



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

213 580 B

(21) A bejelentés ügyszám: 2100/87
(22) A bejelentés napja: 1987. 03. 11.
(30) Elsőbbségi adatok:
86400521.0 1986. 03. 11. GB
87400141.5 1987. 01. 21. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 87/00141
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 87/05629

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 5/14

C 12 N 15/82

C 12 N 15/54

(40) A közzététel napja: 1988. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 08. 28.

(72) Feltalálók:

Botterman, Johan, Zwijnaarde (BE)
Leemans, Jan, Heusden (BE)
Mouva, Rao, Genf (CH)
Thompson, Charles, Genf (CH)
de Block, Mark, Gentbrugge (BE)

(73) Szabadalmazók:

BIOGEN Inc., Cambridge, Massachusetts (US)
Plant Genetic Systems N.V., Brüsszel (BE)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **Géntechológiai eljárás glutamin-szintetáz-gátlóknak ellenálló
növényi sejtek és növények előállítására, valamint eljárás ilyen növények
esetében növényi és gombakártevők irtására**

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás foszfinotricin herbicid hatásával szemben toleráns vagy rezisztens növényi sejtek előállítására oly módon, hogy a kiindulási növényi sejt nukleáris genomjába egy, a következőket magába foglaló rekombináns DNS-t építenek be:

a) az említett növényi sejt polimeráza által felismerhető promotert tartalmazó promoter-régiót, és

b) foszfinotricin vonatkozásában acetyl-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t magába foglaló kódoló szakasz.

A találmány vonatkozik továbbá foszfinotricin herbicid hatásával szemben toleráns vagy rezisztens növények és növényi szaporítóanyagok, valamint transzformált növényi sejtek tiszta tenyészetének előállítására, valamint az így előállított növények szelektív védelmére glutamin-szintetáz-gátlókkal végzett gyom és gombakártevő irtás esetén.

A találmány tárgya eljárás glutamin-szintetáz-gátlók hatásával szemben ellenálló növények és növényi szaporítóanyagok előállítására.

A találmány tárgya továbbá ennek az eljárásnak az alkalmazása különösen meghatározott növények ellenállásának kialakítására herbicidekkel szemben.

A találmány vonatkozik továbbá nem biológiai úton transzformált növényi sejtekre és növényekre is, amelyek ellenállást tanúsítanak glutamin-szintetáz-gátlókkal szemben; valamint olyan DNS-fragmentumok és rekombinánsok előállítására, amelyek a glutamin-szintetáz-gátlókkal szemben megnyilvánuló ellenállást kódoló nukleotid-szekvenciákat tartalmaznak.

A glutamin-szintetáz enzim (ezt az alábbiakban rövidítve „GS”-nek jelöljük) a legtöbb növényben életfontosságú enzim a növényi sejtek fejlődésében és életében. Ismert, hogy a GS katalizálja a glutamát glutaminná való átalakulását. A GS szerepet játszik egy hatékony reakciósorban (jelenleg egyedül ezt ismerik) a legtöbb növény esetében, amelynek során a nitrát redukciójából, az aminosavak bomlásából vagy a fotolégzésből eredő ammónia detoxifikálódik. Ennek következtében a GS enzim hatásosan gátló anyagok a növényi sejtekre igen toxikusak.

Kidolgozták a herbicideknek egy különleges csoportját, amelyek hatásának az alapja a növényekben lévő GS gátlásának tulajdonítható toxikus hatás. Ezeknek a herbicid szereknek a hatóanyaga valamilyen GS-gátló anyag.

Legalább két út lehetséges, amelyeken haladva a GS hatását gátló anyagokkal szemben ellenálló növényekhez juthatunk: (1) a célvegyület megváltoztatása; várható, hogy a GS enzim mutációi a herbiciddel szemben való érzéketlenséget idézhetnek elő; és (2) a herbicid inaktiválása: a herbicidnek növényen belüli lebomlása vagy változtatása rezisztenciához vezethet.

A bialaphos és foszfinotricin (ez utóbbit PPT-vel rövidítjük) két ismert GS-gátló hatóanyag [Mol. Gen. Genet. 205, 42 (1986); J. Plant Phys. 123, 135 (1986)], amelyek kiváló herbicid sajátosságokat mutatnak (részletesebben lásd: Proc. 1982, British Crop Protection Conference, 439–450). A bialaphos szerkezetét az (I) képlet, a PPT szerkezetét a (II) képlet ábrázolja.

Mint látható, a PPT és a bialaphos közötti szerkezeti különbség abban áll, hogy a PPT molekulája két alanincsoporttal kevesebbet tartalmaz.

E két herbicid hatóanyag nem szelektív: az adott talajon lévő valamennyi növényfaj növekedését gátolják, és ennek megfelelően teljes pusztulásukat idézik elő.

Ezért számos kísérlet történt már arra, hogy a növények ellenálló képességét biotechnológiai úton fokozzák e herbicidekkel szemben.

A 0173 327 sz. európai szabadalmi leírás a glutaminszintetázinhibitor bialaphost kódoló DNS-fragmentumot ismerteti, amelyet egy *S. hygroscopicus* törzsből nyertek, valamint ismerteti más *S. hygroscopicus* törzsek transzformálását e DNS-fragmentummal. A leírás szerint a növények bialaphos-szal szembeni rezisztenciája 2–5-szörösére emelhető, amit egy a pMSB12–1 plazmidban jelenlévő rezisztencia génnek tulajdonítanak. Ennek bi-

zonyítására, valamint arra vonatkozóan, hogy ez a gén hogyan fejt ki hatását, a leírás semmiféle kitanítást nem tartalmaz.

A Journal of Mol. and Appl. Gen. 2.6, 1984, 621–634 publikációban a szerzők bizonyos lucerna-sejtvonalak izolálását ismertetik, amelyek ellenállóbbak a foszfinotricin herbiciddel szemben mint a vadlucerna. Ezekben a lucerna-sejtvonalakban glutamin szintetáz túlermelést hoznak létre egy *endogén* DNS-fragmentum kifejeződése által. Ismertetik a glutamin szintetáz kódoló cDNS-szekvenciát is.

A Nature, 317, 1985, p 668 publikációban növények módosított EPSP-szintáz kódoló heterológ DNS-sel végzett transzformációját ismertetik, amikor is a transzformált növények tűrőképessége a glifoszfáttal szemben az EPSP-szintáz expressziójától függő mértékben nőtt.

A WO 84/02913 számú a szabadalmi leírásban növények transzformálására alkalmas kiméra gént ismertetnek, amely egy promotert, egy heterológ struktúrgént – amely a növény herbicidrezisztenciáját biztosító fehérjét kódolja – és egy 3'-nem-transzlációs szakaszt tartalmaz. A példák alapján a heterológ struktúrgén egy az *E. coli*-ből származó EPSP-szintáz kódoló gén, amely lehetővé teszi, hogy a transzformált növényben EPSP-szintáz túlermelés menjen végbe és így biztosítja, hogy a növény glifoszfáttal szemben ellenállóbb legyen.

A bialaphosról előbb az antibiotikus sajátosságait ismerték fel, amelyek peszticidként vagy fungicidként való alkalmazását tették lehetővé. A bialaphos a 3 832 394 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint állítható elő, s erre a leírásra a továbbiakban hivatkozunk. Az előállítás során a *Streptomyces hygroscopicus*-t (amely az „American Type Culture Collection” gyűjteményben ATCC 21, 705 sorszámon található az 1982. évi katalógus 205. oldalán) tenyésztik, majd a bialaphost a tenyészfolyadékából elkülönítik. E vegyület más törzsekből – például a *Streptomyces viridochromogenes* törzsből – is előállítható (Helv. Chim. Acta 1972; l. még DSM 40736 szám alatt az 1983. évi DSM katalógus 149. oldalán).

A PPT szerkezeti egységet egyéb, a természetben található tripeptid antibiotikumokat is tartalmaznak: például a phosalicin [J. of Antibiotics 37, 939 (1984)].

A PPT kémiai úton is előállítható; a Hoechst-cég hozza forgalomba.

Számos *Streptomyces*-fajt fedeztek fel, amelyek igen aktív antibiotikumokat termelnek: ezek a prokarióta-sejtek funkcióit vagy enzimeit gátolják. Az ilyen antibiotikumot termelő *Streptomyces*-fajok elpusztulnának, ha nem rendelkeznének önvédelmi mechanizmussal ezen antibiotikumokkal szemben. Számos esetben úgy találták, hogy ez az önvédelmi mechanizmus olyan enzim, amely az antibiotikum hatását gátolni képes, és így az antibiotikumnak a termelő *Streptomyces*-törzsre kifejtett toxicitását kivédi.

Számos antibiotikum-termelő *Streptomyces*-fajban – például az *S. fradiae*, *S. azureus*, *S. vinaceus*, és *S. erythraeus* fajokban, amelyek neomicint, tiostreptont, viomicint és MLS-antibiotikumot (makrolid-linkozamid-sztreptogramint) termelnek – olyan gén jelenlétét

mutatták ki, amely képes olyan enzimet kódolni, amely az antibiotikumot módosítja (elváltoztatja), és így gátolja a gazdaszervezettel szemben megnyilvánuló antibiotikus hatást [Nature 286, 525 (1980); J. Bacteriol., 1982, 678; Gene 20, 51 (1982)]. Chater és munkatársai [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 96, 69 (1982)] olyan módszert írtak le, amely e hatások kimutatására alkalmas.

Azt találtuk, hogy a *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 21,705 mikroorganizmusnak olyan génje van, amely a bialaphos antibiotikus sajátságainak inaktiválásért felelős enzimet kódolja. Kísérleteink során izoláltunk egy ilyen gént, és eljárást dolgoztunk ki PPT-re és rokonvegyületeire alapozott GS-gátlók hatásának kioltására.

A találmány egyik célja új eljárás kidolgozása GS-gátlók hatásának kioltására növényi sejtekben és növényekben.

A találmány egy másik célja olyan DNS-fragmentumok és DNS-rekombinánsok – különösen az ilyen DNS-fragmentumokat tartalmazó, módosított vektorok előállításának – kidolgozása, amely DNS-fragmentumokban tartalmazott nukleotid-szekvenciák a növényi sejtekbe és növényekbe ágyazva képesek azokat megvédeni a GS-gátlók hatásától.

A találmány további célja olyan, nem biológiai úton transzformált növényi sejtek és növények létrehozása, amelyek képesek GS-gátlók közömbösítésére vagy inaktiválására.

A találmánynak még további célja eljárás kidolgozása növényfajok szelektív megvédésre GS-gátló típusú herbicidek ellen.

Közelebbről, a találmány egyik célja olyan DNS-fragmentum kidolgozása, amely növényi sejtekre és teljes növényekre átvihető, és amely képes azokat a bialaphos és szerkezetileg rokon herbicidek hatásával szemben megvédeni.

A találmány egy másik célja olyan növényi sejtek kialakítása, amelyek a bialaphos-típusú termékekkel szemben – amelyek szerkezetükben PPT-egységet tartalmaznak – ellenállók.

A találmány értelmében GS-gátló anyagokkal érintkező növényi sejtekben és egész növényekben a GS-gátló hatását úgy küszöböljük ki, hogy ezeket a növényeket olyan, idegen nukleotid-szekvenciát tartalmazó, heterológ DNS-fragmentummal látjuk el, amely képes fehérje alakjában történő kifejeződésre az adott növényi sejtekben és teljes növényekben olyan körülmények között, amelyek következtében a heterológ DNS-fragmentum generációkon át stabilan integrálódik (beépül) a növénynek a sejtjeibe; és az így kifejezett fehérjének az enzimhatása képes a GS-gátló anyag inaktiválására vagy közömbösítésére.

Előnyös DNS-fragmentum az antibiotikum-termelő *Streptomyces*-törzsből származó egyik olyan fragmentum (vagy olyan nukleotid-szekvencia, amely azonos aktivitást kódol), amely a GS-gátlókkal szemben mutatót ellenállást kódolja.

A találmány megvalósításában előnyösen alkalmazható nukleotid-szekvenciák olyan fehérjét kódolnak, amelyek a GS-gátlókkal szemben acetyl-transzferáz hatással rendelkeznek.

A találmány szerint egyik legelőnyösebb DNS-fragmentum egy olyan nukleotid-szekvenciát tartalmaz, amely a PPT-vel szemben acetyl-transzferáz hatással bíró polipeptidet kódol.

Egy különösen előnyös találmány szerinti DNS-fragmentum a növényi sejtek átalakítása céljából olyan nukleotid-szekvenciát tartalma, amely a következő szekvenciát tartalmaz, amely a következő szekvenciát tartalmazó polipeptidnek legalább egy részét kódolja:

10
15
20
25
30

I SER PRO GLU

183
ARG ARG PRO ALA ASP ILE ARG ARG ALA THR GLU ALA ASP MET PRO
228
ALA VAL CYS THR ILE VAL ASN HIS TYR ILE GLU THR SER THR VAL
273
ASN PHE ARG THR GLU PRO GLN GLU PRO GLN GLU TRP THR ASP ASP
318
LEU VAL ARG LEU ARG GLU ARG TYR PRO TRP LEU VAL ALA GLU VAL
363
ASP GLY GLU VAL ALA GLY ILE ALA TYR ALA GLY PRO TRP LYS ALA
408
ARG ASN ALA TYR ASP TRP THR ALA GLU SER THR VAL TYR VAL SER
453
PRO ARG HIS GLN ARG THR GLY LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS
498
LEU LEU LYS SER LEU GLU ALA GLN GLY PHE LYS SER VAL VAL ALA
543
VAL ILE GLY LEU PRO ASN ASP PRO SER VAL ARG MET HIS GLU ALA
588
LEU GLY TYR ALA PRO ARG GLY MET LEU ARG ALA ALA GLY PHE LYS
633
HIS GLY ASN TRP HIS ASP VAL GLY PHE TRP GLN LEU ASP PHE SER
678
LEU PRO VAL PRO PRO ARG PRO VAL LEU PRO VAL THR GLU ILE
723

35
40

Itt X jelentése MET vagy VAL; a polipeptidnek ez a része elegendő hosszúságú ahhoz, hogy a növényi sejteknek bialaphos-szal szemben védelmet biztosítson, ha ezt a szekvenciát genetikusan beépítjük, és abban kifejezzük; ebben az esetben a bialaphos-szal szemben növényvédő képességet nyújt.

Egy előnyös DNS-fragmentum az alábbi nukleotid-szekvenciából –

45
50
55
60

GTG AGC CCA GAA

183
CGA CGC CCG GCC GAC ATC CCG CGT GCC ACC GAG CGG GAC ATG CCG
228
GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC CAC TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC
273
AAC TTC CGT ACC GAG CCG CAG GAA CCG CAG GAG TGG ACG GAC GAC
318
CTC GTC CGT CTG CCG GAG CGC TAT CCC TGG CTC GTC GCG GAG GTG
363
GAC GGC GAG GTC GCC GGC ATC GCC TAC GCG GGC CCC TGG AAG GCA
408
CGC AAC GCC TAC GAC TGG ACG GCC GAG TCG ACC GTG TAC GTC TCC
453
CCC GCG CAC CAG CCG ACG GGA CTG GGC TCC ACG CTC TAC ACC CAC
498
CTG CTG AAG TCC CTG GAG GCA CAG GGC TTC AAG AGC GTG GTC GCT
543
GTC ATC GGG CTG CCC AAC GAC CCG AGC GTG CCG ATG CAC GAG GCG
588
CTC GGA TAT GCC CCC CCG GGC ATG CTG CCG GCG GCC GGC TTC AAG
633
CAC GGG AAC TGG CAT GAC GTG GGT TTC TGG CAG CTG GAC TTC AGC
678
CTG CCG GTA CCG CCC CGT CCG GTC CTG CCC GTC ACC GAG ATC
723

vagy annak egyik részéből áll, amely olyan polipeptidet fejez ki, amelynek a bialaphos-szal szemben növényvédő képessége van.

A találmány vonatkozik továbbá bármilyen DNS-fragmentumra, amely a fenti előnyös DNS-fragmentumtól abban különbözik, hogy bármely nukleotid-egységét más nukleotid-egység helyettesíti, azonban a fentebb említett, előnyös DNS-szekvencia genetikai információjának módosulása nélkül (normálisan az egyetemes genetikai kódon belül marad); továbbá a találmány vonatkozik bármely egyenértékű DNS-szekvenciára is, amely olyan polipeptidet kódol, amelynek azonos sajátosságai vannak, különösen a bialaphos elleni rezisztencia szempontjából.

Nyilvánvaló, hogy a tapasztalt szakember könnyen ki tudja értékelni a nukleotid-szekvenciáknak azon részeit, amelyek bármely találmány szerinti DNS-fragmentum bármelyik oldaláról eltávolíthatók, például úgy, hogy a DNS-fragmentum bármelyik oldalának terminális részét eltávolítjuk, például egy exonukleolitikus enzimmel – így a Bal31 segítségével – majd a megmaradó fragmentumot megfelelő plazmidban újraplónozzuk, és megállapítjuk a módosított plazmidnak a képességét a megfelelő sejtek transzformálására és bialaphos antibiotikummal vagy herbiciddel szembeni megvédésére, megfelelő mérő módszer segítségével.

A rövidség kedvéért ezeket a DNS-fragmentumokat az alábbiakban „bialaphos-rezisztencia-DNS”-nek nevezzük. Ugyanígy a megfelelő polipeptidet „bialaphos-rezisztencia-enzim”-nek jelöljük.

Jóllehet a fenti leírásban különös hangsúlyt helyeztünk azokra a DNS-fragmentumokra, amelyek a növényi sejtekbe vagy a növényekbe bevezetve védelmet biztosítanak azoknak a bialaphos vagy PPT ellen, nyilvánvaló, hogy a találmány semmiképpen sem korlátozható azokra.

Ugyanígy, a találmány olyan DNS-fragmentumokra is vonatkozik, amelyek ilyen növényi sejtekbe bevezetve más GS-gátlókkal szemben ezeknek a sejteknek védelmet biztosítanak: például olyan közbenső termékekkel szemben, amelyek a PPT természetes bioszintézisében szerepelnek, és amelyeket MP101 jelöléssel [lásd a (III) képletet] vagy MP102 jelöléssel rövidítenek [lásd a (IV) képletet].

A találmány általános vonatkozásban megnyitja az utat olyan DNS-fragmentumok előállításához, amelyek növényi sejtekbe és növényekbe alkalmas módon beépítve azokat a velük érintkező GS-gátlókkal szemben megvédeni képesek; ezt az alábbiakban a bialaphos és PPT vonatkozásában a példákban részletesen ismertetjük.

Ennek megállapítása után nyilvánvaló, hogy bármely fragmentumot, amely olyan enzimaktivitást kódol, amely növényi sejteket és növényeket a fentebb említett GS-gátlókkal szembeni inaktiválás útján megvéd, a fentiekben kifejtett, előnyös fragmentumokkal egyenértékűnek kell tekinteni. Ez különösen érvényes bármely DNS-fragmentumra, amely baktériumtörzsek, különösen antibiotikum-termelő törzsek genomjában lévő DNS-k genetikai szűrővizsgálatából származik, és valószínűleg olyan géneket tartalmaz, amelyek – bár szerke-

zetileg különböznek – a bialaphos vagy PPT vonatkozásában hasonló aktivitást kódolnak; sőt olyanokra is, melyek más GS-gátlók vonatkozásában kódolnak hasonló aktivitást. Ez érvényes továbbá más, valamilyen PPT-származékot termelő törzsek bármely génjére is. Nyilvánvaló tehát, hogy a „bialaphos-rezisztencia-DNS” és „bialaphos-rezisztencia-enzim” kifejezések, amelyeket rövidség és célszerűség okából használunk az alábbiakban, nemcsak azokra a DNS-ekre és enzimekre vonatkoznak, amelyek specifikusak a PPT vagy közvetlen közeli rokonai elleni rezisztencia szempontjából, hanem általánosabban más olyan DNS-ekre és enzimekre is vonatkoznak, amelyek azonos körülmények között a GS-gátlók hatását növényekben inaktíválni képesek.

A találmány továbbá olyan DNS-rekombinánsokra is vonatkozik, amelyek a fentiekben definiált bialaphos-rezisztencia-DNS fragmentumokat heterológ DNS-val rekombinálva tartalmazzák úgy, hogy a heterológ DNS szabályzó elemeket tartalmaz, és a bialaphos-rezisztencia-DNS e szabályzó elemeknek a kontrollja alatt áll olyan módon, hogy az ezen szabályzó elemekkel összeegyeztethető, idegen sejt környezetben kifejeződésre képes. Különösen lényeges, hogy a fentebb említett bialaphos-rezisztencia-DNS fragmentumok, amelyek a DNS-rekombinánsokban jelen vannak, nem tartalmaznak olyan DNS-szakaszt, amely a bialaphos bioszintézisében részt vesz, ha a bialaphos-rezisztencia-DNS fragmentum bialaphost termelő törzsből származik.

A „heterológ DNS” megfogalmazás azt jelenti, hogy a DNS más eredetű, mint a bialaphos-rezisztencia DNS, például nem a *Streptomyces hygroscopicus*-ból vagy *Streptomyces viridochromogenes*-ből ered, vagy még előnyösebben a *Streptomyces*-DNS-től eltérő. A fentebb említett szabályzó elemek olyan szerkezeti egységek, amelyek képesek az idegen környezetben a DNS-szekvenciák átírásának (transzkripciójának) és lefordításának a szabályzására. „Celluláris” megjelölés mind mikroorganizmusokra, mind sejttenyészetekre vonatkozik.

A heterológ DNS lehet baktérium-eredetű DNS, különösen akkor, ha nagyobb mennyiségű rekombináns DNS előállítása szükséges, például amplifikáció céljára. Ebben a vonatkozásban egy előnyös heterológ DNS az *E. coli* DNS vagy az *E. coli*-val összeegyeztethető DNS. Ez a DNS lehet azonos eredetű az illető sejt DNS-ével vagy egyéb DNS, például vírusból származó vagy plazmid-DNS, amelyekről ismeretes, hogy a megfelelő sejtekben replikációra képesek.

Az előnyös rekombináns DNS a növényi sejtekkel összeegyeztethető heterológ DNS-t, különösen Ti-plazmid DNS-t tartalmaz.

Különösen előnyösek azok a rekombinánsok, amelyek GS-gátló anyagokat inaktíváló DNS-t tartalmaznak a növényi sejtek által felismerhető promotor anyag szabályzása alatt, különösen azon növényi sejtek vonatkozásában, amelyekre a GS-gátlók inaktíválási képességét átvenni kívánjuk.

A találmány szerinti előnyös rekombinánsok továbbá módosított vektorok, különösen plazmidok, amelyek a GS-gátlókat inaktíváló DNS-t a szabályzó egységek, különösen a promotor elemek szempontjából olyan hely-

zetben tartalmazzák, hogy lehetővé teszik a GS-gátlókat inaktiváló DNS átírását és lefordítását (transzkripcióját és translációját) heterológ DNS-val összeegyeztethető sejt környezetbe. Előnyösek azok a vektorok, amelyek stabilan beépíteni képesek a GS-gátló anyagokat inaktíváló DNS-t idegen sejtekbe, különösen azok genomjában tartalmazott DNS-ba. Előnyösek az olyan, módosított vektorok, amelyek lehetővé teszik a növényi sejtek stabil átalakulását, és a megfelelő sejteket GS-gátlókat inaktiváló képességgel ruházzák fel.

Amint a későbbiekben leírjuk, úgy látszik, hogy a *Streptomyces hygroscopicus* törzs bialaphos-rezisztencia génjének az indító kodonja egy GTG kodon; az előnyös rekombináns DNS-ben vagy vektorokban azonban a bialaphos-rezisztencia gént módosítjuk úgy, hogy egy ATG indító kodonnal helyettesítjük a GTG indító kodont; ez az ATG teszi lehetővé a lefordítás megkezdését a növényi sejtekben.

Az alábbi következő példában az alkalmazott növényi promotor-szekvencia 35 S kelvirág-mozaikvírus promotor-szekvenciájából állt. Szükségtelen megjegyeznünk, hogy a tapasztalt szakember más növényi promotor-anyagokat is ki tud választani, ha ezek az illető növényfajták szempontjából alkalmasabbak.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja szerint – különösen akkor, ha kívánatos a bialaphos-rezisztencia-DNS által kódolt enzim átvitele a kloroplasztokba – a heterológ DNS-fragmentumot olyan génbe vagy DNS-fragmentumba építjük, amely egy tranzit-peptidet kódol, és ezt követően ezt a fragmentumot a GS-gátló anyagokat inaktiváló gén és a választott növényi promotor közé építjük be.

Az említett kémiai egységek és szerkezetek felépítésére alkalmas módszerek vonatkozásában a következő, tudományos közleményekre hivatkozunk: *Nature* 313, 358 (1985); *Embo. J.* 4, 401, 25.

Emlékeztetünk továbbá arra, hogy a „tranzit-peptiden” olyan polipeptid-fragmentumot értünk, amely általában egy kloroplaszt-fehérjéhez vagy kloroplaszt-fehérje alegységekhez kapcsolódik egy olyan prekursor-fehérjében, amelyet a növényi sejt mag-DNS-e kódol. A tranzit-peptid azután leválik a kloroplaszt-fehérjéről, vagy proteolitikus úton lehasad a fehérjének a kloroplasztra való áthelyeződése során. Alkalmas tranzit-peptidek például a kisméretű ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz alegységgel kapcsolt tranzit-peptidek vagy klorofil a/b-vel kapcsolódó kötőfehérjék.

A fentiek alapján adva vannak azok a DNS-fragmentumok és DNS-rekombinánsok, amelyek az alábbiakban részletezett eljárás során alkalmazhatók.

Közelebbről, a találmány olyan eljárásra vonatkozik, amelynek segítségével teljes általánosságban növényeket, valamint ezeknek a növényeknek reprodukciós anyagát állítjuk elő heterológ genetikai anyaggal, amely stabilisan integrálódik, és képes az adott növényekben vagy reprodukciós anyagban való kifejeződésre olyan fehérje alakjában, amely a GS-gátlók hatását inaktíválni vagy közömbösíteni képes. Az eljárás abban áll, hogy nem biológiai lépésekben növényi sejteket vagy növényi szövetet állítunk elő, amely olyan heterológ genetikai

anyagot foglal magában a kiinduló növényi sejtekből vagy növényi szövetből, amelyek nem képesek a gátló vagy közömbösítő aktivitás kifejezésére, majd a növényeket vagy a növények reprodukciós anyagát vagy mindkettőt a növényi sejtekből vagy növényi szövetből a genetikai anyaggal együtt regeneráljuk, és adott esetben a növényeket vagy a reprodukciós anyagot vagy mindkettőt biológiai úton replikáljuk; ennek során a növényi sejtek vagy növényi szövet – beleértve a heterológ genetikai anyagot is – előállításának nem biológiai lépései abban állnak, hogy a kiinduló növényi sejteket vagy növényi szövetet olyan DNS-rekombinánssal transzformáljuk, amely tartalmazza a fehérjét kódoló nukleotid-szekvenciát, valamint a szabályzó egységeket, köztük azokat is, amelyek lehetővé teszik a nukleotid szekvencia kifejeződését a növényi sejtekben vagy növényi szövetben, és a nukleotid-szekvencia stabilis integrálódását a növényi sejtekbe és szövetbe, valamint azokba a növényekbe és reprodukciós anyagba, amelyeket az előbbiekből több generáción át létrehozunk.

A találmány vonatkozik továbbá bialaphos-rezisztencia-DNS-t tartalmazó sejtenyészetekre, vagy még általánosabban GS-gátló anyagokat inaktiváló DNS-re, amely sejtenyészetek sajátossága, hogy GS-gátló anyagot tartalmazó készítménnyel szemben rezisztensek, ha olyan táptalajon tenyésztjük, amely egy ilyen készítményt a nem transzformált sejtek elpusztítására képes mennyiségben tartalmaz.

Még közelebbről, a találmány olyan növényi sejtekre vagy sejtenyészetekre vonatkozik, amelyekben a bialaphos-rezisztencia-DNS stabilisan integrálódott, és meg is marad a növényi sejtek egymást követő nemzedékein át. Ilyen értelemben a GS-gátló anyagokkal szemben mutatott rezisztencia, közelebbről a bialaphos-val vagy PPT-vel szemben mutatott ellenálló képesség úgy tekinthető, mint a találmány szerinti növényi sejtek jellemzésének módszere.

Adott esetben hibridizálási kísérleteket végezhetünk a növényi sejtekből nyert genominális-DNS és egy GS-gátló anyagokat inaktiváló DNS-szekvenciát tartalmazó minta segítségével.

Általánosabb formában a találmány olyan növényi sejtekre, reprodukciós anyagra, különösen magvakra, valamint növényekre vonatkozik, amelyek genomális-DNS-eikben stabilisan beépített, idegen vagy heterológ DNS-fragmentumot tartalmaznak, és ez a fragmentum a növényi sejtek, reprodukciós anyag, magvak és növények nemzedékein át megmarad; ahol a DNS-fragmentum olyan fehérjét kódol, amely a fajtájára nézve nem specifikus enzimaktivitást hoz létre, amely képes GS-gátló anyagok – különösen bialaphos és PPT – inaktiválására vagy közömbösítésére, különösen egy megfelelő, fajtára nézve nem specifikus GS-gátló anyagokkal szembeni rezisztencia-fenotípus biztosítására a növényi sejtekben, reprodukciós anyagban, magvakban és növényekben.

A „fajtára nézve nem specifikus” kifejezésen olyan enzimaktivitást vagy fenotípust értünk, amely arra a tényre utal, hogy ezek nem jellemzők specifikus növényi génekre vagy fajokra, amint ez az alábbi, nem korlátozó

jellegű példák ki fog tűnni. Ezek a növényi anyagokban lényegében nem biológiai folyamatok útján jönnek létre, és olyan növényekre alkalmazhatók, amelyek egymással rokonságban nem álló fajokhoz tartoznak; a kifejezés továbbá arra utal, hogy a növényi anyagba heterológ DNS, például baktérium-eredetű DNS vagy kémiai úton szintetizált DNS épül be, amely normális körülmények között a növényi anyagban nem fordul elő, vagy normális körülmények között, természetes termőfolyamatok során abba nem épül be, és azoknak közös fenotípust (például a herbicidekkel szemben mutatott rezisztenciát) kölcsönöz.

A találmány különös előnnyel alkalmazható olyan eljárásokban, amelyek során szabadföldön termesztett növényfajokat gyomok ellen kívánunk megvédeni, s amidőn a területet valamilyen herbiciddel – például bialaphos-szal vagy PPT-vel – a gyomok irtására megfelelő dózisban kezelünk, s aminek során a termesztett növényfaj genomjában olyan DNS-fragmentumot tartalmaz, amely egy fehérjét kódol, és ennek a fehérjének az enzimaktivitása képes a GS-gátló anyag közömbösítésére vagy inaktíválására.

Csupán példaként megemlítjük, hogy egy ilyen eljárás során hatásos adagként körülbelül 0,4 kg/hektártól körülbelül 1,6 kg/hektárig terjedő mennyiségben alkalmazzuk a bialaphos-t vagy PPT-t.

Az alábbiakban leírjuk a fentiekben említett, előnyös DNS-fragmentum izolálását abból a *Streptomyces hygroscopicus* törzsből kiindulva, amely az „American Type Culture Collection” gyűjteményben ATCC 21,705 sorszám alatt van elhelyezve.

Az alábbi leírásban olyan módszert adunk meg, amely más, PPT-egységet tartalmazó vegyületeket termelő törzsekre is alkalmazható.

A következőkben leírjuk továbbá egy olyan előnyös DNS-fragmentum beépítését, amely a transzformált sejtek számára a bialaphos-t és PPT-t inaktíváló hatást biztosít. Az alábbiakban a bialaphos-t inaktíváló DNS-fragmentumot bialaphos-rezisztencia génnek vagy „sfr” génnek nevezzük; ezt a fentiekben leírt eljárással plazmidokban izoláltuk, amelyek felhasználhatók növényi sejtek transzformálására, és rezisztencia biztosítására bialaphos-szal szemben. Ezt az eljárást csupán nem korlátozó példaként közöljük.

A csatolt rajzok magyarázata a következő:

– Az 1. ábra olyan plazmid restrikciós térképe, amely a bialaphos-rezisztenciát kódoló *Streptomyces hygroscopicus* DNS-fragmentumot tartalmazza; ezt a plazmidot – amelyet az alábbiakban pBG₁ jelzéssel rövidítünk, a későbbiekben leírt módszer szerint hoztuk létre.

– A 2. ábra a pBG₁-ből nyert, kisebb méretű nukleotid-szekvenciát mutat, amelyet egy másik plazmidba (pBG39) szubklónoztunk, s amely a rezisztencia-gént tartalmazza.

– A 3. ábra mutatja egy sorozat plazmid konstrukcióját példaként; ezek a plazmidok lehetővé teszik a megfelelő adaptációt a bialaphos-rezisztencia gén, azaz „sfr” gén beépítésére.

– A 4A ábra egy sorozat plazmid felépítését mutatja, amely olyan alkalmas növényi promoter anyagokat tar-

talmaz, amelyek lehetővé teszik a transzkripció megkezdését s a szabályozásuk hatása alatt a plazmidokba beépült idegen gén kifejeződését.

– Az 5A ábra a 3. ábra szerint nyert plazmid nukleotid-szekvenciájának egy meghatározott fragmentumát mutatja.

– Az 5B ábra egy bialaphos-rezisztencia gén első kodonjának a rekonstrukcióját mutatja, amely pBG39-ből nyert FokI/BqIII fragmentumból származik, látható továbbá egy ATG indító kodon behelyettesítése a természetes „efr” gén GTG indító kodonjának a helyére.

– Az 5C ábra mutatja a teljes „sfr” gén rekonstrukcióját, azaz az utolsó kodonokat, és beépülését a 4A és 4B ábrákban bemutatott plazmidba.

– A 6A ábra mutat egy kifejező vektort, amely tartalmazza a növényi sejt-promoter szabályzó hatása alatt elhelyezkedő „sfr” gént.

– A 6B ábra egy másik kifejező vektort mutat, amely a 6A ábrán bemutatott egyik vektorból származik néhány nukleotid cseréjével.

– A 7. ábra mutatja a plazmidoknak egy sorozatát, amikor végül olyan plazmidokat állítunk elő, amelyek egy meghatározott növényi gén promoter-szakaszát és tranzit-peptid szekvenciáját tartalmazza az „sfr” gén beépítésének számára a promoter-szakasz szabályzó hatása alatt, és mutatja az tranzit peptid szekvencia leszálló ágát.

– A 8. ábra egy másik bialaphos-rezisztencia gént tartalmazó pJS1 plazmid restrikciós térképét mutatja.

– A 9. ábra a rezisztencia gént tartalmazó „sfrsv” gén nukleotid szekvenciáját mutatja.

– A 10. ábra az „sfrsv” és „sfr” gén aminosav-homológiáját mutatja.

– A 11. ábra példaként bemutatja egy plazmid felépítését, amely az „sfrsv” gént tartalmazza, és alkalmas növényi sejtek transzformálására.

A 12–15. ábrákat a leírás 29., 37–38. oldalain ismertetjük.

Az alábbi kísérletet végeztük bialaphos-rezisztencia gén S. *Hygroscopicus*-ból való izolálása céljából *Streptomyces* klónozására standard eljárás szerint.

A kísérletek során alkalmazott ismert géntechnológiai műveletek leírása, valamint az itt közelebbről nem specifikált, ismert tápközegek, reagensek stb. összetétele például az alábbi irodalmi helyen található: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory, 1982.

S. *lividans* kivonatokból származó, összekapcsolt átíró-lefordító rendszer in vitro alkalmazásával (J. Bacteriol. 1982, 678) kimutattuk, hogy a pBG39 (DSM 3607, 1985) plazmidban lévő 1,65 kb PstI-BamHI fragmentum irányítja a 22 kD fehérje szintézisét. Az alábbiakban ez az 1,65 kb inszertum magában foglal egy olyan fragmentumot, amely a 22 kD fehérjét kódolja, s ezt „sfr” génnek nevezzük.

A gén részletes térképezése és a szekvencia megállapítása

625 bp Sau3A fragmentumot pBG39 plazmidból (DSM 3607) pUC19 plazmid BamHI helyére szubklónoztunk: ezáltal még biztosítani tudtuk az E. coli W3110

befogadó számára a bialaphos-rezisztenciát. Az orientációnak megfelelően a pBG93 és pBG94 klónokat kaptuk.

Az Sau3A fragmentumban lévő gén orientációját olyan kísérletekkel támasztottuk alá, amelyek megmutatták, hogy a bialaphos-rezisztencia IPTG-vel indukálható a pUC19 promoterről a pBG93 plazmidban 0,5 mM IPTG jelenlétében a pBG93/W3110 rezisztenciája bialaphos-t tartalmazó M9 közegben 5 µg/ml-ről 50 µg/ml-re növekedett. A W3110 gazdaszervezet a pBG93 hiányában 5 µg/ml bialaphos-t tartalmazó M9 közegben nem szaporodott. Ezek a kísérletek igazolták, hogy a Sau3A fragmentum az aktivitás elvesztése nélkül szubklónoozható; továbbá rámutattak a megfelelő orientációra, amint ezt a 2. ábrában illusztráltuk. Az ezen klónok által kódolt fehérjét összekapcsolt átíró-lefordító rendszerek segítségével detektáltuk, amelyek *S. lividans* kivonataiból származtak [Mol. Gen. Genet. 195, 39 (1984)]. A Sau3A fragmentum orientációjától függően különböző méretű transzlációs (lefordítási) termékeket figyeltünk meg, amelyek: 22 kD a pBG94 esetében és +28 kD a pBG93 esetében. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a Sau3A fragmentum nem tartalmazza a teljes rezisztencia-gént, és olyan fúziós fehérje képződött, amely a pUC19 szekvencia lefordításából eredő polipeptid-szekvenciát tartalmazott.

Abból a célból, hogy ebből a fehérjéből nagyobb mennyiséget kapjunk, a pBG1-ből származó 1,7 kb PstI fragmentumot a nagy expresszióképességű pIJ385 *Streptomyces* replikon PstI helyére klónoztuk. Az így kapott pBG20 plazmidot használtuk fel az *S. hygroscopicus* (ATCC 21703) transzformálására. Az ezen plazmidot tartalmazó transzformánsok PPT-acetilező aktivitása több mint ötszörös volt, és nátrium-dodecil-szulfátos géleken nagyobb mennyiségű 22 kD fehérjét tartalmaztak. Továbbá, mind az acetyl-transzferáz enzim, mind a 22 kD fehérje megjelent, amidón a bialaphos termelődése megkezdődött. Az *in vitro* adatok korrelációja, a szintézis kinetikája és a pBG20 transzformánsokkal kapcsolatos amplifikált kifejeződés arra enged következtetni, hogy ez a 22 kD a géntermék.

Meghatároztuk a 625 bp Sau3A fragmentum teljes nukleotid-szekvenciáját, valamint az oldalt elhelyezkedő szekvenciákat is. Számítógépes elemzés az Sau3A fragmentum teljes hosszában nyitott leolvasási keret jelenlétét mutatta ki.

Az „sfr” géntermék jellemzése

Kísérletsorozatot végeztünk annak meghatározására, hogy az „sfr” gén nyitott leolvasási kerete felelős-e a bialaphos-rezisztencia enzim kódolásáért. A rezisztencia-gén 5'-végének megállapítása céljából meghatároztuk az enzim NH₂-terminálisának a szekvenciáját. E szekvencia megállapítása során J. Vandekerckhove módszerét alkalmaztuk [Eur. J. Biochem. 152, 9 (1985)].

Az idézetben ismertetett eljárás lehetővé teszi a Polybren® márkanévvel forgalomba hozott polikvaterner aminnal bevont üvegrost-lapokon történő immobilizálást olyan fehérjék és nukleinsavak esetében, amelyeket előzőleg poliakrilamid-gélt tartalmazó nátrium-dodecil-szulfáton különítettünk el. Az átvitelt lényegében úgy

végeztük, mint nitro-cellulóz-membránokon rögzített fehérje esetében [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350 (1979)]. Ez lehetővé tette az immobilizált fehérjék aminosavösszetételének és részleges szekvenciájának a megállapítását. A lemeznek azt a részét, amely az *S. hygroscopicus* pBG20 által termelt immobilizált 22 kD fehérjét hordozta, kivágtuk, és a lemezt gázfázisú szekvenátor reakciókamrájába helyeztük, hogy az Edman-féle lebontó eljárást elvégezhessük az üvegroston megkötött 22 kD fehérjével. Ennek eredményeként az alábbi aminosav-szekvenciát kaptuk: Pro-Glu-Arg-Arg-Pro-Ala-Asp-Ile-Arg-Arg.

Ez a szekvencia összeegyeztethető volt egy olyan aminosav-szekvenciával, amelyet a 625 bp Sau3A fragmentum nyitott leolvasási keretéből vezetünk le; megfelelt a 3. kodon-tól a 12. kodonig terjedő szakasznak.

Így beigazolódott, hogy a 22 kD fehérje NH₂-terminális a szekvencia felszálló végén helyezkedik el. Megállapítottuk, hogy a szóban forgó fehérje lefordítása valószínűleg a GTG indító kodonnál 2 aminosavval előbb indult el. A GTG-t gyakran alkalmazzák indító kodonként a *Streptomyces*-ben, és lefordítása metioninként történik. A GTG indító kodonról lefordított fehérje 183 aminosav hosszúságú, és molekulatömege 20550. Ez jó egyezést mutatott a megfigyelt, megközelítő 22000 molekulatömegeg.

Továbbá, a befejező (záró) TGA kodon a Sau3A helytől számítva lefelé helyezkedett el. Ha a 625 bp Sau3A fragmentumot BamHI-val emésztett pUC19-ben klónoztuk, akkor a záró kodon rekonstrukciója nem következett be. Ezzel megmagyarázhattuk azokat a fúziós fehérjéket, amelyeket az *in vitro* kísérletekben végzett átíró-lefordító elemzés során megfigyeltünk.

A PPT-rezisztencia mechanizmusa

Miután definiáltuk a rezisztencia-gén és géntermékének első fenotípusát és néhány fizikai jellemzőjét, kísérletsorozatot végeztünk a rezisztencia kifejlődése mechanizmusának a felderítésére. Fentebb leírtuk, hogy a PPT a bialaphosnak olyan része, amely a GS-enzimet gátolja, és megállapítottuk, hogy az N-acetyl-PPT nem idéz elő gátlást. Standard vizsgálat segítségével („Methods of Enzymology”, V. XLIII. köt. 737. old. 1982.) kimutattuk, hogy az *S. hygroscopicus* ATCC 21 705 leszármazottai olyan PPT-acetyl-transzferáz enzimet tartalmaznak, amelyet az *S. lividans*-ban nem találtunk. Ez az enzim a bialaphos-tripeptidet nem acetilezte. A pBG20-ban vagy pBG16-ban (itt arról a plazmidról van szó, amely egy másik pIJ680 *Streptomyces* vektorban klónozott 625 bp Sau3A fragmentumot tartalmaz) klónozott rezisztencia-gént hordozó *S. lividans* is tartalmazta azt az enzimet, amely képes volt a PPT acetilezésére, de nem acetilezte a bialaphos-t.

A pBG20/*S. lividans* kivonatai által termelt PPT-reakcióterméket elkülönítettük annak igazolására, hogy az valóban acetyl-PPT. A tömegspektroszkópiás elemzés megmutatta, hogy a termék molekulatömege éppen egy acetilcsoporthal nagyobb, mint a PPT molekulatömege. Ebből azt következtítettük, hogy a 625 bp Sau3A fragmentum olyan szekvenciákat tartalmaz, amelyek a PPT-acetyl-transzferáz enzim kódolásáért felelősek.

E kísérleteink végrehajtása során az alábbi körülményeket és reagenseket alkalmaztuk.

Az alkalmazott közegek és pufferelegyek előállítása és összetétele

1) P közeg: 10,3 g szacharóz, 0,025 g K_2SO_4 , 0,203 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ és 0,2 ml nyomelemeket tartalmazó oldat 80 ml desztillált vízzel készült elegyét autoklávoztuk, majd sorrendben hozzáadtunk 1 ml 0,5%-os KH_2PO_4 oldatot, 10 ml 3,68%-os $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ oldatot és 10 ml 0,25 mólos, 7,2 pH értékű TES-pufferoldatot. A nyomelem-oldat literenként a következő komponenseket tartalmazta: 40 mg $ZnCl_2$, 200 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 10 mg $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10 mg $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ és 10 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.

2) R2YE táptalaj: 10,3 g szacharóz, 0,025 g K_2SO_4 , 1,012 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 g glukóz, 0,01 g Difco Kásaminosav és 2,2 g Difco-agar 80 ml desztillált vízzel készült elegyét autoklávoztuk, majd hozzáadtunk 0,2 ml nyomelemoldatot, 1 ml 0,5%-os KH_2PO_4 oldatot, 8,02 ml 3,68%-os $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ oldatot, 1,5 ml 20%-os L-prolin oldatot, 10 ml 0,25 mólos 7,2 pH-értékű TES-puffert, 0,5 ml 1 mólos nátronlúgoldatot és 5 ml 10%-os élesztő kivonatot a fenti sorrendben.

3) TE elegy: 10 mM TRIS HCl, 1 mM EDTA (pH 8,0).

4) YEME elegy: 0,3% Difco-élesztő kivonatot, 0,5% Difco-pepton, 0,3% oxid malátakivonatot és 1% glukóz.

Az S. lividans protoplasztok transzformációja

1. 25 ml YEME elegyet, 34% szacharózt, 0,005 mólos $MgCl_2$ oldatot és 0,5% glicint tartalmazó tenyészetet 250 ml térfogatú lombikban 30–36 órán át centrifugáltunk.

2. Az így kapott pelletet 10,3%-os szacharózoldatban szuszpendáltuk, és centrifugáltuk, majd ezt a mosást még egyszer ismételtük.

3. A micéliumot 4 ml lizozimoldatban szuszpendáltuk (1 mg/ml olyan P közegben, amelyben a $CaCl_2$ és $MgCl_2$ koncentrációját 0,0025 mólra csökkentettük), majd 30 °C-on 15–60 percig inkubáltuk.

4. Az oldatot 5 ml-es pipettával háromszor felszívva összekevertük, és további 15 percig inkubáltuk.

5. 5 ml P közeget adtunk hozzá, és a 4. lépés szerint pipettázással összekevertük.

6. Az oldatot vattán szűrjük, és a protoplasztokat 800×G sebességgel 7 percig centrifugálva enyhén üleptettük.

7. A protoplasztokat 4 ml P közegben szuszpendáltuk, és ismét centrifugáltuk.

8. A 7. lépést megismételtük, és a protoplasztokat a felülúszó leöntése után visszamaradt P közegben szuszpendáltuk (transzformáció céljára).

9. DNS-t adtunk hozzá 20 µl-TE-ben szuszpendálva.

10. 0,5 ml PEG 1000 oldatot (2,5 g PEG feloldva 7,5 ml 2,5%-os szacharózoldat, 0,0014 K_2SO_4 , 0,1 M $CaCl_2$, 0,05 M TRIS-maleinsav (pH 8,0) és nyomelemek elegyében közvetlenül hozzáadtunk, és egyszeri pipettázással összekevertük.

11. 60 másodperc elteltével 5 ml P közeget adtunk

hozzá, és a protoplasztokat enyhén centrifugálással üleptettük.

12. Az így kapott pelletet 1 ml P közegben szuszpendáltuk.

13. 0,1 ml-t R2YE lemezekre adagoltunk (a transzformáció céljára a lemezeket friss tömegük 85%-ára szárítottuk, például egy lemezes áramlású fülkében).

14. Inkubálást végeztünk 30 °C hőmérsékleten.

A – Az „sfr” génkazetta megszerkesztése

„sfr” génkazettát szerkesztettünk, amely lehetővé tette növényekben a kifejező vektor klónozását.

Az „sfr” génfragmentumot tartalmazó pBG39 plazmidból származó 520 bp FokI-BglII fragmentum (1. 2. ábra) elkülönítése az első kodonok elvesztésével járt, beleértve az indító kodont; továbbá az utolsó kodonok elvesztését idézte elő, beleértve a záró kodont (stopkodont).

Az „sfr” génkazetta szerkesztése érdekében pGSFR1 plazmidot konstruáltunk a következő restrikciós fragmentumok ligálásával (1. 12. ábra).

– egy 520 bp FokI-BglII fragmentum, amely a pBG39 plazmidból izolált sfr kódoló szekvencia C-terminális felét tartalmazza,

– két komplementer szintetikus oligonukleotid, amelyek 5'-CATGAGCCCAGAAC-3' és

5'-CGTCGTTCTGGGCT-3' szekvenciákat tartalmaznak. A két oligonukleotid szekvencia összekapcsolásával egy DNS fragmentum nyerünk, 5'-kinyúló végekkel, amelynek 5'-vége megfelel az NcoI hasítási helynek és a 3'-vége a FokI-helynek:

5'-CATGAGCCCAGAAC-3'

5'-TCGGGTCTTGCTGC-3'

– egy pLK56.2 plazmid vektor, amelyet a Botterman és m társai által leírt pLK vektorból származtattunk (1. 32. oldal) és amely NcoI és BglII helyeket tartalmazó polilinker szakaszt hordoz. A plazmid vektor mindkét restrikciós enzimmel végzett emésztésével 2,98 kb linearizált vektort nyerünk 5'-kinyúló BglII és FokI végekkel.

A szintetikus fragmentum és az sfr fragmentum ligálásával, majd az egyesített fragmentum emésztett pLK56.2 vektorba való ligálásával nyerjük a pGSFR1 plazmidot, amely a rekonstruált sfr gént tartalmazza a pLK56.2 polilinker szakaszba klónozva. A pGSFR1 plazmidban lévő sfr génben egy ATG kodont GTG kodon helyettesít és a stopkodont egy polilinker szakasz követi.

Az „sfr” génhez kapcsolt oligonukleotidokat tartalmazó DNS-fragmentumot ezt követően megfelelő plazmidba építettük be (inszertáltuk) [PGSH150, (1. A4 ábra és 33. oldal), amely meghatározott nukleotid-szekvenciát tartalmazott; ez utóbbi szekvenciát az alábbiakban „adapter” fragmentumnak nevezzük.

Az adapter fragmentum a következőket tartalmazta:

– egy TGA befejező (záró) kodont, amely lehetővé tette az „sfr” gén utolsó kodonjainak a reformálását;

– megfelelő restrikciós helyeket, amelyek lehetővé tették a részben szintetikus oligonukleotidokkal reformált „sfr” gént tartalmazó nukleotid-szekvencia fragmentum beépítését (inszertálását); ez a beépítést intakt „sfr” gén rekonstrukcióját eredményezte;

– megfelelő restrikciós helyeket a teljes „sfr” gén izolálására.

Ezután az „sfr” gént egy plazmidba inszertáltuk, amely alkalmas növényi promoter szekvenciát tartalmazott (lásd 35. oldal). Ez a növényi promoter szekvencia a kelvirág-mozaikvírus promoter szekvenciája volt (p35S). A találmány természetesen nem korlátozódik ennek a különleges promoternek az alkalmazására: növényekben alkalmazható promoterekként más szekvenciát is alkalmazhatók, például a TR 1'-2' promoter szakasz, valamint a Rubisco (ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz) kis terjedelmű alegységből álló génjének a promoter fragmentuma, amely az *Arabidopsis thaliana*-ból ered, s amelyet az alábbiakban leírnak.

1° A pLK56.21 plazmid felépítése (lásd a 3. ábrát)

A pLK56.2 konstruálása arra irányult, hogy az alábbi restrikciós helyeknek megfelelő szekvenciát tartalmazó adaptert kapjunk: SmaI, BamHI, NcoI, KpnI, BglII, MluI, BamHI, HindIII és XbaI.

A felépítéshez alkalmazott kiinduló plazmidokat – azaz a pLK56, pJB64 és pLK33 plazmidokat – előzőleg Botterman leírta (Doktori értekezés, Ghent-i Állami Egyetem, 1986. február).

Az alábbiakban leírt DNS-fragmentumokat alacsony olvadáspontú agarórról izoláltuk, és elkülönítettük.

A pLK56 plazmidot BamHI és NdeI enzimekkel hasítottuk. A pJB64 plazmidból kapott NcoI-NdeI fragmentumot (ez a rajzban „a” szaggatott vonallal van megjelölve) a pLK56 plazmidban a rajzon „b”-vel jelzett BamHI-NdeI fragmentum helyére vezettük be. A ligálást a BamHI és NcoI kiugró végeinek *E. coli* DNS-polimeráz I enzimmal (Klenow-fragmentum) való betöltés után tudtuk végrehajtani.

A T4 DNS-ligáz alkalmazása során különös módon recirkularizálás ment végbe, s így az új pLK56.3 plazmidot kaptuk. E plazmidot XbaI és PstI enzimekkel hasítottuk.

A pLK33 (c) BamHI-PstI fragmentumát (lásd a 3. ábrát) behelyettesítettük a pLK56.3 (d) XbaI-PstI fragmentumának a helyére, miután a Klenow-fragmentummal ismét helyreállítottuk a megfelelő végződéseket.

A T4 DNS-ligázal elért recirkularizálás után a kapott pLK56.2 plazmid olyan nukleotid-szekvenciát tartalmazott, amely magában foglalta a szükséges restrikciós helyeket az „sfr” gén soron következő beépítésére.

2° a pGSH150 plazmid felépítése (lásd a 4A ábrát)

A legutóbb leírt felépítéssel párhuzamosan olyan plazmidot képeztünk, amely a növényi sejt polimerázai számára felismerhető promoter szekvenciákat tartalmaztak, közöttük a megfelelő restrikciós helyeket is az átírási irányban a promoter szekvenciától lefelé; amely a restrikciós helyek teszik lehetővé PGSR1 plazmidból kapott „sfr” gén alkalmazkodásán az említett növényi promoter szabályzó hatása alatt.

A pGV825 plazmidot Deblaere és munkatársai írták le [Nucl. Acid. Res. 13, 1477 (1985)]; a pJB63 plazmidot Botterman ismertette (doktori értekezés, Ghent-i Állami Egyetem; 1986. február).

A pGV825 plazmidot PvuII alkalmazásával lineárizáltuk, majd T4 DNS-ligázal recirkularizáltuk, s így az (e) helyen jelzett belső PvuII fragmentumot töröltük (pGV956 plazmid).

Ezután a pGV956 plazmidot BamHI és BglII alkalmazásával hasítottuk.

A BamHI-BglII (f) fragmentumot – amelyet pJB63 plazmidból kaptunk – borjúbél-foszfáttal defoszforileztük, és a pGV956 BamHI-BglII fragmentumának a helyére építettük be.

A pGV1500 plazmidot T4 DNS-ligázal végrehajtott recirkularizálás után kaptuk.

A pGSH150 plazmidból kapott egyik EcoRI-HindIII fragmentumot tisztítottuk. Az utóbbi plazmid egy Velten és munkatársai által leírt Tr 1'-2' kettős promoter fragmentumot hordozott [EMBO J. 3, 2723 (1984)]. Ezt a fragmentumot a pGV1500-ba inszertáltuk, amelyet HpaI és HindIII alkalmazásával emésztettük, és így a pGSH150 plazmidhoz jutottunk. Ez a plazmid tartalmazta egyrészt a T-DNS transzkriptum 7,3'-végződésének frontális promoter fragmentumát, másrészt egy klónozásra alkalmas BamHI és ClaI helyett.

A pGSJ260 plazmidból (DSM 3606) kiindulónan növényi sejtek soronkövetkező transzformálása céljából kétféle plazmidot építettünk fel:

– egy olyan plazmidot, amely lehetővé tette az „sfr” gén kifejeződését növényi sejtek citoplazmájában; és

– egy másik plazmidot, amelynek módosításával elérhettük a bialaphos-rezisztencia enzimek transzportját (átvitelét) növényi sejtek kloroplasztjaiba.

Első eset:

Annak a plazmidnak a felépítése, amely lehetővé teszi az „sfr” gén kifejeződését növényi sejtek citoplazmájában

Az „sfr” génkassetta klónozása növényi kifejező vektorban (pGSR2 vektor) (lásd az 5. ábrát)

A pLK56.2 adapter nukleotid-szekvenciáját az 5A ábrában mutatjuk be. Látható a BamHI, NcoI és BglII restrikciós helyek elhelyeződése.

Ezt az adapter fragmentumot NcoI és BglII enzimekkel hasítottuk.

Az 5B ábra mutatja a pBG39-ből kapott (j) FokI-BglII fragmentumot. A 2. ábra mutatja a két restrikciós hely elhelyezkedését.

Szintetikus oligonukleotidok alkalmazásával megváltoztatjuk az „sfr” gén első kodonjait, közelebből a génnek az 5'-végződését, ahol az ATG indító kodont vittük be a GTG indító kodon helyére (lásd 5B. ábra)

A szintetikus oligonukleotidokkal kiegészített FokI-BglII fragmentummal a pLK56.2 plazmidban az adapter NcoI-BglII fragmentumát helyettesítettük. Így tehát a gén 3'-végződését is megváltoztattuk a T4 DNS-ligázal végzett recirkularizálás útján. Az így kapott pGSR1 plazmid az adapterjében inszertált teljes „sfr” gént tartalmazta.

A pGSJ260 plazmidot BamHI alkalmazásával megnyitottuk (hasítottuk) (lásd az 5C ábrát), és a pGSR1 plazmidból kapott BamHI fragmentumot – amely a teljes „sfr” gént tartalmazta – a pGSJ260 plazmidba inszertáltuk.

Az így kapott pGSR2 plazmid (lásd a 6A ábrát) a pBR322 replikont – egy baktérium-eredetű streptomycin-rezisztencia gént (SDM-SP-AD-transzferázt) – és egy géntechnológiai úton kapott T-DNS-t tartalmazott, amely az alábbiakból állt:

- a T-DNS border szekvenciájából
- egy kiméra kanamicin génből, amely növényi sejtekben domináns, szelektálható markerként használható, valamint

- egy kiméra „sfr” génből.

A kiméra „sfr” gén összetétele az alábbi volt:

- a kelvirág-mozaikvírus promotor szakasza (p35S),
- az 5. ábrában leírt „sfr” génkazetta,
- a 3' le nem fordított szakasz, amely magában foglalta a T-DNS 7. transzkriptum poliadenilező szignálját.

A pGSR2 plazmidot Deblaere és munkatársai eljárása szerint *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R (pGV2260, DSM 2799 plazmid) recipiensbe vezettünk be (Nucl. Acid. Res., 13, 1477 (1985)).

E törzset alkalmaztuk a kiméra „sfr” gén *N. tabacum* SR₁ növényekbe való bevitelére.

A pGSR2-ből származtatva nyerjük a pGSFR280 és pGSFR281 plazmidokat, amelyek a kiindulási plazmidtól a transzkripciót indító helyet követő nem-transzlált szekvenciában különböznek. A pGSR2 plazmidban e fragmens szekvenciája a következő:

GAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCGGATCCATG

viszont a pGSR280 plazmidban az a szekvencia:

GAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTACAAATCGATCCATG

és a pGSFR281 plazmidban:

GAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTACAAATCGATG

ATG kodonnal, amely az „sfr” gén indító kodonja.

A pGSR2 plazmidból származtatjuk a pGSFR160 és pGSFR161 plazmidokat, amelyek a kiindulási plazmidtól abban különböznek, hogy a 35S promotor szakasz helyett a TR1'-2' promotert (l. Velten és mtársai, EMBO J. 3,2723–2730, 1984) tartalmazzák. A pGSFR161 plazmidban az sfr gén ATG kodonja közvetlenül TR1'-2' promoterhez kapcsolódik, míg a pGSFR160 plazmidban az ATG kodon előtt még 4 bázispár (ATCC) van jelen.

A pGSFR160 és pGSFR280 plazmidokat, amelyek T-DNS vektorok, előállíthatjuk például a pGSH160, ill. pGSJ280 plazmidokból (l. Deblaere és mtársai, Methods in Enzymology, 153, 277–292, 1987, továbbá bárki számára bármikor hozzáférhetők a Plant Genetic System N.V. (PGS, J. Plateastraat 22, 9000 Ghent, Belgium) cégnél, J. Bottermann termékfejlesztési menedzser révén) kiindulva a következőképpen (l. még 15. ábra):

– pGSFR160 plazmidot úgy nyerjük, hogy az sfr gént hordozó pGSFR1 plazmid 600 bp BamHI fragmenség a pGSH160 plazmid ClaI helyére ligáljuk. A ClaI és BamHI helyeket Klenow DNS polimerázzal betöltjük. Így nyerjük a pTR2'-bar-3'g7 kiméra szerkezetet.

– a pGSFR280 plazmidot úgy nyerjük, hogy a pGSFR1 plazmid 600 bp BamHI fragmensét a pGSJ280 plazmid ClaI helyére ligáljuk. A ClaI és BamHI helyeket Klenow DNS polimerázzal betöltjük. Így nyerjük a CaMV35S-bar-3'g7 szerkezetet. A pGSFR161 és pGSFR281 plazmidok pGSFR160, ill. pGSFR280 szár-

mazékok, amelyekben a kiméra sfr gén 5'-nem transzlált vége 4 extra nukleotidot tartalmaz. Ezt apGSH160, ill. pGSJ280 vektorokból kiindulva a következőképpen nyerjük (l. 13. ábra):

- 5 – a pGSH160 és pGSJ280 vektorokat ClaI-gyel emésztjük, Klenow DNS polimerázzal kezeljük, majd ismételt BamHI-vel emésztjük. Mindkét plazmid esetében a ClaI és a BamHI helyek közvetlenül egymás után helyezkednek el és lefelé a promotortól;

- 10 – a sfr kódoló szekvenciát a pGSFR160 plazmidból nyerjük mint XbaI-BamHI fragmenst. E fragmens XbaI végét S1 nukleázzal kezeljük. A pGSFR160 plazmidot pGSFR1-ből származó sfr fragmens pLK plazmiba (Botterman és mtársai, 1987) való szubklónozásával nyerjük, amely pLK plazmidot XbaI és BamHI enzimekkel emésztettünk és az XbaI végeket Klenow DNS polimerázzal betöltöttünk (l. 14. ábra). Az sfr gén szubklónozását a következőképpen végeztük: a pGSFR1 plazmidot BamHI-gyel részlegesen emésztettük, a 600 bp BamHI fragmenst T4 DNS polimerázzal (dTTP jelenlétében) majd S1 nukleázzal kezeltük. A ligálást a betöltött XbaI-helyeken végeztük.

- 20 – Az összes plazmidot *Agrobacterium t.* (pGV2260)-ba vezettük be, és így a pGSFR1280, pGSFR1281, pGSFR1160, illetve pGSFR1161 plazmidokhoz jutottunk.

Második eset:

- 30 – Olyan plazmid felépítése, amely az „sfr” gént azon DNS-szekvenciától leszálló irányban tartalmazza, amely a tranzit-peptidet kódolja, és alkalmas az „sfr” gén kifejeződési termékének növényi sejtek kloroplasztjaiba való áthelyezésére.

- 35 – Kísérleteink egy másik sorozatában a „sfr” gént tartalmazó nukleotid-szekvenciát olyan DNS-szekvenciába kötöttük, amely a tranzit-peptidet kódolja, és ezáltal lehetővé vált annak átvitele (transzportja) kloroplasztokba.

- 40 – A fentebb leírt adapter fragmentumból az „sfr” gén NcoI-BamHI fragmentumát izoláltuk, és a tranzit-peptiddel fűzőba vittük. Szintetikus oligonukleotidokkal rekonstruáltuk a teljes „sfr” gént, és tranzit-peptiddel fűzőba hoztuk.

- 45 – Az alább leírt pATS3 plazmid a Plant Genetic System N.V. (PGS, J. Plateastraat 22, 9000 Ghent, Belgium) cégnél bárki számára bármikor hozzáférhető, ill. beszerezhető, J. Botterman termékfejlesztési menedzser révén. Megjegyezzük azonban, hogy a szakember számára nyilvánvaló, hogy a pATS3 plazmid helyett más, ismert vagy ismert módon előállítható tranzit-peptidet kódoló nukleotid szekvenciát tartalmazó plazmid is alkalmazható (lásd a leírás 15–16. oldala).

A pGSR4 plazmid felépítése, amely tartalmazza a tranzit-peptidet kódoló DNS-szekvenciával fuzionált „sfr” gént (lásd a 7. ábrát)

- 55 – A pLK57 plazmidot Botterman fentebb idézett közleménye szerint állítottuk elő. A pATS3 plazmid egy pUC19 klón, amely az *Arabidopsis thaliana*-ból származó 2kb EcoRI genomális DNS fragmenst tartalmazza, amely a gén promotor szakaszát és a tranzit peptid nukleotid szekvenciáját tartalmazza és amely gén kifejező-

dése a ribulóz-bifoszfát-karboxiláz kisméretű alegysége, ezt 1500 bp EcoRI-SphI fragmensként izoláltuk. Az SphI hasítás pontosan azon a helyen következik be, ahol az érett, kisméretű alegység-fehérjét kódoló szakasz kezdődik.

A pLK57 és pATS3 plazmidokat EcoRI és SphI alkalmazásával nyitottuk. A kapott 2,9 bp EcoRI-SphI fragmens T4 DNS-ligáz segítségével végzett recirkularizálása után rekombináns pLKAB1 plazmidot – amely a tranzit-peptidet (Tp) kódoló szekvenciát és annak promoter szakaszát tartalmazta – kaptuk.

Abból a célból, hogy a szignál-peptid hasítási helyén az „sfr” gént helyesen fuzionáljuk, előbb az N-terminális génszekvenciát módosítottuk. Mivel azt figyeltük meg, hogy az „sfr” gén N-terminálisan végzett fúziók során az enzimaktivitás megmarad, a második kodont (AGC) GAC-re módosítottuk a következőképpen:

a) az FokI-BglII fragmenst a pGSR1 plazmidból elválasztottuk,

b) az „sfr” gént in vitro

5'-CATGGCCAGAACCCGCGTCTTGCTGC-3'

szintetikus oligonukleotiddal rekonstruáltuk, majd c) a DNS fragmenst, amely az oligonukleotidet az „sfr” génhez kapcsolva tartalmazza NcoI és BglII-vel emésztett pLK56.2-be inszertáltuk.

Így egy NcoI helyet kaptunk, amely átfedésben volt az ATG indító hellyel. Így a pGSFR2 új plazmidhoz jutottunk. Ez a pGSR1 plazmidtól csupán ezzel a cserével különbözik (lásd az 5B. ábrát).

A pGSFR2 plazmid sfr gént hordozó NcoI-BamHI fragmensének NcoI-helyét a pATS3 tranzit-peptid SphI végével fúzióba vittük a következőképpen:

– a pLK56.2 plazmidot BglII-vel emésztettük

– a pATS3 plazmidból az ssu (small subunit kisméretű alegység) promotort a tranzit-peptiddel BglII-SphI fragmens formájában izoláltuk. A SphI-hely a tranzit-peptid hasítási helyénél helyezkedik el. A 3'-kinyúló SphI végeket Klenow DNS polimerázzal törlöttük.

– az sfr gént a pGSFR2 plazmidból NcoI-BamHI fragmens formájába izoláltuk. Az NcoI hely 5'-kinyúló végét Klenow DNS-polimerázzal betöltöttük.

A Klenow fragmenssel kezelt vég ligálásával rekonstruáltuk a Cys-Met szekvenciát ahogy az a tranzit peptidet kódoló szekvencia természetes hasítási helyén van.

Az „sfr” gén bevezetése egy másik növényfajba

Az alábbiakban igazoltuk a növényekben a kiméra gének kifejezésével indukált bialaphos-rezisztenciát, aminek során a kiméra géneket a megfelelő vektorokkal transzformáltuk. Az „sfr” gént tartalmazó, rekombináns plazmidokat külön-külön vezettük be az Agrobacterium törzsbe C58C1 Rif^R (pGV2260) [DSM 2799] Deblaere és munkatársa módszerével [Nucl. Acid. Res. 13, 1477 (1986)]. Így hibrid Ti plazmidokat tartalmazó rekombináns törzsek alakultak ki. E törzseket alkalmaztuk különböző növényfajok levéllemezeinek a fertőzésére és transzformálására, lényegében Horsh és munkatársai módszerével [Science 227 (1985)]. E különböző növényfajok transzformálását példaként az alábbiakban írjuk le.

1. A Nicotiana tabacum levéllemezésének transzformációja

Az alábbi közegeket (táptalajokat) alkalmaztuk:

A ₁ MS só/2	+1% szaccharóz 0,8% agar pH 5,7
A ₁₀ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 750 mg/l CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,5 g/l 2-(N-morfolinil)-etánsulfonsav (MES), pH 5,7 30 g/l szacharóz
A ₁₁ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES, pH 5,7 2% glukóz 0,8% agar 40 mg/l adenin +1 mg/l 6-(benzil-amino)purin (BAP)
A ₁₂ B5 közeg	0,1 mg/l indol-3-ecetsav (IAA) 500 mg/l Claforan antibiotikum +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES, pH 5,7 2% glukóz 0,8% agar 40 mg/l adenin +1 mg/l BAP 200 mg/l Claforan antibiotikum
A ₁₃ MS só/2	+3% szacharóz 0,5 MES g/l, pH 5,7 0,7% agar 200 mg/l Clarofan antibiotikum
Baktérium-táptalaj=	
= minimál A.	(Miller 1972) 60 mM K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O, 33 mM KH ₂ PO ₄ 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1,7 M trinátrium-citrát 1 mM MgSO ₄ 2 g/l glukóz 50 mg/l B ₁ vitamin.

– A növényi anyag:

Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SR1

A növényeket A₁ táptalajon végzett 6–8 hetes szubkultúrázás után alkalmaztuk.

– A fertőzés:

– a levelekről a középső erezetet és a szegélyt eltávolítottuk;

– a megmaradó levélrészeket körülbelül 0,25 cm² méretű szeletekre vágtuk, és az A₁₀ fertőző közegbe helyeztük (körülbelül 12 szeletet helyeztünk 10 ml A₁₀ közeget tartalmazó Petri-csészébe);

– ezután a szeleteket minden egyes Petri-csészére számítva 25 µl minimál A táptalajon szaporított Agrobacterium törzs kései logaritmikus fázisban lévő tenyészetével fertőztük;

– ezután a Petri-csészéket csekély fényintenzitás mellett 2–3 napon át inkubáltuk; majd

– 2–3 nap elmúltával a közeget eltávolítottuk, és

500 mg/l clarofan-t tartalmazó 20 ml A ₁₀ közeg-gel váltottuk fel.					0,6% agaróz
– Szelektálás és a hajtás megindítása					+200 mg/l Clarofan
– a levéllemezeket szelektálószer tartalmazó A ₁₁ táptalajra helyeztük, amely		5	C ₉ B5 közeg		1 mg/l transz-zeatin
100 mg/l kanamicint; és					+250 mg/l NH ₄ NO ₃
110–100 mg/l foszfinotricint tartalmazott;					400 mg/l glutamin
– a levéllemezeket hetente friss közegbe helyeztük;					0,5 g/l MES pH 5,7
– 3–4 hét múlva regenerálódó kallusok képződtek; ezeket elkülönítettük, és olyan A ₁₂ közegbe helyeztük, amely a szelektálószer a szelektálás során alkalmazott koncentrációban alkalmazta.		10			0,5 g/l PVP
– Gyökereztetés					20 g/l mannitol
– 2–3 hét elmúltával a kallusokat hajtások borították, amelyeket elkülönítettünk, és (szelektálás nélkül) A ₁₃ gyökereztető közegbe vittünk át;		15	C ₁₁ MS só/2		20 g/l glukóz
– 1–2 héten át végeztük a gyökereztetést; majd					40 mg/l adenin
– további néhány hét múlva ezeket a növényeket A ₁ közegben neveltük.					0,6% agaróz
2. Solanum tuberosum (burgonya) gumójának a fertőzése		20			+1 mg/l transz-zeatin
Az alábbi közégeket (táptalajokat) alkalmaztuk:					0,01 mg/l gibberellinsav A ₃ (GA ₃)
C ₁ B5 közeg					100 mg/l Clarofan
+250 mg/l NH ₄ NO ₃					+6% szacharóz
300 mg/l Ca(H ₂ PO ₄) ₂					0,7% agar
0,5 g/l MES, pH 5,7		25			
0,5 g/l poli(vinil-pirrolidon) (PVP)					(Miller 1972) 60 mM
40 g/l mannit (=0,22 M)					K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O;
0,8% agar					33 mM KH ₂ PO ₄ ;
40 mg/l adenin					7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ;
C ₂ B5 közeg		30			1,7 M trinátrium-citrát;
+250 mg/l NH ₄ NO ₃					1 mM MgSO ₄ ;
400 mg/l glutamin					2 g/l glukóz;
0,5 g/l MES, pH 5,7					50 mg/l B ₁ vitamin.
0,5 g/l PVP					
40 g/l mannit					– A növényi anyag:
40 mg/l adenin		35			Solanum tuberosum cv. Berolina
0,8% agar					cv. Désirée gumói
+0,5 mg/l transz-zeatin					– A fertőzés:
0,1 mg/l IAA					– A burgonyákat meghámoztuk, és vízzel mostuk;
500 mg/l Clarofan		40			– ezután tömény, kereskedelmi forgalomból beszerezhető fehérítőoldattal 20 percig mostuk; majd
+3% szacharóz					– 3–5 alkalommal steril vízzel öblítettük;
0,7% agar					– a külső réteget (1–1,5 cm) eltávolítottuk;
pH 5,7					– a középső részt körülbelül 1 cm ² felületű, 2–3 mm vastagságú darabokra vágtuk;
C ₇ B5 közeg		45			– a darabokat C ₁ közegbe helyeztük (4 darabot egy-egy 9 cm átmérőjű Petri-csészébe);
+250 mg/l NH ₄ NO ₃					– minden egyes Petri-csészére számítva 10 µl minimál A táptalajon szaporított Agrobacterium törzs kései logaritmikus fázisban lévő tenyészetével fertőztük;
400 mg/l glutamin					– ezután inkubálást végeztünk csekély fényerősség mellett 2 napon át.
0,5 g/l MES, pH 5,7					– Szelektálás és a hajtás megindítása
0,5 g/l PVP		50			– A gumódarabokat szűrőpapíron megszáritottuk, és 100 mg/l kanamicint tartalmazó C ₂ közegbe helyeztük;
20 g/l mannit					– 1 hónap elteltével a darabokról a kis kallusokat eltávolítottuk, és 50 mg/l kanamicint tartalmazó C ₇ közegbe vittük át;
20 g/l glukóz					– további néhány hét elmúltával a kallusokat 50 mg/l kanamicint tartalmazó C ₈ közegbe helyeztük át;
40 mg/l adenin		55			– amennyiben kis hajtások fejlődése indult meg, akkor a kallusokat 50 mg/l kanamicint tartalmazó C ₉ közegbe helyeztük át.
0,6% agaróz					– Gyökereztetés
+0,5 mg/l transz-zeatin					– A megnyúlt hajtásokat elkülönítettük, és C ₁₁ gyökereztető közegbe vittük át;
0,1 mg/l IAA					– a gyökereztetett hajtásokat C ₅ közegben neveltük.
500 mg/l Clarofan		60			
C ₈ B5 közeg					
+250 mg/l NH ₄ NO ₃					
400 mg/l glutamin					
0,5 g/l MES pH 5,7					
0,5 g/l PVP					
20 g/l mannit					
20 g/l glukóz					
40 mg/l adenin					

3. *Lycopersicum esculentum* (paradicsom) levéllemezének a fertőzése

Az alábbi közegeket (táptalajokat) alkalmaztuk:

A ₁ MS só/2	+1% szukróz 0,8% agar pH 5,7	5	400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA
B ₁ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 300 mg/l Ca(H ₂ PO ₄) ₂ 2% glukóz 40 mg/l adenin 40 g/l mannit	10	200 mg/l Clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin
B ₂ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 40 mg/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	15	+1 mg/l transz-zeatin 200 mg/l Clarofan +2% szaccharóz 0,5 g/l MES pH 5,7 0,7% agar
B ₄ B5 közeg	500 mg/l Clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 20 g/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	20	500 mg/l Clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin +1 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l GA ₃
B ₅ B5 közeg	500 mg/l clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 10 g/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	25	B ₈ MS só/2 B ₉ B5 közeg +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES, pH 5,7 0,5 g/l PVP 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin +1 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l GA ₃
B ₅ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 10 g/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	30	Baktérium-táptalaj= =minimál A: (Miller 1972) 60 mM K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O; 33 mM KH ₂ PO ₄ ; 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1,7 M trinátrium-citrát; 1 mM MgSO ₄ ; 2 g/l glukóz; 50 mg/l B ₁ vitamin
B ₅ B5 közeg	+250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 10 g/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	35	– A növényi anyag: <i>Lycopersicum esculentum</i> cv. Lucullus A növényeket A ₁ táptalajon végzett 6 hetes szubkulturázás után alkalmaztuk.
B ₅ B5 közeg	500 mg/l Clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP 400 mg/l glutamin 2% glukóz 0,6% agaróz 40 mg/l adenin 10 g/l mannit +0,5 mg/l transz-zeatin 0,01 mg/l IAA	40	– A fertőzés: – A középső erezetet a levelekről eltávolítottuk; – a leveleket körülbelül 0,25–1 cm ² méretű szeletekre vágtuk (a levelek szélét nem sértettük meg, s így a leveleknek legfeljebb 3 oldala sérült meg); – ezután a szeleteket B ₁ fertőző közegbe helyeztük (a felső oldalúakat lefelé fordítva); egy-egy 9 cm átmérőjű Petri-csészébe 10 szeletet tettünk; – ezután a szeleteket minden egyes Petri-csészére számítva 25 µl minimál A táptalajon szaporított <i>Agrobacterium</i> törzs kései logaritmikus fázisban lévő tenyészetével fertőztük; – a Petri-csészéket csekély fényerősség mellett 2 napon át inkubáltuk; majd – a közeget 2 nap múlva eltávolítottuk, és 500 mg/l clarofan-t tartalmazó B ₁ közeggel váltottuk fel.
B ₆ B5 közeg	500 mg/l Clarofan +250 mg/l NH ₄ NO ₃ 0,5 g/l MES pH 5,7 0,5 g/l PVP	45	– Szelektálás és a hajtás megindítása – A levéllemezeket 50 vagy 100 mg/l kanamicint tartalmazó B ₂ közegbe helyeztük; – a közeg ozmózisnyomását minden 5 napban csökkentettük.
		50	
		55	
		60	

kentettük a mannit koncentrációjának a csökkenésével úgy, hogy a leveleket rendre a B₃, B₄, B₅ majd B₆ közegbe vittük át;

- egy hó elmúltával a kalluszkokat a merisztémával együtt elkülönítettük a levéllemezekről, és 50 vagy 100 mg/l kanamicint tartalmazó B₇ közegbe helyeztük;
- mielőtt kis hajtások alakultak ki, a kalluszkokat B₉ növelő közegbe vittük át, amely 50 vagy 100 mg/l kanamicint tartalmazott.
- A gyökereztetés
- A megnyúlt hajtásokat elkülönítettük, és gyökereztetés céljából B₈ közegbe vittük át;
- a növényeket A₁ közegben neveltük.

A herbicid-rezisztencia vizsgálata melegházi kísérletekben

Anyag és módszer

E kísérletünkben két olyan herbicid készítményt alkalmaztunk, amelyek hatóanyagként foszfínotricint tartalmaztak.

Ezek a készítmények kereskedelmi forgalomban vannak Basta® és Meije Herbiace® márkaneveken.

E készítményeket csapvízzel 2% koncentrációra hígítottuk, majd a permetezést 1 m² területen végeztük. A melegházat dohány és paradicsom esetében 22 °C hőmérsékleten, burgonya esetében 10–15 °C hőmérsékleten tartottuk.

Eredmények

– Dohány vizsgálata permetezéssel

a) kiméra „sfr” génnel – amelyek pGSFR1161 és pGSFR1281 plazmidokban voltak jelen – transzformált *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 növényeket, valamint 10–50 cm magasságú, kezeletlen kontrollnövényeket 20 liter/hektár mennyiségben Basta® készítménnyel kezeltünk. A kontroll SR1 növények 6 nap után elpusztultak, a transzformált növények viszont a 20 liter/hektár mennyiségben alkalmazott Basta® hatásával szemben teljesen ellenállóak voltak, és növekvésük nem volt megkülönböztethető a kezeletlen növényektől. Szemmel látható károsodást akkor sem figyeltünk meg, ha a kezelést kéthetenként megismételtük. A kezelésnek a virágzásra sem volt hatása (a Basta® herbicid készítmény mezőgazdaságban javasolt adagja 2,5–7,5 liter/hektár).

b) Ugyanilyen kísérletet végeztünk 8 liter/hektár mennyiségben alkalmazott Meije Herbiace® készítménnyel. A transzformált növények – ugyanazok, mint az a) kísérletben – teljes mértékben rezisztensek voltak, és növekvésük nem volt megkülönböztethető a kezeletlen növényektől. Szemmel látható károsodást nem figyeltünk meg.

– Burgonya vizsgálata permetezéssel

Kiméra „sfr” génnel – amelyek pGSFR1161 vagy pGSFR1281 plazmidokban voltak jelen – transzformált vagy nem transzformált, 20 cm magasságú burgonyanövényeket (*Solanum tuberosum* c. Berolina) 20 liter/hektár mennyiségben Basta® készítménnyel kezeltünk. A kontrollnövények hat nap után elpusztultak, a transz-

formált növények viszont semmiféle, szemmel látható károsodást nem mutattak, növekvésük nem volt megkülönböztethető a kezeletlen növényekétől.

– Paradicsom vizsgálata permetezéssel

5 Kiméra „sfr” génnel – amelyek pGSFR1161 és pGSFR1281 plazmidokban voltak jelen – transzformált vagy nem transzformált, 25 cm magasságú paradicsomnövényeket (*Lycopersicon esculentum* cv. luculus) 20 liter/hektár mennyiségben Basta® készítménnyel kezeltünk. A kontrollnövények 6 nap után elpusztultak, a transzformált növények viszont teljes mértékben rezisztensek voltak, szemmel látható károsodás nem mutattak, és növekvésük a kontrollnövényekétől nem volt megkülönböztethető.

15 – Fitopatogén (növényi kórokozó) gombák szaporodásának gátlása transzformált növényeken

Kísérleteink egy másik sorozatában kiméra „sfr” géneket kifejező paradicsomnövényeket (a gének pGSFR1161 vagy pGSFR1281 plazmidokban voltak jelen) 20 °C hőmérsékleten, magas páratartalmú környezetben, melegházban neveltünk. A növényeket ml-enként 10⁶ *Phytophthora infestans* spórákat tartalmazó szuszpenzió 1 ml-ével permeteztük, majd 20 °C hőmérsékleten, 95% nedvességtartalom mellett, 4000 lux megvilágítással növesztettük, amíg a gombabetegség tünetei láthatóvá váltak (egy hét). A gombával kezelt növények egyik csoportját bialaphos-szal permeteztük 8 liter/hektár mennyiségben. Két hét múlva a kezeletlen növényeket teljes mértékben elborította a gomba. A gomba szaporodása megszűnt a bialaphos-szal kezelt növényeken, és a betegség tünetei nem fejlődtek tovább. A növényeket a bialaphos fungicid hatása kiválóan megvédte.

30 – A PPT-vel szemben fellépő rezisztencia átvitele a magvak útján

35 Kiméra „sfr” génnel – amelyek pGSFR1161 és pGSFR1281 génekben voltak jelen – transzformált dohánynövényeket melegházban virágzásig neveltünk. A növények termékenysége normális volt.

Minden egyes növényből 500 F1 magot talajba vetettünk (az F1 jelölés arra utal, hogy ezek a magvak az első generációból, tehát közvetlenül a transzformált növényekből származtak). Amidőn a hajtások a 2–3 cm magasságot érték, 8 liter/hektár mennyiségben Basta® készítménnyel bepermeteztük. Hét nap elmúltával megfigyeltük, hogy az egészséges és károsodott növények aránya megközelítőleg 3:1 volt; ez azt mutatja, hogy a PPT-rezisztencia egyetlen helyen kódolt domináns markerként (jelzőként) öröklődött.

10 rezisztens F1 hajtást érett állapotig növesztettünk, majd a magvait összegyűjtöttük. Ezután az F2 hajtásokat a fentiek szerint neveltük, és a PPT rezisztenciát 8 liter/hektár mennyiségben adagolt Basta® készítménnyel való permetezés útján vizsgáltuk. Egyes F1 növényektől olyan F2 hajtások származtak, amelyek mindegyike PPT-rezisztens volt: ez azt mutatja, hogy ezek a növények a rezisztenciagén szempontjából homozigóták voltak.

A találmány olyan növényi sejtekre és növényekre is vonatkozik, amelyek lényegében nem biológiai úton transzformáltak egy találmány szerinti, GS-gátló anyagot inaktíváló génnel.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a növényi sejteket és a növényeket nem biológiai úton transzformáljuk a fentiekben leírt „sfr” génnel.

Az ilyen növényi sejtek és növények genom-állományukban stabilisan integrált, a fajtára nézve nem specifikus jelleggel rendelkeznek, amelyek által kimutatható mennyiségű foszfinotricin-acetil-transzferáz termelésére képesek.

Ez a jelleg a transzformált növényi sejteknek és növényeknek a fajtára nézve nem specifikus enzimaktivitást biztosít, amely képessé teszi ezeket a növényi sejteket és növényeket a GS-gátlók – így a bialaphos és PPT – inaktiválására vagy közömbösítésére.

Ennek megfelelően a találmány szerint transzformált növényi sejtek és növények rezisztensekké válnak a bialaphos és azzal rokon vegyületek herbicid hatásával szemben.

Mivel a bialaphos-t kezdetben fungicidnek minősítették, a transzformált növények gombás megbetegedésekkel szemben megvédhetők úgy, hogy a bialaphos-szal többször permetezzük.

Egy előnyös kiviteli mód szerint a bialaphos-t vagy azzal rokon vegyületeket több ízben – különösen körülbelül 20–100 napos időközökben – alkalmazzuk.

A találmány értelmében növényfajokat szelektíven megvédünk gombás megbetegedésekkel szemben, és szabadföldön szelektíven kiirtjuk a gyomokat. Ez abban áll, hogy a területen hatóanyagként valamilyen GS-gátló anyagot tartalmazó herbicidszerrel kezelünk olyan növényeket, amelyek genom-állományában tartalmazott DNS-fragmentum GS-gátló anyagokat közömbösítő vagy inaktíváló enzimaktivitással rendelkező fehérje kódolásáért felelős.

Nyilvánvaló, hogy ez az eljárás ugyanilyen hatékonyan alkalmazható szabadföldön gyomok irtására akkor is, ha a növényeket gombák nem fertőzik; vagy gombás megbetegedés gátlására, ha ez gyomirtás után lép fel.

Az eljárás egy előnyös megvalósítási módja szerint a növényfajokat a fentiekben leírt „sfr” gént tartalmazó DNS-fragmentummal transzformáljuk, és herbicidszerként PPT-t vagy valamilyen rokonvegyületet alkalmazunk.

Ennek megfelelően a szabadföldön a PPT vagy valamilyen rokon vegyület oldatát alkalmazzuk – például permetezéssel – többszörös kijuttatással, a termesztett növényfaj kikelése után mindaddig, amíg a korán vagy későn fejlődő gyomok elpusztulnak.

Teljesen nyilvánvaló, hogy a termesztett növényfajok kikelése előtt a terület (talaj) a gyomok elpusztítása céljából herbicidkészítménnyel kezelhető.

Másrészt, a talaj a termesztendő növények elvetése előtt is kezelhető.

A kívánt növényfajok kikelése előtt a terület (talaj) bármilyen rendelkezésre álló herbicidszerrel – beleértve a bialaphos típusú herbicideket is – kezelhető.

A kívánt növényfajok kikelése után a bialaphos-t vagy valamilyen rokon vegyületet többször kijuttatjuk.

Az eljárás egy előnyös kiviteli módja szerint a herbicid szert körülbelül 20–100 napos időközökben juttatjuk ki.

Mivel a termesztési kívánt növényeket úgy transzformáljuk, hogy rezisztensekké válnak a bialaphos-típusú herbicid szerekkel szemben, azért a kijuttatást a termesztett növények kikelése után is végezhetjük. Ez különösen hasznos arra a célra, hogy korán és későn kifejlődő gyomnövényeket teljes mértékben kiirtsunk a termesztett növényekre kifejtett bármely hatás nélkül.

A bialaphos-t vagy annak valamilyen rokon vegyületét célszerűen körülbelül 0,4 kg/hektár-tól körülbelül 1,6 kg/hektárig terjedő mennyiségben juttatjuk ki úgy, hogy folyékony vivőanyaggal olyan koncentrációra hígítjuk, hogy a kijuttatás a területre körülbelül 2 liter/hektártól körülbelül 8 liter/hektárig terjedő mennyiségben történjék.

Az alábbiakban példákat adunk meg az eljárás néhány kiviteli módjára különböző növényfajokon.

– *Cukorrépa*

Észak-európai cukorrépát március 15. és április 15. között palántáztunk az időjárási feltételektől, közelebből a csapadék mennyiségétől és az átlagos hőmérséklettől függően. A gyomokkal kapcsolatos problémák többé-kevésbé minden országban azonosak, és mindaddig nehézségeket okoznak, amíg a termés július közepe körül maximálissá válik.

A gyomokkal kapcsolatos problémák háromfélék:

- fűgyomok korai csírázása;
- széleslevelű gyomok korai csírázása;
- széleslevelű gyomok kései csírázása.

Mindaddig sikeresen alkalmazták a kikelés előtti gyomirtó szereket. Ilyenek például a kereskedelmi forgalomból Pyramin[®], Goltix[®] és Venzar[®] néven beszerezhető készítmények. Mivel azonban e készítmények száraz időjárással szemben érzékenyek, és megmaradó (tartós) aktivitásuk – mely a későn csírázó gyomok irtására alkalmas – nincsen, a termelők a kikelés előtt alkalmazott készítmények mellett kikelés után használatos készítményeket is alkalmaztak.

Az I. táblázatban feltüntettük az előző példákban idézett herbicidkészítmények hatóanyagait.

I. táblázat

	Kereskedelmi név	Hatóanyag	Szerforma
45	Avadex [®]	Diallát	EC 400 g/l
	Avadex BW [®]	Triallát	EC 400 g/l
	Goltix [®]	Metamitron	WP 70%
	Roneet [®]	Cikloát	EC 718 g/l
	Tramat [®]	Etofumarát	EC 200 g/l
50	Fervinal [®]	Alloxidin-nátrium	SP 75%
	Basta [®]	Foszfinotricin	200 g/l
	Pyramin FL [®]	Kloridazon	SC 430 g/l

A találmány értelmében a kikelés előtt alkalmazott herbicidszerek bialaphos-t vagy azzal rokon vegyületeket tartalmaznak, amelyek biztosítják a kedvező gyomirtást még élő gyomok esetében is (Bromus, Avena spp., Alopecurus, Poa) és széleslevelű gyomok esetében is (Galium, Polygonum, Senecio, Solanum, Mercurialis).

A kikelés után alkalmazható herbicidek a cukorrépa fejlődésének különböző időpontjában juttathatók ki: a szikleveles, a kétleveles vagy a négyleveles stádiumban.

A II. táblázatban példaként bemutatjuk a szabadföldi kezelésekben alkalmazott rendszereket.

Ezekben a példákban kikelés utáni, bialaphos-típusú herbicidszerként Basta® készítményt alkalmaztunk különböző, kikelés előtti herbicidekkel kombinálva. A koncentrációkat liter/hektár vagy kg/hektár mértékegységekben adtuk meg.

II. táblázat

Basta® készítményre alapozott, cukorrépán alkalmazható gyomirtó rendszerek – azzal az előfeltétellel, hogy a cukorrépa a Basta® hatóanyagával szemben rezisztens (liter/hektár- vagy kg/hektárban)

Vetés előtt	Kikelés előtt	Sziklelevelés stádiumban	Kétleveles stádiumban	Négyleveles stádiumban
1. AVADEx® 3,5 liter	–	BASTA® 3 liter	BASTA®/tramat 3 liter 1,5 liter	–
2. AVADEx® 3,5 liter	GOLTIX® 4 kg	–	–	–
3. RONEET® 4 liter	GOLTIX® 5 kg	–	–	–
4. RONEET® 4 liter	GOLTIX® 2,5 kg	–	BASTA® 3 liter	–
5. TRAMAT® 5 liter	–	–	BASTA® 3 liter	BASTA®/GOLTIX® 2 liter 2 kg
6. –	GOLTIX® 2,5 kg	–	BASTA® 3 liter	–
7. –	–	BASTA®/tramat 3 liter 1,7 liter	–	BASTA®/GOLTIX® 3 liter 2 kg
8. PYRAMIN® 6 liter	–	BASTA® 3 liter	Venzar 1 kg	–
9. –	–	BASTA® 3 liter	BASTA®/GOLTIX® 3 liter 2 kg	–
10. DIALATE® 3,5 liter	PYRAMIN® 6 liter	–	BASTA®/Metamitron 3 liter 1 kg	–

– Burgonya

A burgonyát Európában körülbelül 8×10⁶ hektár területen termesztik. Gyomirtásra e területeken főként linuront vagy monolinuront vagy a kereskedelmi forgalomban Metrabuzin® néven beszerezhető készítményt alkalmaznak. Ezek a termékek a legtöbb gyomfajta ellen hatékonyak; azonban például a Galium és Solanum, valamint a később csírázó Chenopodium és Polygonum gyomokat nem mindig irtják eléggé hatásosan, az évelő gyomokra kifejtett hatásuk bizonytalan.

Ismét hangsúlyozzuk, hogy a későn csírázó, széleslevelű gyomok csak az olyan herbicid szerekkel irthatók kikelés utáni alkalmazással, mint a Basta® készítmény.

Az alábbi III. táblázatban példákat adunk meg a szabadföldi kezelésekre burgonyaföldeken.

45

III. táblázat

Basta® készítményre alapozott gyomirtó rendszerek, amelyek burgonyán alkalmazhatók azzal a feltétellel, hogy a burgonya a Basta® hatóanyagával szemben rezisztens

50

Linuron + monolinuron (375 g+375 g/hektár) kikelés előtt

Basta® 3–4 liter/hektár kikelés után (5–15 cm)

55

Basta®/fluazifop-butil 3–4 liter/hektár+2 liter/hektár kikelés után (5–15 cm)

Linuron WP 50% (Afalon®)

Monolinuron WP 47,5% (Aressin®)

Fluazifop-butil EL 250 g/liter (Fusilade®)

60

A fenti kísérletben alkalmazott pGSJ260 és pBG39 törzseket 1985. december 12-én a „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen” gyűjteményben (Göttingen, Német Szövetségi Köztársaság) letétbe helyeztük DSM 3 606, illetve DSM 3 607 sorszám alatt.

Az alábbiakban a találmány további kiviteli módjait írjuk le a 8–11. ábrákra hivatkozva.

Egy másik bialaphos-t termelő törzsből, a *Streptomyces viridochromogenes*-ből egy másik bialaphos-rezisztencia gént izoláltunk. Ezt a második rezisztencia gént „sfrsv” génnek nevezzük.

Ez a második, előnyös, találmány szerinti DNS-fragmentum, amely alkalmas növényi sejtek transzformálására, olyan nukleotid szekvenciát tartalmaz, amely az alábbi szekvenciát tartalmazó polipeptid legalább egy részét kódolja:

```
V S P E R R P V E I R P A T A A D M
A A V C D I V N H Y I E T S T V N F
R T E P Q T P Q E W I D D L E R L Q
D R Y P W L V A E V E G V V A G I A
Y A G P W K A R N A Y D W T V E S T
V Y V S H R H Q R L G L G S T L Y T
H L L K S M E A Q G F K S V V A V I
G L P N D P S V R L H E A L G Y T A
R G T L R A A G Y K H G G W H D V G
P W Q R D F E L P A P P R P V R P V
T Q I *
```

A polipeptidnek e része elegendő hosszúságú ahhoz, hogy növényi sejtek számára védelmet biztosítson a bialaphos-típusú gyomirtó szerekkel szemben, ha a polipeptidnek e részét genetikailag a növényi sejtbe beépítjük, és abban kifejeződik. Az alábbiakban ezt a jelleget a fenti nukleotid-szekvencia bialaphos-szal szemben mutatott „növényvédő képességének” nevezzük.

A fenti szekvenciában – és az alábbiakban is – az aminosavakat betűkkel jelöljük, ezek jelentése az alábbi:

Alanin	A	Leucin	L
Arginin	R	Lizin	K
Aszparagin	N	Metionin	M
Aszparaginsav	D	Fenil-alanin	F
Cisztein	C	Prolin	P
Cisztin	C	Szerin	S
Glicin	G	Treonin	T
Glutaminsav	E	Triptofán	W
Glutamin	Q	Tirozin	Y
Hisztidin	H	Valin	V
Izoleucin	I		

Ez a második, előnyös DNS-fragmentum az alábbi nukleotid szekvencia –

```
5 TAAAGAGGTGCCCCCACCCTTTTCGAGAACACCGAAGGAGACCACAC
↓
GTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTGAGATCCGTCCCGCCACCGCGCCGA
CATGGCGGCGGTCTGCACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCAGG
10 TCAACTTCCGTACGGAGCCGCACTCCGAGGAGTGGATCGACGACCTG
GAGCGCCTCCAGGACCGCTACCCCTGGCTCGTCCCGAGGTGGAGGGCGT
CGTCCCGGCGATCGCCTACGCCGGCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCCTACG
15 ACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTACGTCTCCACCGGCACCAGCGGCTC
GGACTGGGCTCCACCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGGAGGCCCA
GGGCTTCAAGAGCGTGGTCCCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCG
20 TCGCCCTGCACGAGGCGCTCGGATACACCGCGCGGGACGCTCGGGCA
GCCGGCTACAAGCACGGGGCTGGCAGCAGTGGGGTTCTGGCAGCGCGA
CTTCGAGCTGCCGGCCCCCGCCCCCGCTCCGGCCCGTCACACAGATCT
25 GAGCGGAGAGCGCATGGC
↓
```

– vagy annak egy része, amely a bialaphos-szal szemben megnyilvánuló növényvédő képességet biztosító polipeptidet kódolja.

Az alábbiakban részletesen leírjuk azokat a kísérleteket, amelyek során az „sfrsv” rezisztencia gént izoláltuk, továbbá leírjuk azoknak a kifejező vektoroknak a felépítését, amelyek a rezisztencia gént tartalmazzák, és növényi sejtek transzformálását lehetővé teszik a GS-gátló anyagokkal szemben kifejtett rezisztencia céljából.

„sfrsv” bialaphos-rezisztencia gén klónozása *Streptomyces viridochromogenes*-ből

40 A *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 törzsek (Helv. Chim. Acta 1972) szaporítását és e törzs teljes DNS-ének az elkülönítését standard módszerrel végeztük. A DNS-mintákat PstI, SmaI és Sau3AI alkalmazásával három különböző reakcióban emésztettük, és agaróz-gélen elkülönítettük a BamHI-val hasított pGSR1 plazmidból származó plazmid-DNS-sel együtt (lásd az 5B ábrát). A DNS-t elemzése során nitrocellulóz-szűrőre szívtuk, és az „sfr” gént tartalmazó pGSR1 plazmidból származó, jelzett BamHI
50 fragmentummal hibridizáltuk. A gélnek mind a négy sávjában az egyik restriktós fragmentum intenzív homológiát mutatott egy próbával: PstI fragmentum körülbelül 3 kb, SmaI fragmentum körülbelül 1,2 kb és Sau3AI fragmentum körülbelül 0,5 kb. E gén klónozása céljából a PstI restriktós fragmentumokat az *Escherichia coli* pUC8 vektorban közvetlenül klónoztuk. A transzformálás után kapott 3000 kolóniát nitrocellulóz-szűrőre vittük át, és „sfr” génnel hibridizáltuk. A pozitív termékek szaporodását tovább vizsgál-
60 tuk olyan lemezekben, amelyek 300 µg/ml PPT-t tartal-

maztakminimáltáptalajban. Az egyik transzformáns, amely PPT-tartalmú közegben szaporodott, tovább elemeztük. A 8. ábrában mutatjuk e ennek a pJS1 plazmidnak a térképét és lényeges restrikciós helyeit. Az MC1061 (pJS1) törzset a „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen” (DSM) gyűjteményben 1987. március 6-án DSM 4023 sorszámmal letétbe helyeztük. A klónozott restrikciós fragmentumot Maxam és Gilbert módszerével szevenáltuk, és homológia útján azonosítani tudtuk a génnek a kódoló szakaszát. Az „sfrsv” gén szekvenciáját a 9. ábra illusztrálja; az aminosav-szekvencia és a nukleotid homológiáját az „sfr” génnel a 10. ábra mutatja.

Az „sfrsv” gén kifejezése

Az „sfrsv” génkzettát is felépítettük, hogy lehetségessé váljék a növényi kifejező vektorokban történő klónozás. A pJS1 plazmidból elkülönítettük az „sfrsv” kódoló szakaszt tartalmazó BanII-BglII fragmentumot a GTG indító kodon nélkül. Ezt a fragmentumot NcoI és BglII-vel hasított pLK56.2 vektorplazmidban a szintetikus 5'-CATGAGCC-3' oligonukleotiddal együtt ligáltuk, ugyanúgy, mint ahogyan ezt az „sfr” gén esetében leírtuk, és az 5. ábrában látható. A pGSR1SV plazmid felépítése vázlatosan a 11. ábrában látható. Mivel mindkét gén hasonló kazettái vannak jelen a pGSR1, illetve pGSR1SV plazmidban, az „sfr” gén növényekben történő kifejezése céljából a fentiekben leírt felépítés követelhető.

A pGSR1SV plazmidot hordozó E. coli törzsekből kapott nyers kivonatok enzimes elemzése olyan acetiláz enzim szintézisét mutatta, amelyek a PPT acetilezésére képesek; e tény a reakciótermékek vékonyréteg-kromatográfiájával igazoltuk.

Ezután a „sfrsv” gént a CaMV 35S promotor szabályzó hatása alatt a pGSF260 plazmid vektorba (4B ábra) inszertáltuk (építettük be), és így a pGSR2SV plazmidhoz jutottunk, amely hasonló a pGSR2 plazmidhoz (6A ábra), azzal a különbséggel, hogy itt „sfrsv” gén van jelen az „sfr” helyett.

Nyilvánvaló, hogy a fenti típusú, herbicid-rezisztencia gének számos más olyan mikroorganizmusból nyerhetők, amelyek PPT-t vagy PPT-származékokat termelnek. Ezek a herbicid-rezisztencia gének azután beépíthetők növényi sejtekbe azoknak a GS-gátló anyagokkal szemben való védelme céljából. Így például bialaphos-rezisztencia gén állítható elő a Kitasatosporia-ból is [J. of Antibiot. 37, 939 (1984)].

„sfrsv” rezisztencia gént tartalmazó, transzformált növényi sejteket és növényeket a pGSR2SV plazmid segítségével kaphatunk, ugyanannak az Agrobacterium-mal közvetített transzformációs rendszernek az alkalmazásával, amelyet fentebb különböző növényfajoknak „sfr” génnel való transzformációja céljából leírtunk.

A növényeket regeneráljuk, és megvizsgáljuk rezisztenciájukat a fentiekben leírt permetezési próbával. Az összes növények hasonlóan viselkedtek, és rezisztensek voltak GS-gátló hatóanyagokat tartalmazó herbicidszerekkel szemben.

Végül, a találmány olyan kombinációra is vonatkozik, amely egyrészt a fenti meghatározás szerint GS-gátlóval szemben rezisztens növényekből és másrészt a megfelelő glutamin-szintetáz-gátlóból áll, gyomoktól mentes növénykultúrák létrehozása céljából.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás foszfinotricin herbicid hatásával szemben toleráns vagy rezisztens növényi sejtek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a kiindulási növényi sejt nukleáris genomjába egy
 - a) a növényi sejt polimeráza által felismerhető promotert tartalmazó promoter-régiót, és
 - b) foszfinotricin vonatkozásában acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t magába foglaló kódoló szakaszt
 magába foglaló rekombináns DNS-t építünk be. (Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a heterológ DNS-ként *Streptomyces hygroscopicus*-ból vagy *Streptomyces viridochromogenes*-ből származtatott DNS-t alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)
3. Az 1–2. igénypontok bármelyike szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként megközelítőleg 22 kD molekulatömegű PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi aminosav-szekvenciát

35

X	Ser	Pro	Glu	Arg	Arg	Pro	Ala	Asp
Ile	Arg	Arg	Ala	Thr	Glu	Ala	Asp	Met
Pro	Ala	Val	Cys	Thr	Ile	Val	Asn	His
Tyr	Ile	Glu	Thr	Ser	Thr	Val	Asn	Phe
Arg	Thr	Glu	Pro	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu
Trp	Thr	Asp	Asp	Leu	Val	Arg	Leu	Arg
Glu	Arg	Tyr	Pro	Trp	Leu	Val	Ala	Glu
Val	Asp	Gly	Glu	Val	Ala	Gly	Ile	Ala
Tyr	Ala	Gly	Pro	Trp	Lys	Ala	Arg	Asn
Ala	Tyr	Asp	Trp	Thr	Ala	Glu	Ser	Thr
Val	Tyr	Val	Ser	Pro	Arg	His	Gln	Arg
Thr	Gly	Leu	Gly	Ser	Thr	Leu	Tyr	Thr
His	Leu	Leu	Lys	Ser	Leu	Glu	Ala	Gln
Gly	Phe	Lys	Ser	Val	Val	Ala	Val	Ile
Gly	Leu	Pro	Asn	Asp	Pro	Ser	Val	Arg
Met	His	Glu	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ala	Pro
Arg	Gly	Met	Leu	Arg	Ala	Ala	Gly	Phe
Lys	His	Gly	Asn	Trp	His	Asp	Val	Gly
Phe	Trp	Gln	Leu	Asp	Phe	Ser	Leu	Pro
Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Val	Leu	Pro	Val
Thr	Glu	Ile						

- ahol X jelentése Met vagy Val –
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi nukleotid szekvenciájú

NTG AGC CCA GAA CCA CCG CCG GCC GAC
 ATC CCG CGT GCC ACC GAG GCG GAC ATG
 CCG CCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC CAC
 TAC ATC GAG ACA AGC ACC GTC AAC TTC
 CGT ACC GAG CCG CAG GAA CCG CAG CAG
 TCG ACC GAG CAC CTC GTC CGT CTC CCG
 GAG CCG TAT CCG TCG CTC GTC GCC GAG
 GTC GAC GCG GAG GTC GCC GCG ATC GCC
 TAC CCG GCC CCG TCG AAG GCA CCG AAC
 GCC TAC GAG TCG ACC GCC GAG TCG ACC
 GTC TAC GTC TCC CCG CAG CAG CCG
 ACC GCA CTC CCG TCC ACC CTC TAC ACC
 CAC CTG CTG AAG TCC CTC GAG GCA CAG
 CCG TTC AAG ACC GTC GTC CCT GTC ATC
 CCG CTC CCG AAC GAC CCG ACC GTC CCG
 ATC CAC GAG CCG CTC GCA TAT CTC CCG
 CCG GCC ATC CTG CCG CCG GCC GCG TTC
 AAG CAC CCG AAC TCG CAT GAC GTC CGT
 TTC TCG CAG CTC GAC TTC ACC CTC CCG
 GTA CCG CCG CGT CCG GTC CTC CCG GTC
 ACC GAG ATC

– ahol N jelentése A vagy G –

DNS-t – vagy annak egy, a PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló részét – alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy promoterként karfiol-mozaikvírus 35S-promotert, TR1'-promotert, TR2'-promotert vagy a Rubisco kis alegységet kódoló gén promoterét alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy rekombináns DNS-ként a promóter szakasz és a kódoló szakasz között elhelyezkedő kloroplaszt tranzit peptidet kódoló másik DNS-t is tartalmazó rekombináns DNS-t alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy másik DNS-ként ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegysége vagy klorofil a/b kötőprotein prekurzorjának tranzit peptidjét kódoló DNS-t alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

9. Az 1–8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy rekombináns DNS-ként még, egy poliadenilezési szignált tartalmazó 3'-nem transzlálódó véget is magába foglaló rekombináns DNS-t alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

10. A 9. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy 3'-nem transzlálódó végként az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS génjéből származó 3'-nem transzlálódó véget alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns DNS-t az említett sejt nukleáris genomjába *Agrobacterium* által közvetített transzformációval építjük be.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy növényi sejtént cukorrépa, rizs, burgonya, paradicsom, kukorica, dohány-növényből származó sejtet alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

13. Eljárás egy növényfajhoz tartozó kultúrnövény-csoport védelmére a termesztési területükön a gyomnövények és/vagy gombák eliminálásával, azzal jellemezve, hogy a termesztési területen sejtjeik genomjába beépítve egy

a) az említett növényi sejt polimeráza által felismerhető promotert, és

b) foszfinotricin vonatkozásában acetyl-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t magába foglaló kódoló szakaszt

10 tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk,

és a termesztési területre foszfinotricint vagy foszfinotricin-részt tartalmazó vegyületet, előnyösen bi-
 15 alafoszt, hatóanyagként tartalmazó herbicidet juttatunk ki.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy heterológ DNS-ként *Streptomyces hygroscopicus*-ból vagy *Streptomyces viridochromogenes*-ből származtatott DNS-t tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy heterológ DNS-ként 22 kD molekulatömegű PPT-acetyl-transzferáz aktivitású proteint kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns DNS-t magába foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy heterológ DNS-ként az alábbi aminosav-szekvenciát

X Ser Pro Glu Arg Arg Pro Ala Asp
 Ile Arg Arg Ala Thr Glu Ala Asp Met
 Pro Ala Val Cys Thr Ile Val Asn His
 Tyr Ile Glu Thr Ser Thr Val Asn Phe
 Arg Thr Glu Pro Glu Glu Pro Glu Glu
 Trp Thr Asp Asp Leu Val Arg Leu Arg
 Glu Arg Tyr Pro Trp Leu Val Ala Glu
 Val Asp Gly Glu Val Ala Gly Ile Ala
 Tyr Ala Gly Pro Trp Lys Ala Arg Asn
 Ala Tyr Asp Trp Thr Ala Glu Ser Thr
 Val Tyr Val Ser Pro Arg His Glu Arg
 Thr Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr
 His Leu Leu Lys Ser Leu Glu Ala Glu
 Gly Phe Lys Ser Val Val Ala Val Ile
 Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
 Met His Glu Ala Leu Gly Tyr Ala Pro
 Arg Gly Met Leu Arg Ala Ala Gly Phe
 Lys His Gly Asn Trp His Asp Val Gly
 Phe Trp Glu Leu Asp Phe Ser Leu Pro
 Val Pro Pro Arg Pro Val Leu Pro Val
 Thr Glu Ile

–Ahol X jelentése Met vagy Val –

magába foglaló proteint – vagy annak egy, PPT-acetyl-transzferáz aktivitású részét – kódoló heterológ DNS-t tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

17. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy heterológ DNS-ként az alábbi nukleotid-szekvenciájú

ATG AGC CCA GAA CCA CCG CCG GTC GAC
 ATC CCG CCG GGC ACC GAG CCG GAC ATG
 CCG CCG GTC TCC ACC ATC CTC AAC CAC
 TAC ATC GAG ACA ACC ACC GTC AAC TTC
 CCG ACC GAC CCG CAA GAA CCG CAC CAG
 TCG ACC GAC CAC CTC CTC CCG CTC CCG
 CAG CCG TAT CCG TCG CTC CTC CCG CAC
 CTC CAC CCG GAC CTC CCG CCG ATC GCU
 TAC CCG CCG CCG TCG AAC CCA CCG AAC
 CCG TAC GAC TCG ACC CCG CAC TCG ACC
 CTC TAC GTC TCG CCG CCG CAC CAG CCG
 ACC CCA CTC CCG TCG ACC CTC TAC ACC
 CAC CTC CTC AAC TCG CTC CAC CCA CAG
 CCG TTC AAC ACC GTC GTC CCG CTC ATC
 CCG CTC CCG AAC CAC CCG ACC GTC CCG
 ATG TAC GAC CCG CTC CCA TAT CCG CCG
 CCG CCG ATG CTC CCG GCU CCG CCG TTC
 AAC CAC CCG AAC TCG CAT GAC GTC CCG
 TTC TCG CAC CTC CAC TTC AAC CTC CCG
 GCA CCG CCG CCG CCG CTC CTC CCG CTC
 ACC GAG ATC

– ahol N jelentése A vagy G –

DNS-t vagy annak egy, PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló részét – tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

18. A 13–17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, promoterként karfiol-mozaikvírus 35S-promotert, TR1'-promotert, TR2'-promotert vagy a Rubisco kis alegységet kódoló gén promotert tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

19. A 13–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy még egy a promoter szakasz és a kódoló szakasz között elhelyezkedő kloroplaszt tranzit peptidet kódoló második DNS-t is tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy második DNS-ként ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegysége vagy klorofil a/b kötőprotein prekursorjának tranzit peptidjét kódoló DNS-t tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

21. A 13–20. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-ként még egy poliadenilező jelt tartalmazó 3'-nem transzlálódó véget is tartalmazó rekombináns DNS-t magukba foglaló növényeket termesztünk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan növényeket termesztünk, amelyekben a rekombináns DNS-ben 3'-nem transzlálódó végként az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS génjéből származó 3'-nem transzlálódó véget alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

23. A 13–22. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a herbicidet a kultúrnövények kikelése után alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

24. A 23. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a herbicideket 20–100 napos intervallumokban alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

25. A 13–24. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,

azzal jellemezve, hogy foszfinotricint tartalmazó herbicidkészítményt alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a foszfinotricint a termőterületen 0,4–1,6 kg/ha mennyiségben alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a foszfinotricint folyékony hígítóanyaggal hígítva 21/ha és 81/ha közötti mennyiségben alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

28. A 13–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a cukorrépa, rizs, burgonya, paradicsom, kukorica, dohány-növényeket védjük.

(Elsőbbsége: 1987. 01. 21.)

29. Eljárás foszfinotricinnel szemben toleráns vagy rezisztens transzformált növényi sejtek tiszta tenyészetének előállítására, amely sejtek a nukleáris genomjukba beépítve egy idegen DNS-t tartalmaznak, *azzal jellemezve*, hogy

20 i) a kiindulási növényi sejtet a növényi sejt kultúrában egy a) az említett növényi sejt polimeráza által felismerhető promoter szakaszt tartalmazó promotert, és

25 b) foszfinotricinnel szemben acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t magába foglaló kódoló szakaszt

tartalmazó rekombináns DNS-sel transzformáljuk és

30 ii) a transzformált sejteket a sejt kultúráknak a nem-transzformált sejteket elpusztítani képes mennyiségű foszfinotricinnel vagy foszfinotricin-részt tartalmazó vegyülettel, előnyösen bialofosszal való kezelésével kisselektáljuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként *Streptomyces hygroscopicus*-ból vagy *Streptomyces viridochromogenes*-ből származtatott DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

31. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként megközelítőleg 22 kD molekulatömegű PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

32. A 29. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi aminosav-szekvenciát

45 X Ser Pro Glu Arg Arg Pro Ala Asp
 Ile Arg Arg Ala Thr Glu Ala Asp MET
 Pro Ala Val Cys Thr Ile Val Asn His
 Tyr Ile Glu Thr Ser Thr Val Asn Phe
 Arg Thr Glu Pro Glu Glu Pro Glu Glu
 Thr Thr Asp Asp Leu Val Arg Leu Arg
 Glu Arg Tyr Pro Trp Leu Val Ala Glu
 50 Val Asp Gly Glu Val Ala Gly Ile Ala
 Tyr Ala Gly Pro Trp Lys Ala Arg Asn
 Ala Tyr Asp Trp Thr Ala Glu Ser Thr
 Val Tyr Val Ser Pro Arg His Cln Arg
 Thr Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr
 His Leu Leu Lys Ser Leu Glu Ala Cln
 55 Gly Phe Lys Ser Val Val Ala Val Ile
 Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
 Met His Glu Ala Leu Gly Tyr Ala Pro
 Arg Gly Met Leu Arg Ala Ala Gly Phe
 Lys His Gly Asn Trp His Asp Val Gly
 Phe Trp Cln Leu Asp Phe Ser Leu Pro
 60 Val Pro Pro Arg Pro Val Leu Pro Val
 Thr Glu Ile

– ahol X jelentése Met vagy Val –
magába foglaló proteint – vagy annak egy, PPT-acetil-transzferáz aktivitású részét – kódoló heterológ DNS-t alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

33. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi nukleotid szekvenciájú

```

NTG AGC CCA GAA CCA CCG CCG GAC
ATC CGC CGT GCC ACC GAG CCG GAC ATG
CCG GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC CAC
TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC AAC TTC
CGT ACC GAG CCG CAG GAA CCG CAG GAG
TGG ATC GAC GAC CTC GTC CGT CTC CCG
GAG CCG TAT CCC TGG CTC GTC CCG GAG
GTC GAC GCG GAG GTC GCG GCG ATC GCG
TAC CCG GCG CCC TGG AAG GCA CCG AAC
GCG TAC GAC TGG ACC GCG GAG TCG ACC
GTC TAC GTC TCC CCC CCG CAC CAG CCG
ACG CCA CTC GCG TCC ACC CTC TAC ACC
CAC CTC CTC AAG TCC CTC GAG GCA CAG
GCG TTC AAG AGC GTG GTC CCT GTC ATC
GCG CTC CCC AAC GAC CCG ACG GTC CCG
ATC CAC GAG GCG CTC GGA TAT CCG CCC
CGC CCG ATC CTC CCG GCG CCG GCG TTC
AAG CAC GCG AAC TCG CAT GAC GTG CGT
TTC TCG CAG CTC GAC TTC ACC CTC CCG
GTA CCG CCC CGT CCG GTC CTC CCC GTC
ACC CCG ATC

```

– ahol N jelentése A vagy G –

DNS-t vagy annak egy, PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló részét – alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

34. A 30–33. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként valamely karfiol-mozaikvírus 35S-promotert, TR1'-promotert, TR2'-promotert vagy a Rubisco kis alegységet kódoló gén promoterét alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

35. A 30–34. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-ként még egy az említett promoterszakasz és említett kódoló szakasz között elhelyezkedő kloroplaszt tranzit-peptidet kódoló másik DNS-t is tartalmazó rekombináns DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

36. A 35. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy másik DNS-ként ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegysége vagy klorofil a/b kötőprotein prekursorjának tranzit-peptidjét kódoló DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

37. A 30–36. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-ként még egy poliadenilezési szignált tartalmazó 3'-nem transzlálódó véget is magába foglaló rekombináns DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3'-nem transzlálódó végként az Agrobacterium tumefaciens T-DNS génjéből származó 3'-nem transzlálódó véget alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

39. A 30–38. igénypontok bármelyike szerinti eljárás,

azzal jellemezve, hogy cukorrépa, rizs, burgonya, kukorica, dohánynövény sejtjeit állítjuk elő.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

40. A 30–39. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns DNS-t a sejtbe Agrobacterium által közvetített transzformációval építjük be.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

41. Eljárás foszfinotricin herbicid hatásával szemben toleráns vagy rezisztens növény vagy növényi szaporítóanyag előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) előállítunk egy transzformált növényi sejtet, amely a nukleáris genomjába beépítve egy

15 a) az említett növényi sejt polimeráza által felismerhető promotert tartalmazó promotor-régiót, és b) foszfinotricin vonatkozásában acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t magába foglaló kódoló szakaszt

magába foglaló rekombináns DNS-t tartalmaz, és

20 ii) regeneráljuk a transzformált sejtéből a transzformált növényt, amely sejtjének nukleáris genomjába beépítve az említett rekombináns DNS-t tartalmazza; vagy

25 a sejtjeinek nukleáris genomjába beépítve a fentieket magába foglaló rekombináns DNS-t tartalmazó növényt termesztünk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

42. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként Streptomyces hygroscopicus-ból vagy Streptomyces viridochromogenes-ből származtatott DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

43. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként megközelítőleg 22 kD molekulatömegű PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló heterológ DNS-t alkalmazunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

44. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi aminosav-szekvenciát

```

X Ser Pro Glu Arg Arg Pro Ala Asp
Ile Arg Arg Ala Thr Glu Ala Asp MET
Pro Ala Val Cys Thr Ile Val Asn His
Tyr Ile Glu Thr Ser Thr Val Asn Phe
Arg Thr Glu Pro Gln Glu Pro Gln Glu
Trp Thr Asp Asp Leu Val Arg Leu Arg
Glu Arg Tyr Pro Trp Leu Val Ala Glu
Val Asp Gly Glu Val Ala Gly Ile Ala
Tyr Ala Gly Pro Trp Lys Ala Arg Asn
Ala Tyr Asp Trp Thr Ala Glu Ser Thr
Val Tyr Val Ser Pro Arg His Gln Arg
Thr Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr
His Leu Leu Lys Ser Leu Glu Ala Gln
Gly Phe Lys Ser Val Val Ala Val Ile
Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
Met His Glu Ala Leu Gly Tyr Ala Pro
Arg Gly Met Leu Arg Ala Ala Gly Phe
Lys His Gly Asn Trp His Asp Val Gly
Phe Trp Gln Leu Asp Phe Ser Leu Pro
Val Pro Pro Arg Pro Val Leu Pro Val
Thr Glu Ile

```

– ahol X jelentése Met vagy Val –
magába foglaló proteint – vagy annak egy, PPT-acetil-transzferáz aktivitású részét – kódoló heterológ DNS-t alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

45. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy heterológ DNS-ként az alábbi nukleotid-szekvenciájú

```

ATG AGC CCA GAA CCA CCG CCG GAC
ATC CGC CGT GCC ACC GAG CCG GAC ATG
CCG CCG GTC TCC ACC ATC GTC AAC CAC
TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC AAC TTC
CGT ACC GAG CCG CAG GAA CCG CAG GAG
TGG ACG GAC GAC CTC GTC CGT CTC CCG
GAG CCG TAT CCC TGG CTC GTC CCG GAG
CTG CAC GCG GAG GTC CCG CCG ATC CCG
TAC CCG GCG CCC TGG AAG CCA CCG AAC
GTC TAC GAC TCG ACC CCG GAG TCG ACC
CTG TAC GTC TCC CCC CCG CAC CAC CCG
AAG GGA CTG GCG TCC ACG CTC TAC ACC
GAC CTG CTG AAG TCC CTC GAG CCA CAG
GGC TTC AAG AGC GTC GTC CCG GTC ATC
GGC CTG CCC AAC GAC CCG ACC GTC CCG
ATG CAC GAC CCG CTC GGA TAT CCG CCC
CCC GCG ATC CTG CCG CCG CCC GCG TTC
AAG CAC GCG AAC TGG CAT GAC GTC CCG
TTC TGG CAC CTG GAC TTC ACC CTC CCG
CTA CCG CCC CGT CCG CTC CTG CCC GTC
ATC GAG ATC

```

– ahol N jelentése A vagy G –

DNS-t vagy annak egy, PPT-acetil-transzferáz aktivitású proteint kódoló részét, alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

46. A 41–45. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy promoterként karfiol-mozaikvírus 35S-promotert, TR1'-promotert, TR2'-promotert

vagy a Rubisco kis alegységet kódoló gén promotérét alkalmazzuk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

47. A 41–46. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy még egy, a promoterszakasz és a kódoló szakasz között elhelyezkedő kloroplaszt tranzit peptidet kódoló másik DNS-t is tartalmazó rekombináns DNS-t alkalmazzunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

48. A 47. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a másik DNS-ként ribulóz-1,5-bifoszfát karboxiláz kis alegysége vagy klorofil a/b kötőprotein prekursorjának tranzit-peptidjét kódoló DNS-t alkalmazzunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

49. A 41–48. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy rekombináns DNS-ként még egy poliadenilezési szignált tartalmazó 3'-nem transzlálódó véget is magába foglaló rekombináns DNS-t alkalmazzunk.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

50. A 49. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy 3'-nem transzlálódó végként az Agrobacterium tumefaciens T-DNS génjéből származó 3'-nem transzlálódó véget alkalmazzuk.

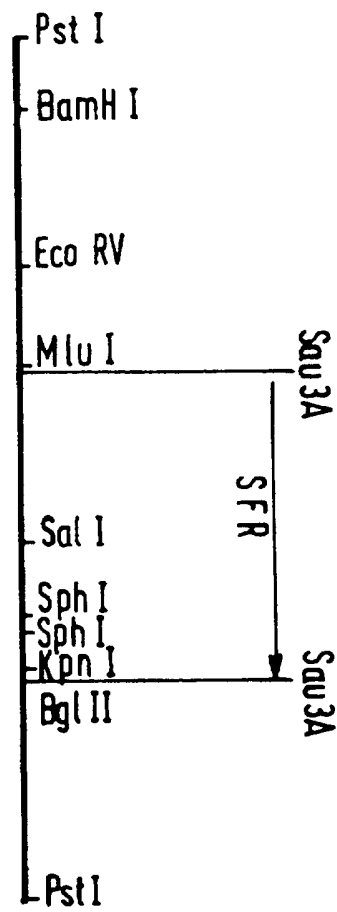
(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

51. A 41–50. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a rekombináns DNS-t a sejtbe Agrobacterium által közvetített transzformációval építjük be.

(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)

52. A 41–50. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy cukorrépa, rizs, burgonya, kukorica, dohánynövényt vagy annak szaporítóanyagát állítjuk elő.

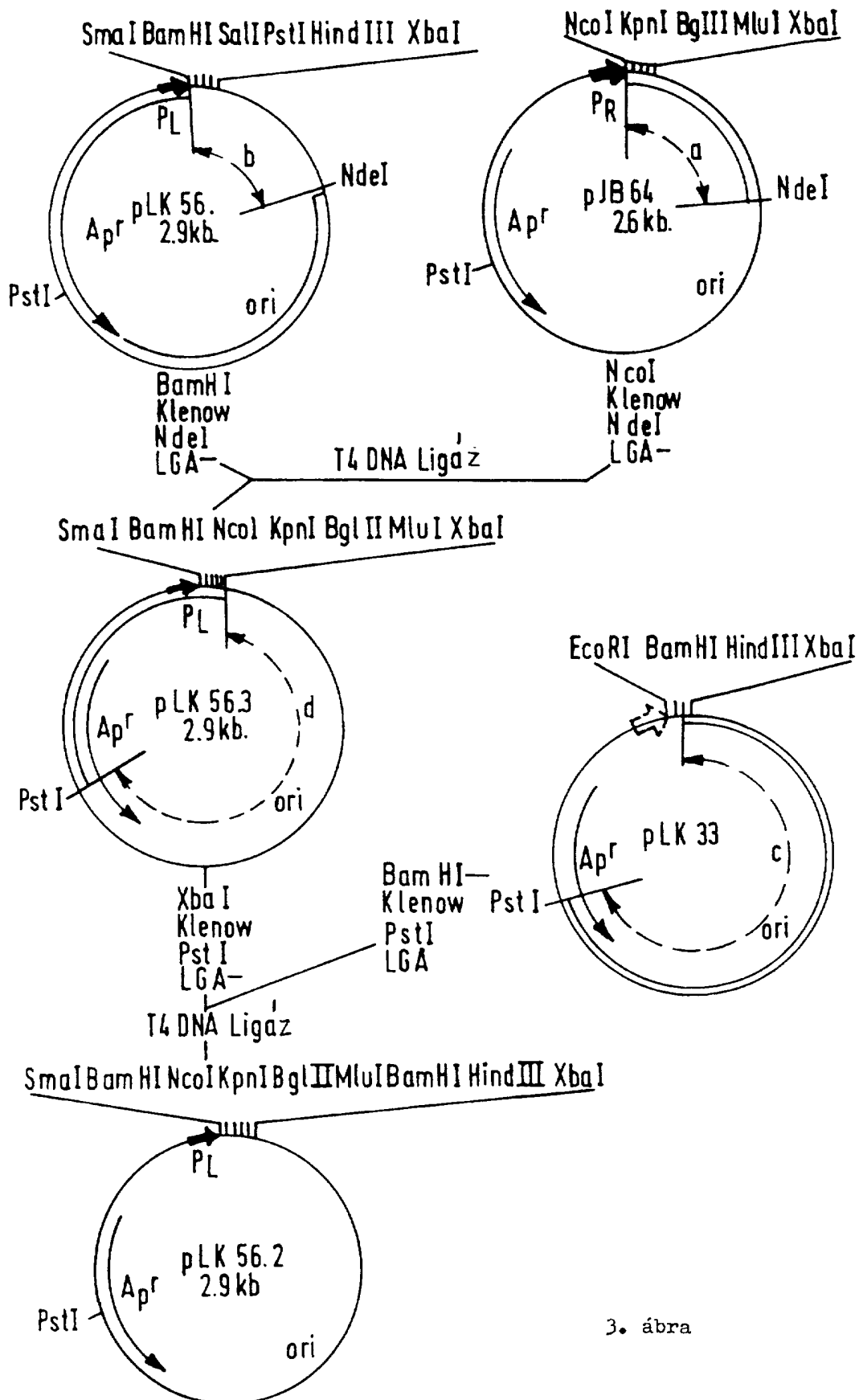
(Elsőbbsége: 1986. 03. 11.)



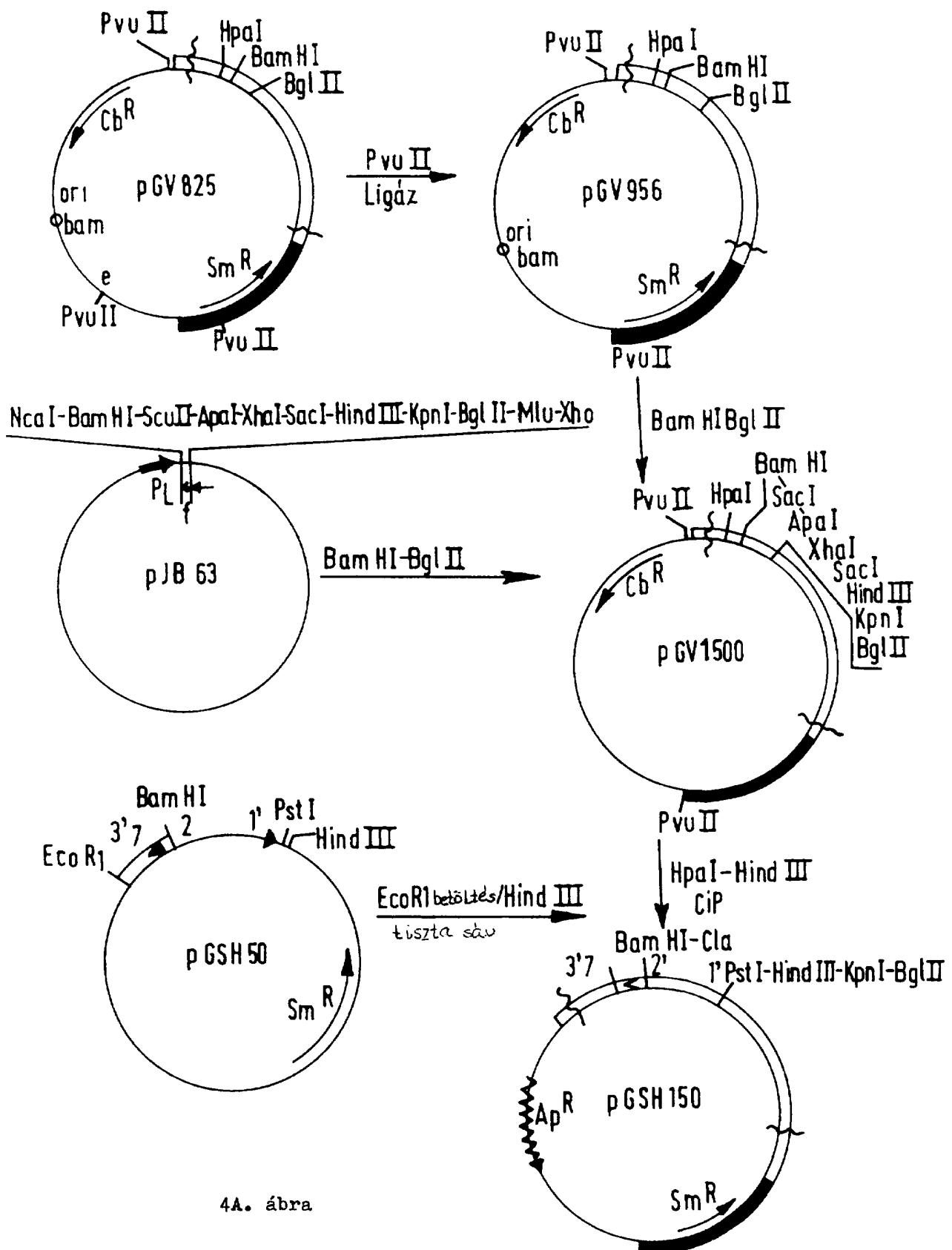
1. ábra

CCC GCT CAA GCT CGC TGT CAT TTT CGA GAC GCC ATC TTT GGA AGC
GGT GGC CGA ATC CGT ACT GCG CGG ACT CGA CGA CGC GTA AAA CGA
TCG ACC ACG TAC ACG AGT CCG GAC ACG GGG CGA GGA GGC CCG GTT
CCG GCA CCG AGG AAG ACC GAA GGA AGA CCA CAC GTG AGC CCA GAA
CGA CGC CCG GCC GAC ATC CGC CGT GCC ACC GAG GCG GAC ATG CCG
FokI↑
GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC CAC TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC
AAC TTC CGT ACC GAG CCG CAG GAA CCG CAG GAG TGG ACG GAC GAC
CTC GTC CGT CTG CCG GAG CGC TAT CCC TGG CTC GTC GCC GAG GTG
GAC GGC GAG GTC GCC GGC ATC GCC TAC GCG GGC CCC TGG AAG GCA
CGC AAC GCC TAC GAC TGG ACG GCC GAG TCG ACC GTG TAC GTC TCC
CCC CGC CAC CAG CCG ACG GGA CTG GGC TCC ACG CTC TAC ACC CAC
CTG CTG AAG TCC CTG GAG GCA CAG GGC TTC AAG AGC GTG GTC GCT
GTC ATC GGG CTG CCC AAC GAC CCG AGC GTG CGC ATG CAC GAG GCG
CTC GGA TAT GCC CCC CGC GGC ATG CTG CCG GCG GCC GGC TTC AAG
CAC GGG AAC TGG CAT GAC GTG GGT TTC TGG CAG CTG GAC TTC AGC
CTG CCG GTA CCG CCC CGT CCG GTC CTG CCC GTC ACC GAG ATC TGA
ACG GAG TGC GCG TGG GCA TCG CCC GAG TTG GAG CTG GTA CCG GAA
CTC ATC GAA CTC AAC TGG CAT ACC CGC AAT GGT GAG GTG GAA CCG
CGG CCG ATC GCG TAC GAC CGT GCC CAG G

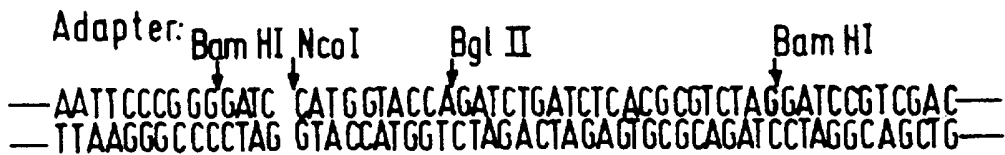
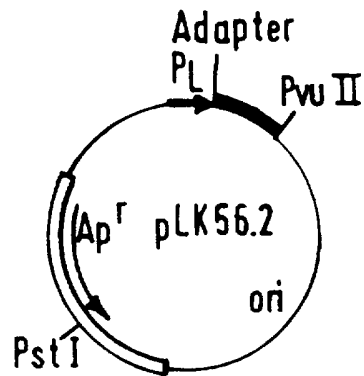
2. ábra



3. ábra

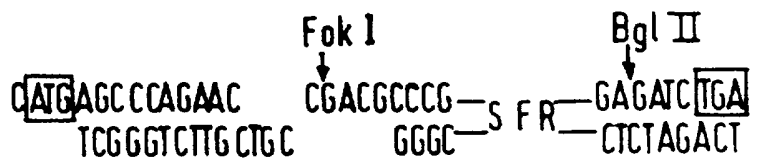


4A. ábra



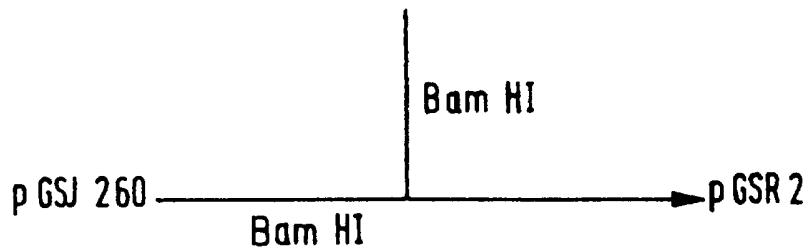
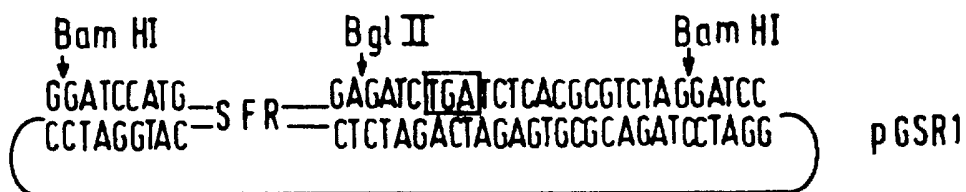
5A. ábra

Nco I / Bgl II

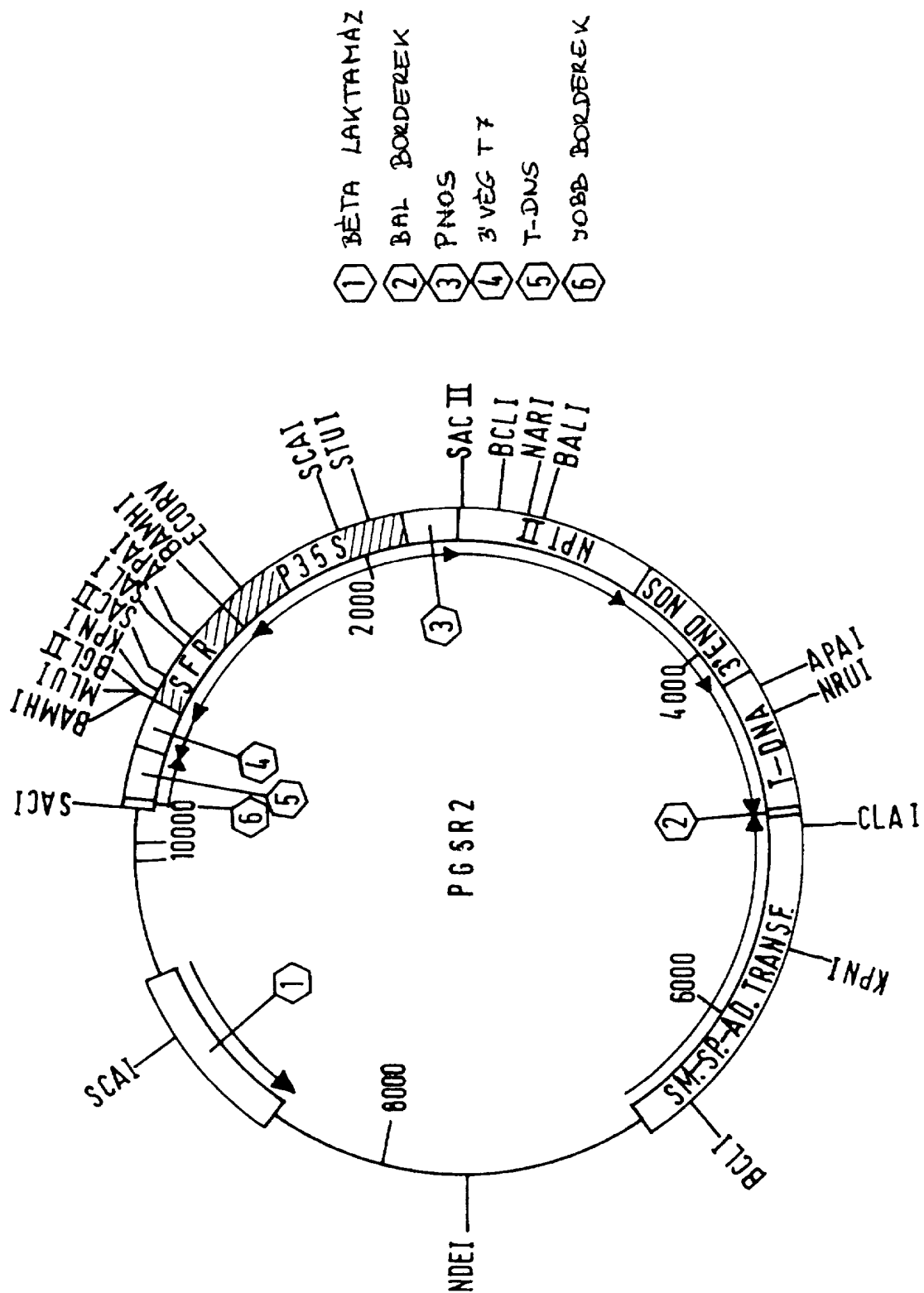


Szintetikus
Oligonukleotidok

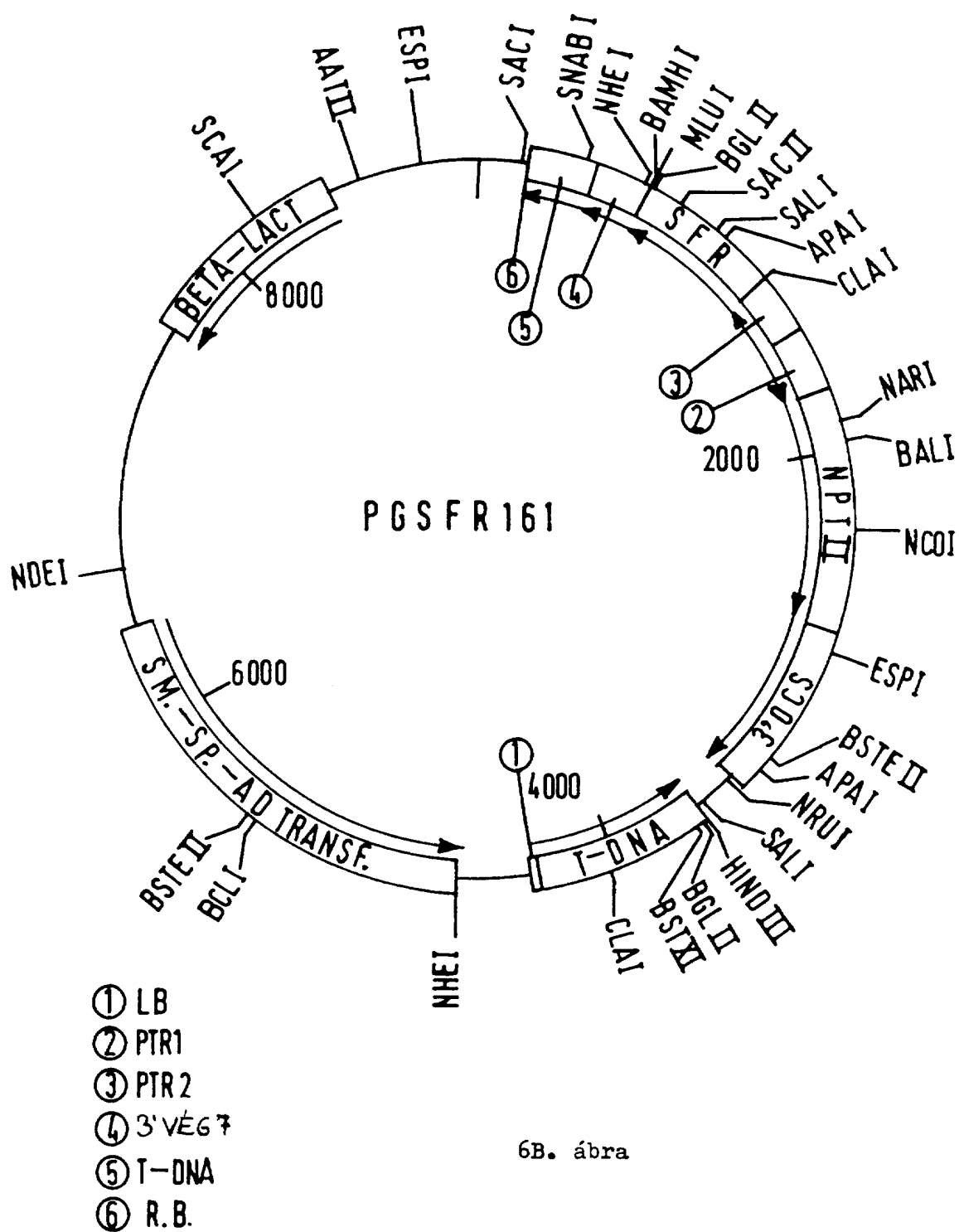
5B. ábra



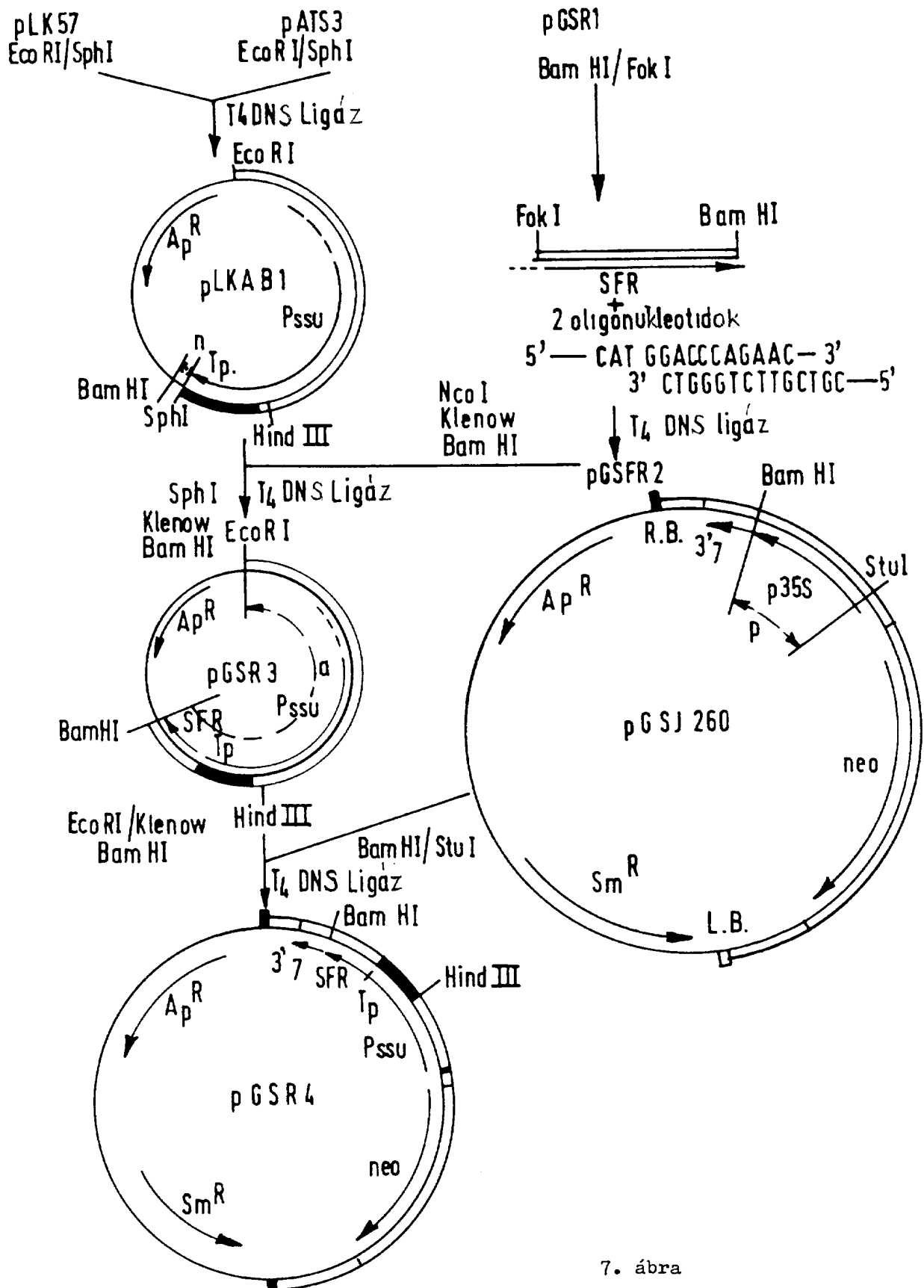
5C. ábra



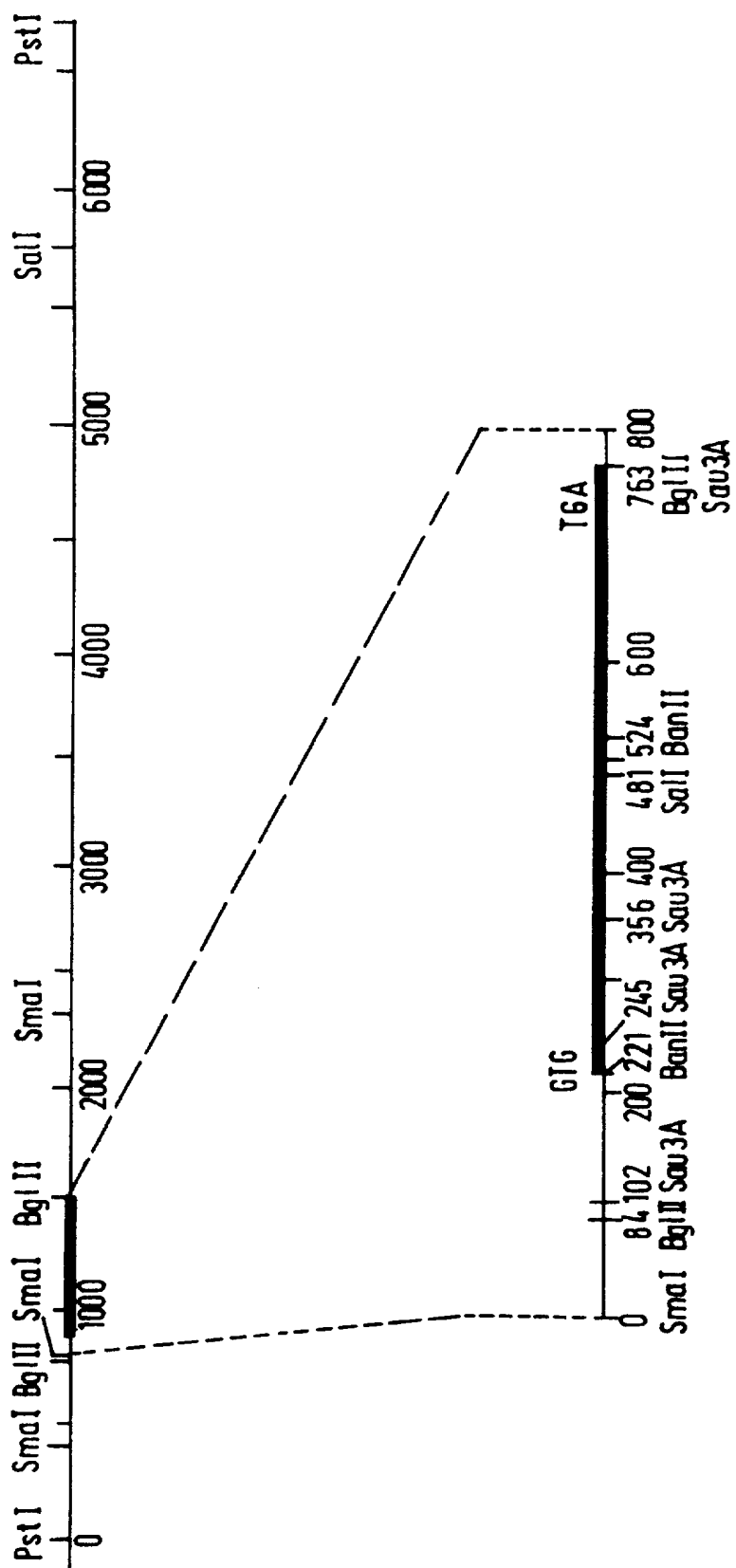
6A ábra



6B. ábra



7. ábra



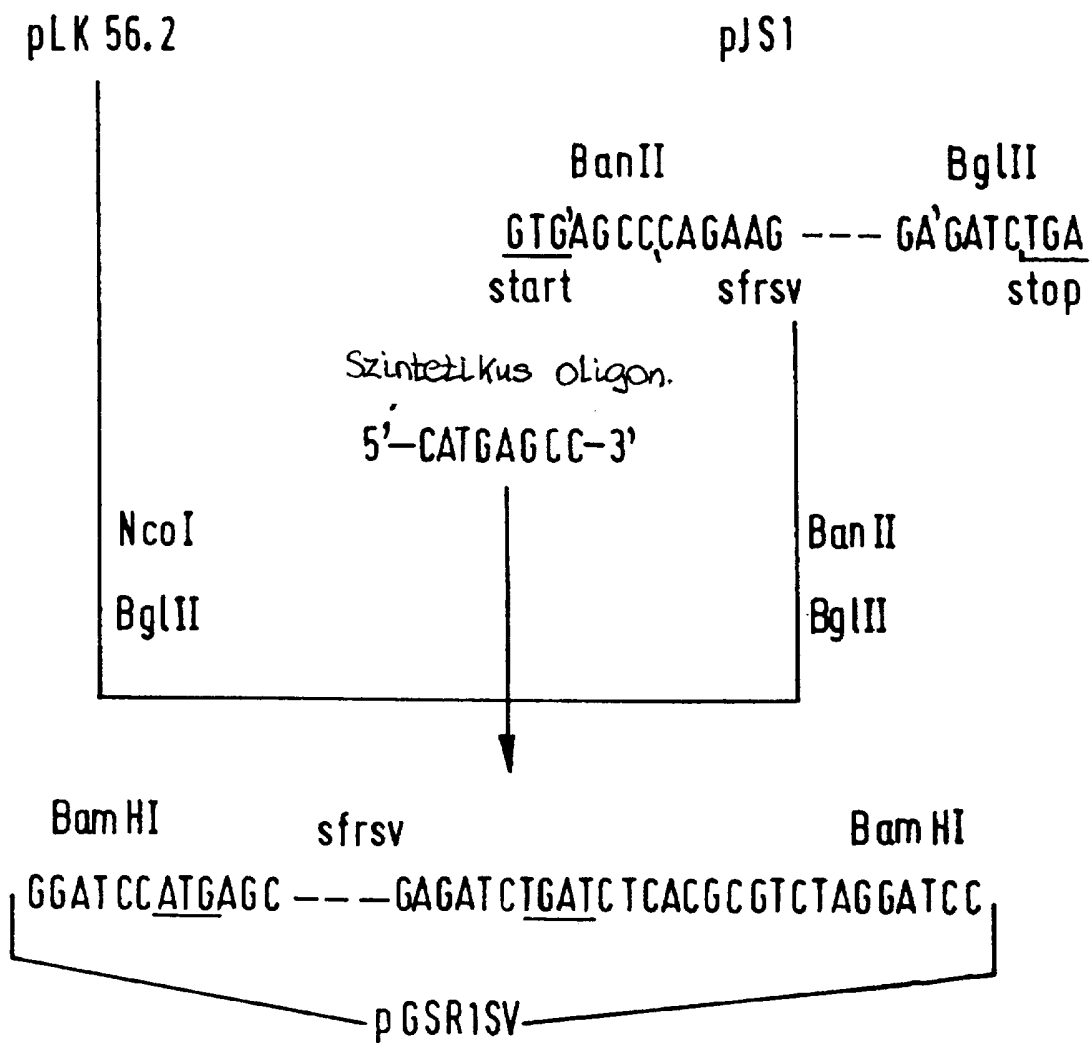
8. ábra

TAAAGAGGTGCCCCGCCACCCGCTTTCCGAGAACACC GAAGGAGACCACAC
↓
GTGAGCCCAGAACGACGCCCGGTCGAGATCCGTCCCGCCACCGCCGCCGA
CATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCACGG
TCAACTTCCGTACGGAGCCGCAGACTCCGCAGGAGTGGATCGACGACCTG
GAGCGCCTCCAGGACCGCTACCCCTGGCTCGTCGCCGAGGTGGAGGGCGT
CGTCGCCGGCATCGCCTACGCCGGCCCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCCTACG
ACTGGACCGTCGAGTCGACGGTGTAAGTCTCCACCGGCCACCAAGCGGCTC
GGACTGGGCTCCACCCCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCATGGAGGGCCCA
GGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCCGTATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCG
TGCGCCTGCACGAGGGCGCTCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCA
GCCGGCTACAAGCACGGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGCAGCGCGA
CTTCGAGCTGCCGGCCCCCGCCCCCGCCCCGTCCGGCCCCGTCAACACAGATCT
↑
GAGCGGAGAGCGCATGGC

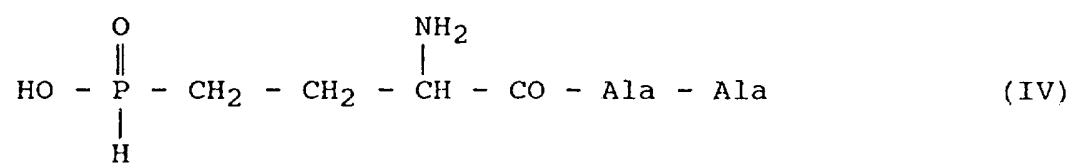
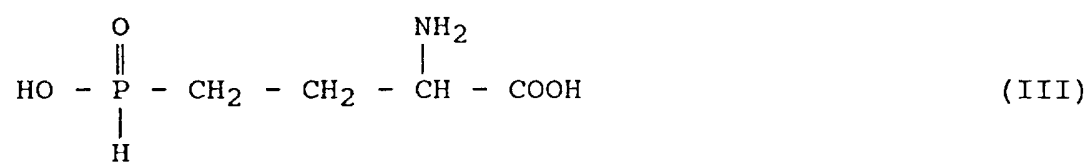
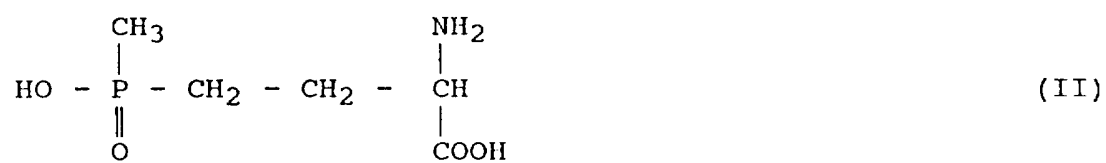
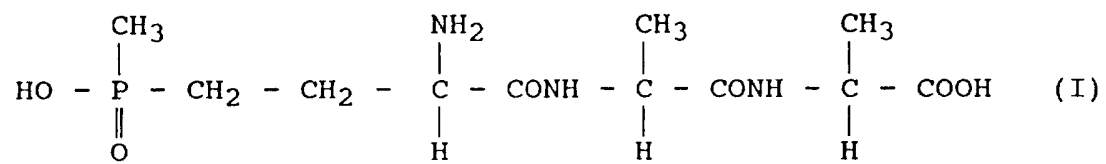
9. ábra

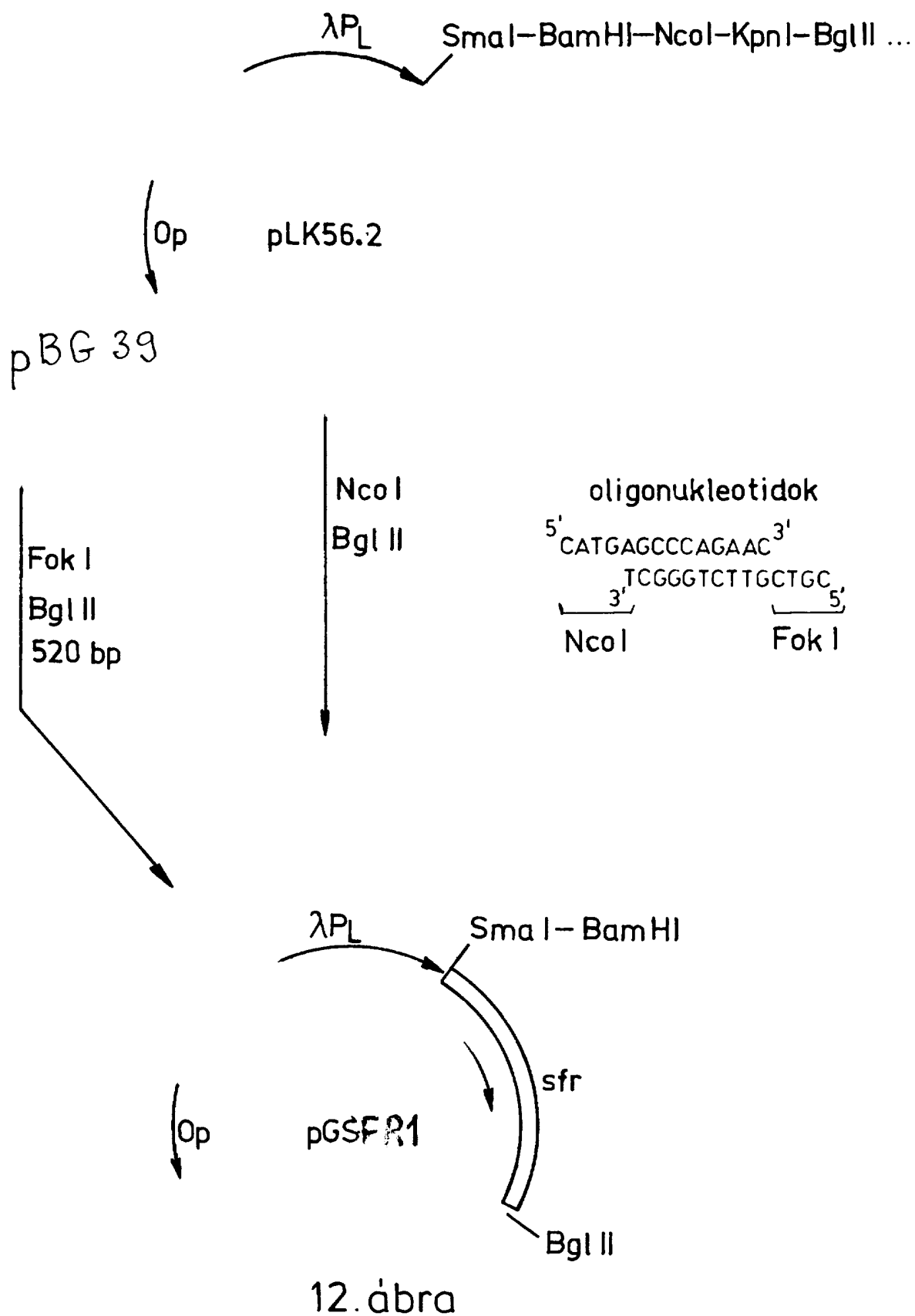
PBG 39	10	20	30	40	50
-----	MSPERRPAD	RRATEADMPA	VCTIVNHYIE	TSTVNFRTEP	QEPQEWTDL
PJS1	-----	-----	-----	-----	-----
	VSPERRPVEI	RPATAADMAA	VCDIVNHYIE	TSTVNFRTEP	QTPQEWIDDL
PBG 39	60	70	80	90	100
-----	VRLRERYPW	VAEVDGEVAG	IAYAGPWKAR	NAYDWTAE	VVSPRHQRT
PJS1	-----	-----	-----	-----	-----
	ERLQDRYP	WLVAEVEGVVAG	IAYAGPWKAR	NAYDWTVEST	VVSHRHQRL
PBG 39	110	120	130	140	150
-----	GLGSTLYTH	LKSLEAQGFK	SVVAVIGLPN	DPSVRMHEAL	GVAPRGMLRA
PJS1	-----	-----	-----	-----	-----
	GLGSTLYTH	LKSMEAQGFK	SVVAVIGLPN	DPSVRLHEAL	GYTARGTLRA
PBG 39	160	170	180		
-----	AGFKHGNWHD	VGFWQLDFSL	PVPPRPVLPV	TEI★	
PJS1	-----	-----	-----	-----	-----
	AGVKHGGWHD	VGFWQRDFEL	PAPPRPVRPV	TQI★	

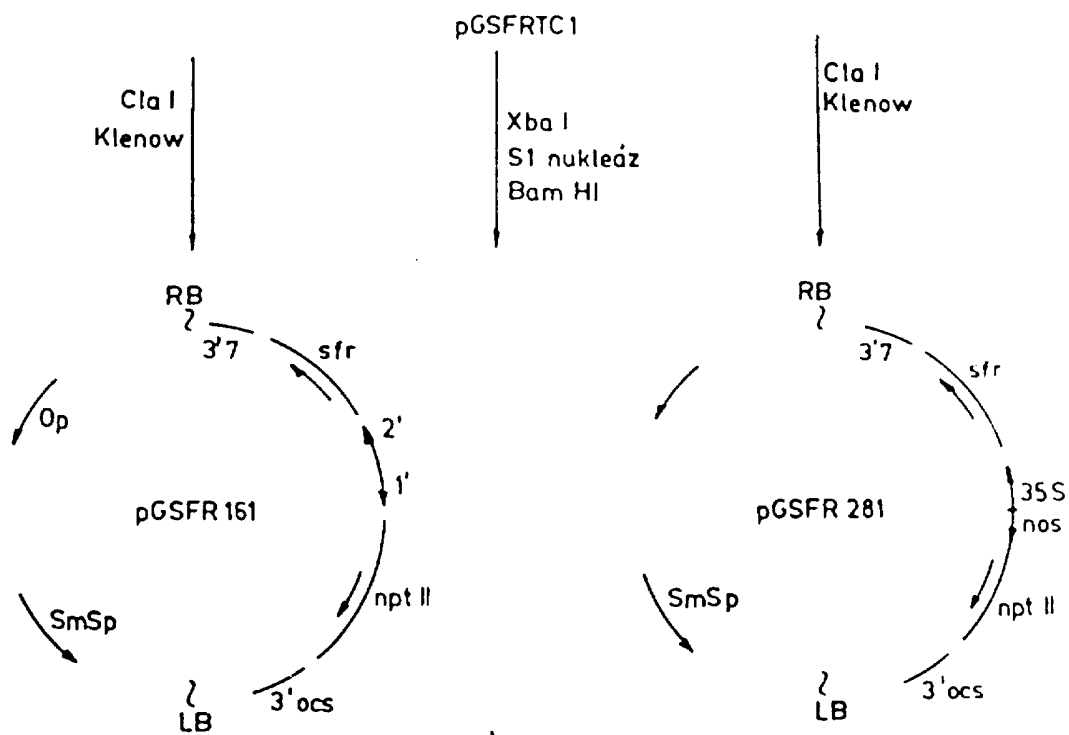
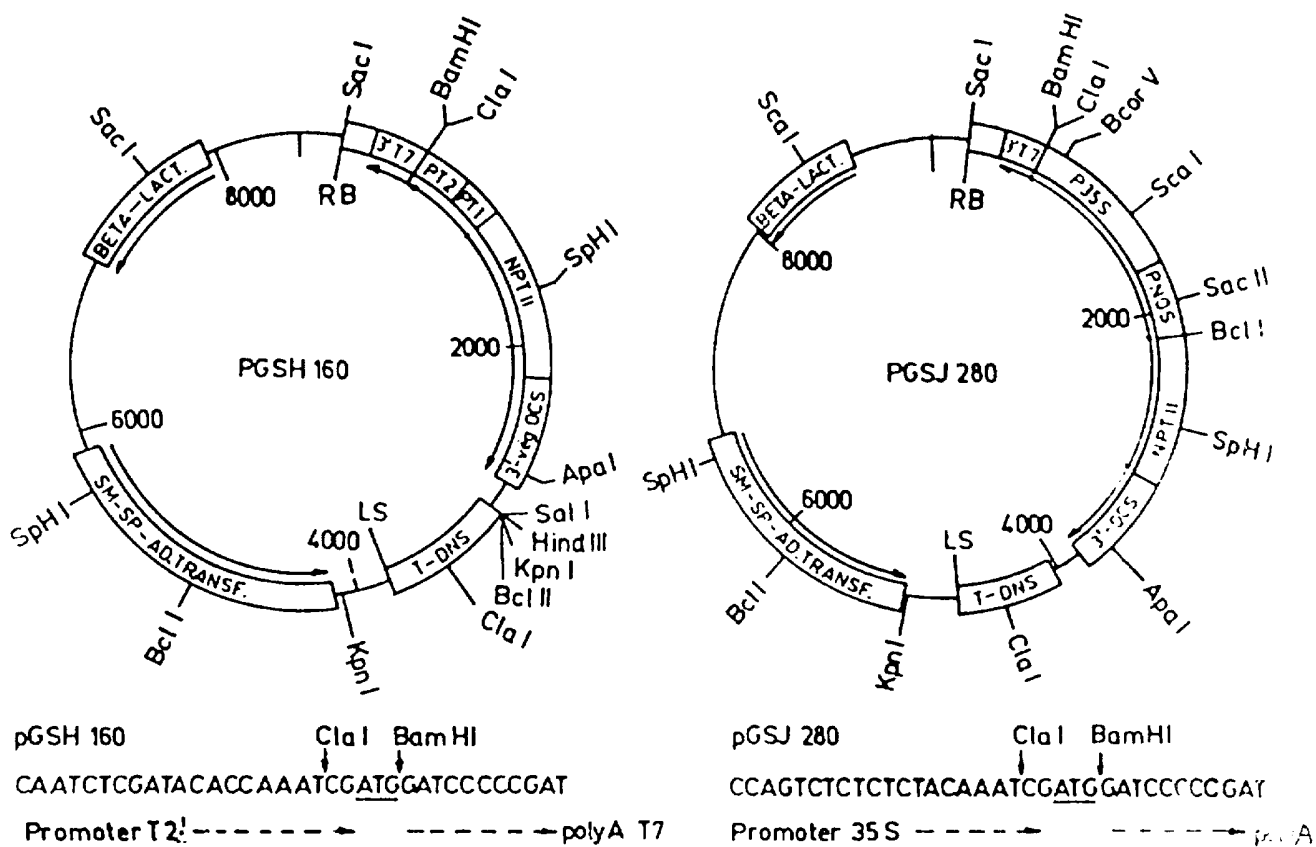
10. ábra



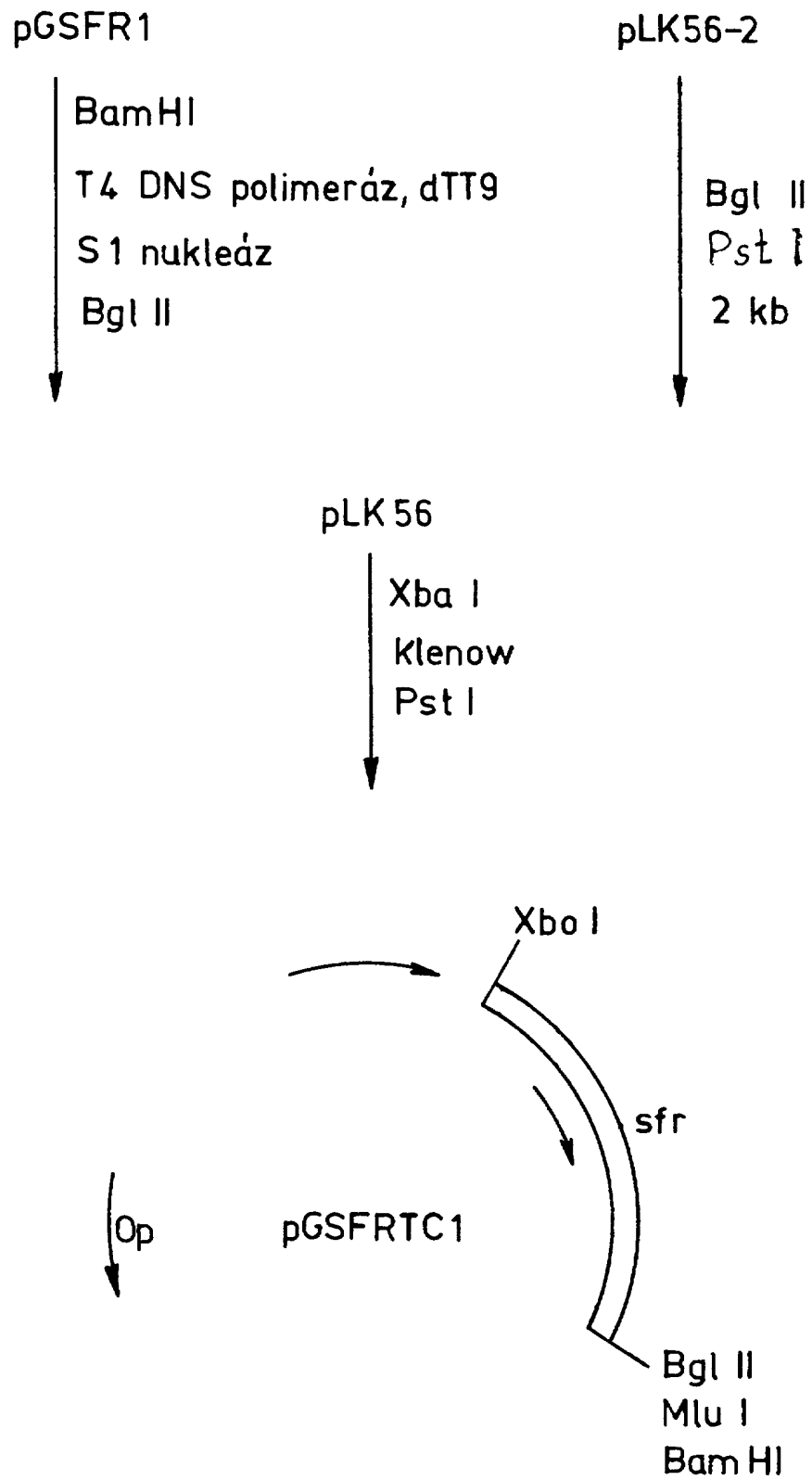
11. ábra



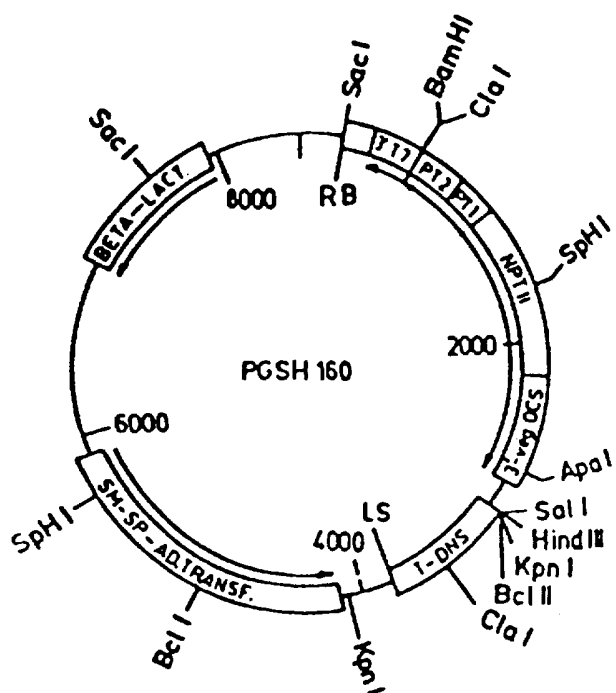




13. ábra



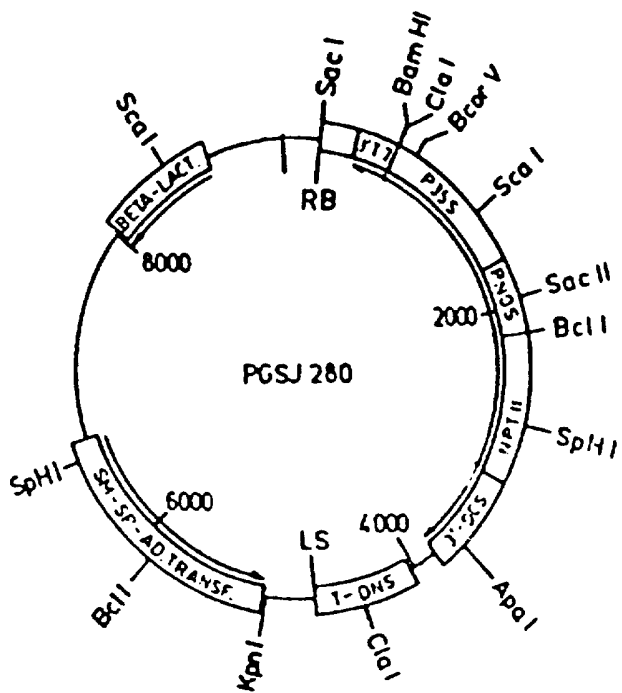
14. ábra



pGSH 160

CAATCTCGATACACCAAATCGATGGATCCCCGAT

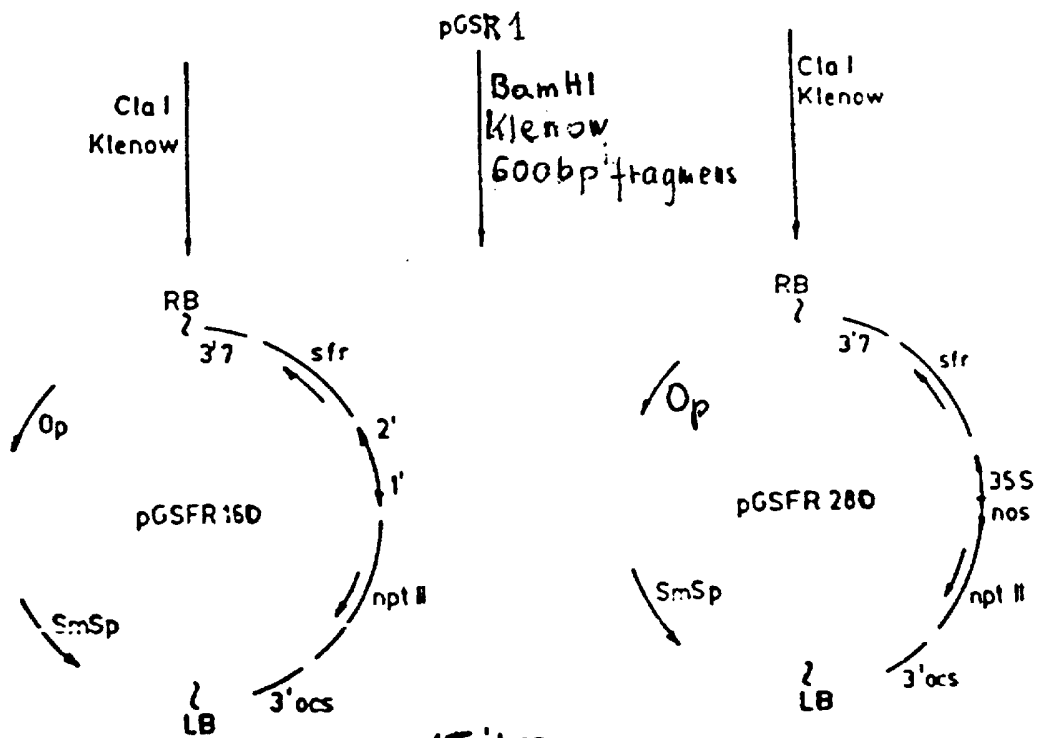
Promoter T2:-----<----->polyA T7



pGSJ 280

pGSJ 280 ClaI BamHI
CCAGTCTCTCTACAAATCGATGGATCCCCGAT

Promoter 35S - - - - - polyA 17



15. obra