připojený k regulátorové sekvenci, který působí expresi tohoto genu v rostlinné buňce, do uvedené buňky.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou ASN-A je E.coli ASN-A.
4. Způsob podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že gen kódující ASN-A obsahuje rostlinné specifické kodony.
5. Způsob přípravy rostlin, semen nebo množitelského materiálu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje rozmnožování buněk získaných způsobem podle kteréhokoliv z předcházejících nároků.



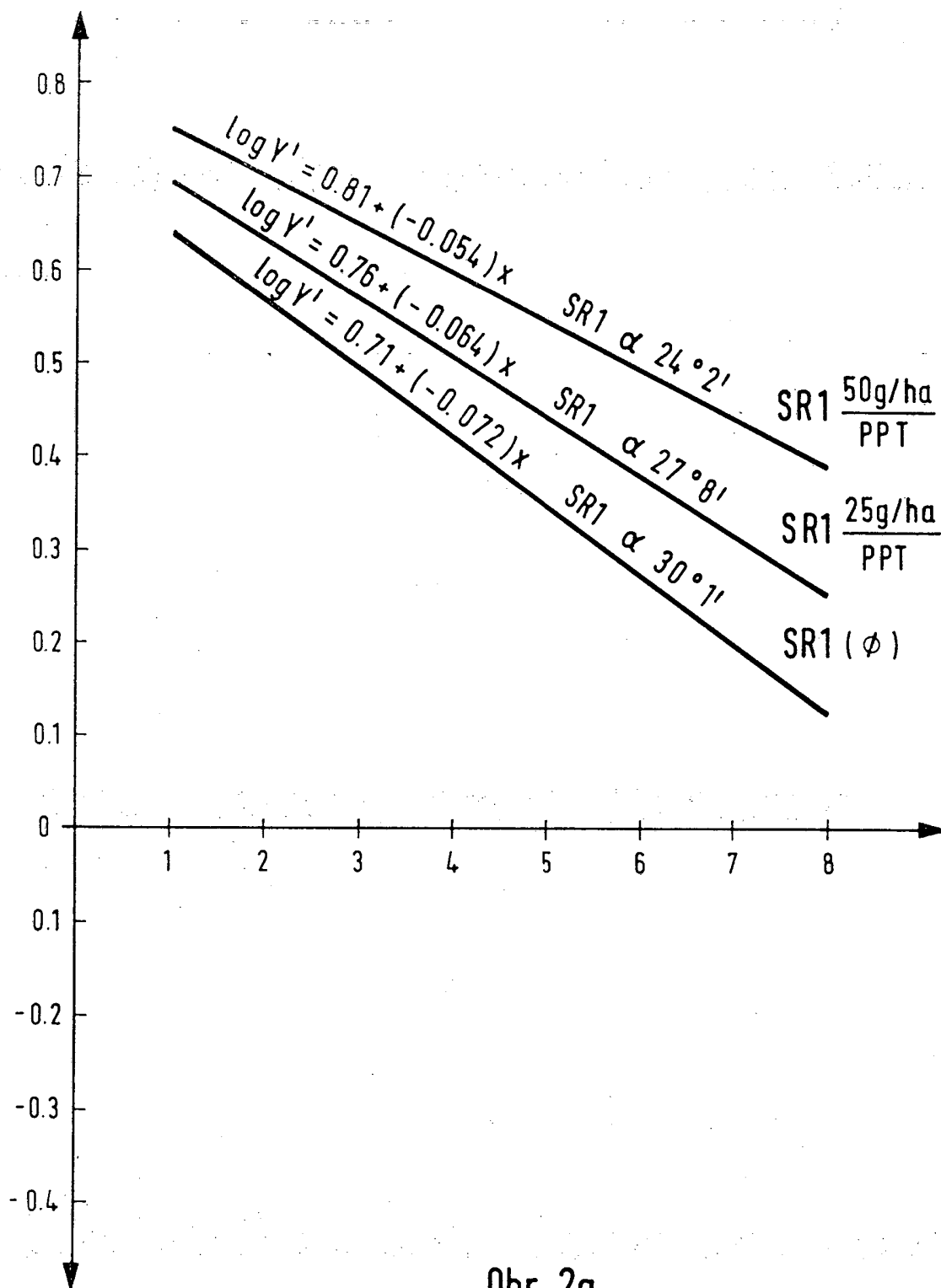
004191
25.1 91
JRAP
PROVINTA
ACB
PRIL



0br.1

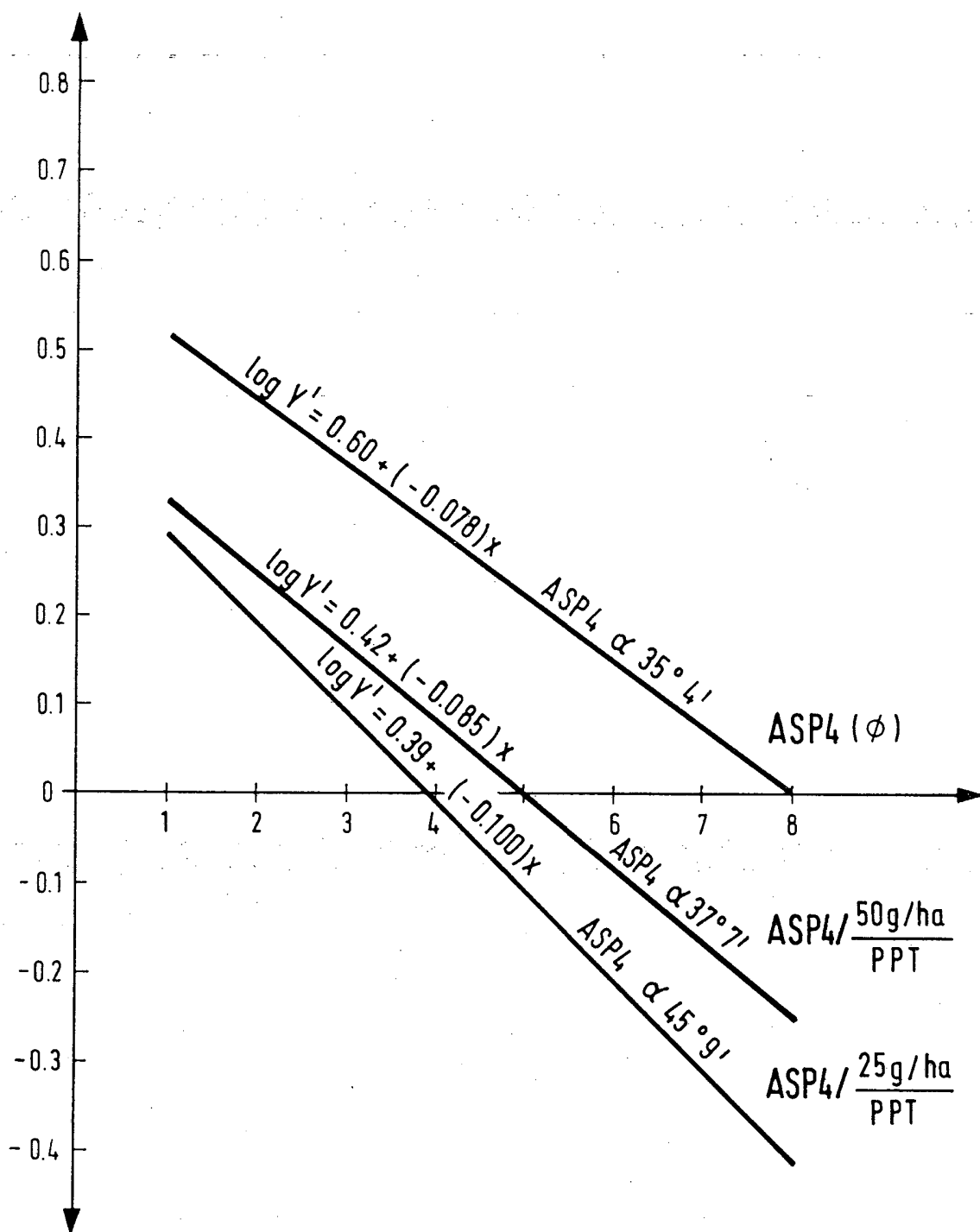
70 165-911

00413
25.1.91
DOSTA
URAD
PRO VYV.
A ORJ.
PRIL.



Obr. 2a

74 165-914
00419
25.1.91
DOSTO
URAD
PROVN/ML
A0815
RIL



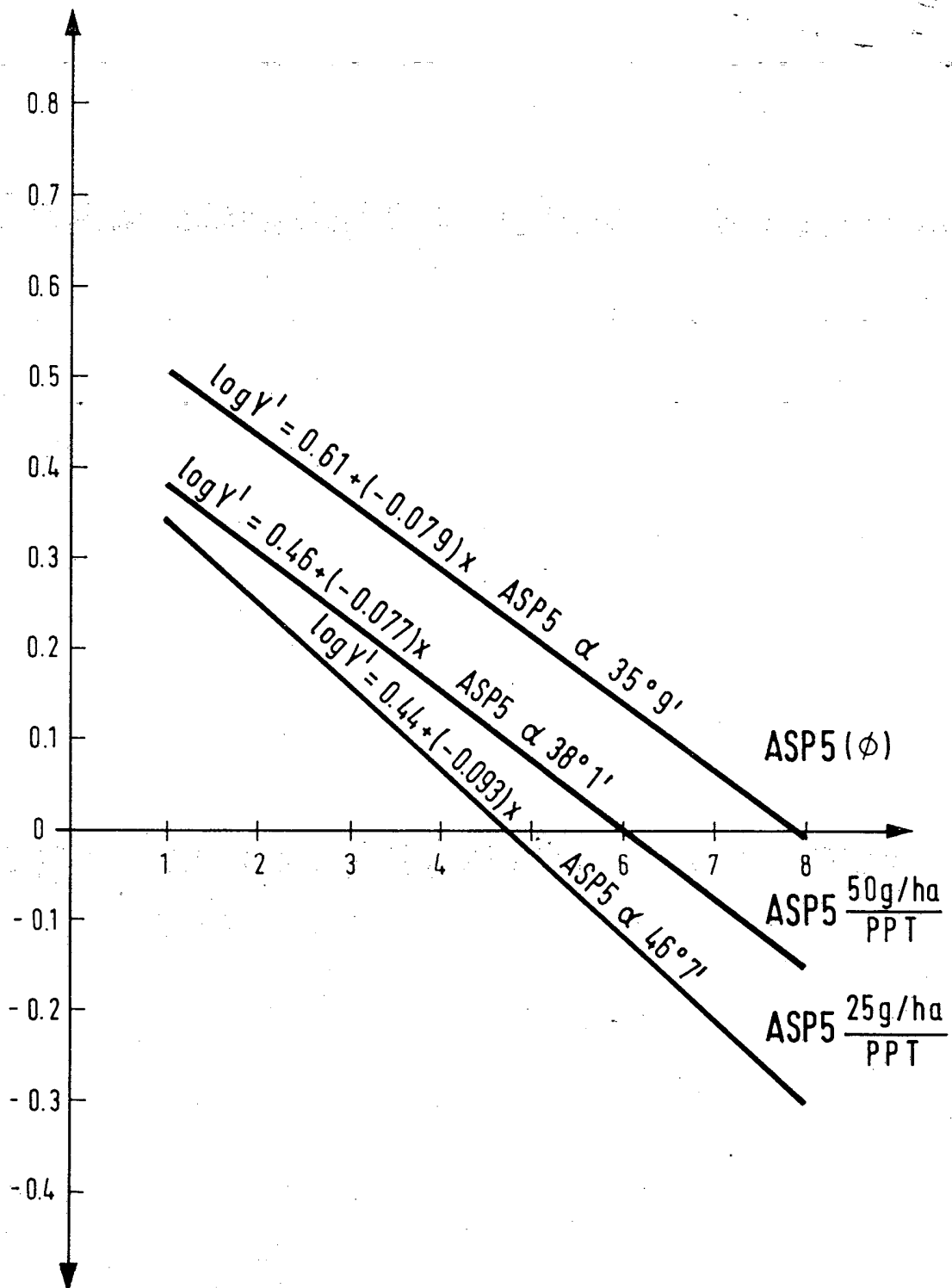
Obr. 2b

001191

25. 1. 97

Posta

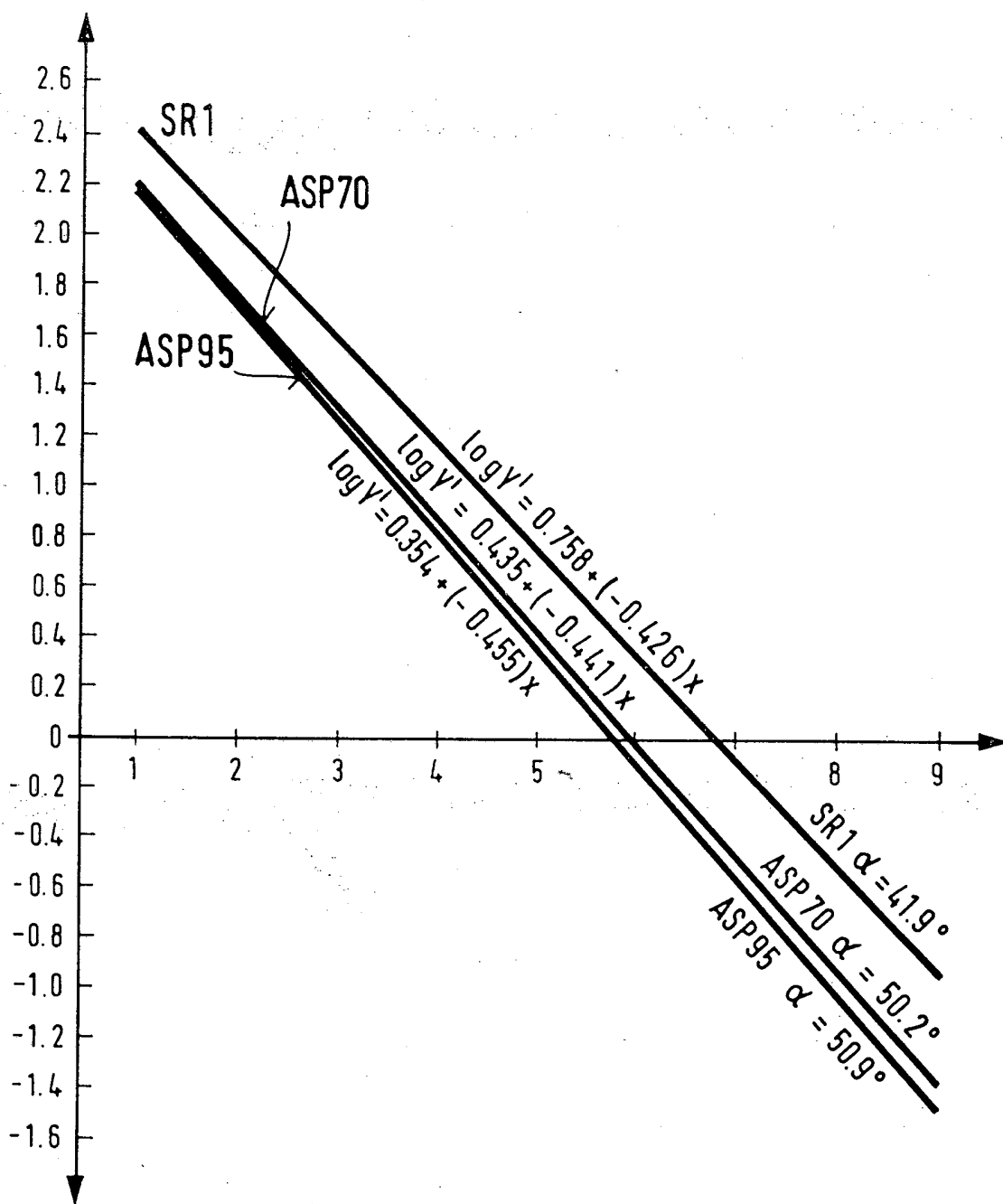
URAD
PROSTORNA
AGENCIJA
PRIL.



Obr. 2c

DV 165-914

004194	25 1 97	PROVYNA A OBUJ	URAD
--------	---------	-------------------	------



Obr.3