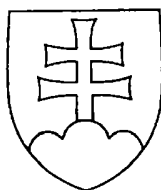


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **6. 12. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/169 512**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **7. 12. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 2. 2003**
Vestník ÚPV SR č.: **2/2003**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/US00/33101**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO01/42480**

(11), (21) Číslo dokumentu:

804-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**C12N 15/82,
A01H 4/00**

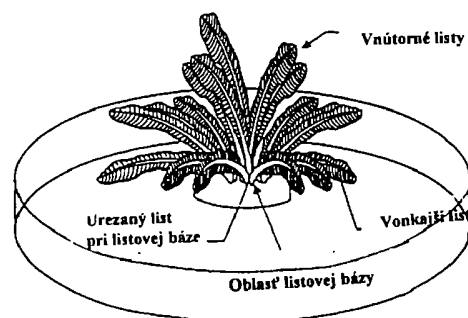
(71) Prihlasovateľ: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC., St. Louis, MO, US;**

(72) Pôvodca: **Connor-Ward Dannette, St. Charles, MO, US;
Hincee Maud A. W., Summerville, SC, US;**

(74) Zástupca: **Guniš Jaroslav, Mgr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob prípravy transgénových buniek cukrovej repy**

(57) Anotácia:
Opisujú sa spôsoby prípravy transgénových buniek a rastlín cukrovej repy. Príprava a použitie explantátov listov z mikropropagovanej kultúry cukrovej repy prispieva k rýchlemu a účinnému zavedeniu sekvencií nukleových kyselín do rastlín cukrovej repy.



Spôsob prípravy transgénových buniek cukrovej repy

Oblasť techniky

Vynález sa týka prípravy geneticky transformovaných rastlín cukrovej repy. Opisujú sa najmä spôsoby a materiály na transformáciu rastlín cukrovej repy pomocou *Agrobacterium tumefaciens* sprostredkujúcej prenos génov.

Doterajší stav techniky

Sacharóza, všeobecne známa ako cukor, tvorí vo svetovom meradle asi 11 % kalorického príjmu ľudí. Cukrová repa (*Beta vulgaris*) je jedným z dvoch hlavných poľnohospodárskych zdrojov jedlého cukru. Približne 40 % svetového zásobovania cukrom sa získava z cukrovej repy, z cukrovej trstiny ako ďalším hlavným poľnohospodárskym zdrojom cukru, tvoriaceho takmer 60 %. Štáty v Európe a bývalom Sovietskom zväze produkujú takmer všetok svoj cukor z rastlín cukrovej repy. V Spojených štátoch približne 30 % spotrebovaného cukru sa získava z cukrovej repy.

Rastliny cukrovej repy podliehajú radu patogénov a škodcov. Poškodenie vírusmi, plesňami, baktériami a hmyzom môže značne znížiť výťažok a kvalitu pozberaného cukru. Zvýšenie odolnosti k týmto faktorom pomocou klasických metód kríženia bolo pomalé. Transformácia rastlín cukrovej repy modernými technikami molekulárnej biológie je atraktívna, avšak cukrová repa sa donedávna ukazovala ako veľmi odolná voči transformácii.

Lindsey a Jones (Plant Cell Rep. 8: 71-74, 1989) opisujú transformáciu protoplastov cukrovej repy elektroporáciou.

Catlin (Plant Cell Rep. 9: 285-288, 1990) oznamujú účinok antibiotík na inhibíciu indukcie kalu a regeneráciu rastlín z kotyledónov cukrovej repy. Zistilo sa, že vznik kalu závisí na genotype. Zistilo sa, že antibiotiká inhibujú tvorbu výhonkov. Catlin navrhuje, že regenerácia cez kotyledónové výpestky, kombinovaná s antibiotickým skreeningovými protokolmi, by mohla byť užitočná pri selekcii transformovaného kalu cukrovej repy.

Jacq a kol. (Plant Cell Rep. 12: 621-624, 1993) opisujú účinky genotypu, acetosyringónu, trvanie predkultúry a spoločnej kultúry na transformáciu cukrovej repy sprostredkovanou *Agrobacteriom*. Hypokotylové a kotyledónové explantáty sa vykrojili zo sadeníc a pestovali sa s *Agrobacteriou*. Transformáty sa kvantifikovali histochemickými a fluorometrickými GUS testami. Transformované rastliny sa nedemonštrovali.

Hall a kol. (WO 95/10178) opisujú spôsob transformácie protoplastov cukrovej repy postupom s polyetylénglykolom nasledovaným selekciou a regeneráciou. Transformačné frekvencie boli medzi $2,5 \times 10^{-5}$ a $6,1 \times 10^{-4}$.

Lindsey a Gallois (J.Exp.Botany, 41: 529-536, 1990) opisujú transformáciu cukrovej repy *Agrobacterium tumefaciens* obsahujúcim binárny vektor. Rezy tkaniva zo základov výhonkov sa očkovali ponorením suspenzie baktérií v kvapaline, indukovali sa s 6-aminobenzylpurínom, aby vznikli výhonky a selektovali sa podľa antibiotickej rezistencie. Výhonky sa preniesli na médium indukujúce korene obsahujúce 1-naftalenooctovú kyselinu a kanamycín. Pri regenerácii výhonkov z tkaniva listov sa dosiahol malý, alebo žiadny úspech.

Hall a kol. (Nature Biotechnol. 14: 1133-1138, 1996) opisujú spôsob generácie transgénových rastlín cukrovej repy z protoplastov ochranných buniek prieduchom. Transformácia DNA polyetylénglykolom sa urobila na protoplastoch odvodených z ochranných buniek prieduchov. Selekcia transformantov sa dosiahla podľa odolnosti k bialopozu. Stabilná transformačná účinnosť protoplastov bola medzi $1,2$ a $5,2 \times 10^{-4}$. Protoplasty sa regenerovali do kalov a rastlín.

Hayakawa a kol. (Proc. Jap. Sugar Beet Technol. 36: 130-135, 1994) opisujú spôsob transformácie cukrovej repy sprostredkovaný *Agrobacterium*. Semená sa nechali vyklíčiť a odstránili sa kotyledóny. Kotyledóny rástli, pokiaľ sa neobjavili listy. Kúsky listov sa narezali a preniesli sa na médium, aby sa umožnila tvorba výhonkov. Výhonky sa použili na tvorbu explantátov, ktoré sa nasledovne transformovali s *Agrobacterium*. Transformované explantáty sa nechali, aby vytvorili výhonky a následne sa zakorenili na vhodných médiách.

Fry a kol. (Poster, Gordon Research Conference on Plant Cell and Tissue Culture, 11.-16.06.1989) opisujú transformáciu a regeneráciu kotyledónových explantátov cukrovej repy očkovaných *Agrobacterium tumefaciens* so zakotvenými exogénnymi sekvenciami nukleovej kyseliny.

Napriek radu spôsobov dostupných pre transformáciu cukrovej repy, existuje potreba spôsobu, ktorý je účinnejší, dáva stály zdroj rastlinného materiálu pre následné pokusy a zabezpečuje alternatívu k existujúcim spôsobom. Tento vynález používa explantáty listov pri spôsobe transformácie sprostredkovej *Agrobacterium*, ktorý umožňuje, aby sa zvyšný rastlinný materiál propagoval *in vitro* pre ďalšie transformačné pokusy. Tento vynález zabezpečuje zlepšené spôsoby pre produkciu transgénových rastlín cukrovej repy, aby získala požadované vlastnosti genetickým inžinierstvom.

Podstata vynálezu

Pri úsilí vyvinúť metódy pre účinnú transformáciu rastlín cukrovej repy sa objavil rad vynálezeckých krokov, ktoré sú veľmi prospešné na zlepšenie výsledkov a na experimentálnu jednoduchosť.

V jednom aspekte tohto vynálezu sa zistilo, že explantáty listov sú prospešné pre následnú transformáciu a také explantáty sa ľahko pripravili z listov mikropropagovaných výhonkov. Mikropropagované kultúry umožňujú vedcovi udržiavať kontinuálnu kultúru, čo významne znižuje čas na prípravu transgénových rastlín cukrovej repy. Pretože sa mikropropagované kultúry ľahko udržiavajú, vedec nemusí kľčiť semená zakaždým, keď chce začať transformačnú procedúru. Mikropropagácia je okrem toho prospešná na zníženie alebo odstránenie nežiaducich chimérnych tkanív.

Znaky a podrobnosti vynálezu budú zrejmejšie vo svetle nasledujúceho podrobného opisu vynálezu.

Tento vynález opisuje spôsob pre účinnú transformáciu rastlín cukrovej repy pomocou baktérii *Agrobacterium tumefaciens* ako prípravku dodávajúceho exogénnu sekvenciu nukleovej kyseliny. Exogénna sekvencia nukleovej kyseliny je výhodne vo forme vektora transformujúceho rastlinu. V tomto vynáleze možno použiť akýkoľvek vektor vhodný na transformáciu rastlín. Vhodný plazmid alebo vektor transformujúci rastliny typicky obsahuje marker, ktorý možno vybrať alebo skreenovať a spojené regulačné prvky, ako sa opisuje, spolu s jednou, či viac nukleovými kyselinami schopnými expsie v rastline spôsobom dostatočným, aby dodal zvláštny žiaduci rys alebo fenotyp rastline. Prieklady vhodných štruktúrnych génov predvídaných týmto vynálezom by zahŕňali, avšak neobmedzujú sa na nich, gény tolerancie voči hmyzu alebo škodcom (baktérie, huby, nematocídy), toleranciu voči herbicidom, gény na zlepšenie kvality, ako výťažky nutričných zlepšení, toleranciu voči okoliu alebo stresu, alebo akékoľvek žiaduce zmeny fyziológie rastlín, rastu, vývoja, morfológie, alebo rastlinných produktov.

Alternatívne, kódujúce sekvencie DNA môžu ovplyvniť tieto fenotypy kódovaním nepreložiteľnej RNA molekuly, ktorá spôsobuje cieleu inhibíciu, expresiu endogénového génu, napríklad cez mechanizmy sprostredkované protismerne alebo kosupresne (pozri napríklad Bird a kol. *Gen. Engin. Re.* 9: 207, 1991), RNA by tiež mohla byť katalytickou RNA molekulou (napríklad ribozým) pripravenou, aby štiepila žiadaný endogénový mRNA produkt (pozri napríklad Gibson a Shillitoe, *Mol. Biotech.* 7: 125, 1997). Teda akýkoľvek gén, ktorý produkuje proteín alebo mRNA, ktorý exprimuje požadovanú zmenu fenotypu alebo morfológie, je užitočný pre prax tohto vynálezu.

Príklady nukleových kyselín, ktoré možno zaviesť metódami zamýšľanými týmto vynálezom, zahŕňajú napríklad sekvencie DNA alebo gény z iných druhov, alebo gény, alebo sekvencie, ktoré pochádzajú, alebo sú prítomné v rovnakom druhu, ale vkladajú sa do prijímajúcich buniek postupmi genetického inžinierstva skôr, než klasickými technikami reprodukcie, alebo šľachtenia. Avšak výrazom exogénny sa tiež myslí, aby sa týkal génov, ktoré nie sú normálne prítomné v bunke, ktorá sa transformuje; alebo asi proste nie sú prítomné vo forme, štruktúre, atď., ako sa nachádzajú v DNA segmente alebo géne, ktorý sa transformuje; alebo gény, ktoré sú normálne prítomné, ale ktoré si niekto praje, aby sa napríklad nadmerne exprimovali. Teda výraz „exogénny“ gén alebo DNA má znamenať každý gén alebo DNA segment, ktorý je zavedený do prijímajúcej bunky bez ohľadu na to, či podobný gén môže byť už prítomný v takej bunke. Typ DNA zahrnutý v exogénnej DNA môže zahŕňať DNA, ktorá je už prítomná v bunke rastliny, DNA z inej rastliny, DNA z iného organizmu alebo DNA generovanú externe, ako je sekvencia DNA obsahujúca protizmyselnú správu o géne alebo sekvencii DNA kódujúcu syntetickú alebo modifikovanú verziu génu.

Transformujúce vektory rastlín všeobecne obsahujú jednu, či viac žiadaných kódujúcich sekvencií nukleových kyselín pod transkripčnou kontrolou 5' a 3' regulačných sekvencií. Také vektory všeobecne obsahujú, operatívne spojené v sekvencii v smere 5' k 3', sekvenciu promótora, ktorá usmerňuje transkripciu po smere štruktúrnej sekvencie nukleových kyselín v rastline, prípadne 5' nepreloženú vedúcu sekvenciu, sekvenciu nukleových kyselín, ktorá kóduje daný proteín a 3' nepreloženú oblasť, ktorá kóduje polyadenylačný signál, ktorý pôsobí v rastlinných bunkách, aby ukončil transkripciu a pridanie polyadenylačných nukleotídov k 3' koncu mRNA kódujúci proteín. Promótor môže byť homológny alebo heterológny k štruktúrnej sekvencii nukleových kyselín. Typické 5' a 3' regulačné sekvencie zahŕňajú začiatkové miesto iniciácie transkripcie, miesto na viazanie ribozómov, signál spracovávajúci RNA, miesto terminácie transkripcie alebo polyadenylačný signál.

Transformujúce vektory rastliny tiež všeobecne obsahujú markér, ktorý možno vybrať alebo skreenovať. Expresia sekvencie markéra, ktorý možno vybrať alebo skreenovať, vedie k fenotypu, ktorý umožňuje diferenciáciu transgénových a netransgénových tkanív cukrovej repy.

Akýkoľvek markér, ktorý možno vybrať, vhodný pre transformáciu rastlín, sa môže použiť v tomto vynáleze. Príklady markérov, ktoré možno vybrať, o ktorých sa uvádza, že v rastlinách fungujú, zahŕňajú EPSPS (Klee a kol., *Mol. Gen. Genet.* 210(3): 437, 1987), neomycínfosfotransferázu (Loopstra a kol., *Plant Mol. Biol.* 15(1): 1, 1990),

hydromycínfosfotransferázu (Meijer a kol., *Plant Mol. Biol.* 16(5): 807, 1991), odolnosť voči metotrexátu (Irdani a kol., *Plant Mol. Biol.* 37(6): 1079, 1998, fosfinotricínacetyltransferázu (Shen a kol., *J. Gen. Virol.* 76: 965, 1995) a odolnosť voči chlór-sulfuronu (Lee a kol., *Plant Cell* 2(5): 415, 1990). Markery, ktoré možno skreenovať, a o ktorých sa uvádza, že v rastlinách fungujú, zahŕňa GFP (Niwa a kol., *Plant J.* 18(4): 455, 1999), GUS (Suzuki a kol., *Plant Cell. Physiol.* 40(3): 289, 1999), CAT (Leisy a kol., *Plant Mol. Biol.* 14(1): 41, 1990) a luciferázu (Macknight a kol., *Plant Mol. Biol.* 27(3): 457, 1995). V niektorých prípadoch kódujúca štruktúrna sekvencia nukleových kyselín tiež pôsobí ako sekvencia markéra, ktorý možno vybrať alebo skreenovať.

Vo svetle tohto opisu budú odborníkom zrejme mnohé iné možné gény markéra, ktorý možno vybrať alebo skreenovať, regulačné prvky inej požadovanej sekvencie. Predchádzajúca diskusia sa teda myslí ako príkladná a nie vyčerpávajúca.

Jedno uskutočnenie vynálezu sa zameriava na spôsob prípravy transgénových buniek cukrovej repy. Spôsob zahŕňa: výber sadenice cukrovej repy, pričom sadenica obsahuje kotyledónovú oblasť a hypokotylóvu oblasť; odstránenie kotyledónovej oblasti a hornej polovice hypokotylovej oblasti zo sadenice; styk kotyledónovej oblasti a hornej polovice hypokotylovej oblasti s mikropropagačným médiom, aby vznikol mikropropagovaný výhonok; pričom mikropropagovaný výhonok obsahuje aspoň jeden list alebo jeho časť, vrátane listovej báze, alebo viac listov; odstránenie listu z mikropropagovaného výhonku oddelením listu pri listovej báze a styk explantátu listu v oblasti listovej báze s *Agrobacteria*. List sa môže oddeliť pri listovej báze pred očkovaním *Agrobacteriom* radom metód, avšak výhodne sa list odreže pri listovej báze použitím vhodného nástroja, ako je skalpel, a rezná plocha listu sa uvedie do styku s kultúrou *Agrobacterium*. Explantát sa pestuje spolu s *Agrobacteria*, kde *Agrobacteria* obsahujú vektor, pričom vektor obsahuje operatívne spojený s orientáciou 5' k 3' : promótor, ktorý riadi transkripciu štruktúrnej sekvencie nukleových kyselín v rastline; štruktúrnú sekvenciu nukleových kyselín a 3' transkripčný terminátor a po inkubácii s *Agrobacteriom* obsahuje infikovaný explantát listu transgénovú bunku cukrovej repy.

Explantát listu obsahuje tu opísanú listovú bázu ako dolnú časť listu, kde sa list styka so základnou oblasťou explantátu (pozri Obr. 5 a 6 na ilustráciu mikropropagovanej kultúry cukrovej repy). V tomto vynáleze možno použiť akýkoľvek list obsahujúci listovú bázu. Celý list, alebo akákoľvek jeho časť obsahujúca listovú bázu, sa môže použiť. List sa výhodne odreže pri listovej báze a celý list obsahujúci základňu listu sa použije na transformačný proces. Listová báza obsahuje spodnú časť listov, kde sú listy pripojené

k mikropropagovanému výhonku. Explantát listu teda obsahuje akýkoľvek list alebo časť listu, ktorá obsahuje listovú bázu. Explantát listu podľa toho môže obsahovať, avšak neobmedzuje sa tým, dolných 10 % listu, dolných 20 %, 50 % alebo celý list, či jeho časti, všetky obsahujúce listovú bázu. Mikropropagovaná kultúra cukrovej repy obsahuje mnohé vrstvy listov, ktoré sú pripojené pri listovej báze. Podľa toho možno použiť list v ktorejkoľvek vrstve, vrátane ktoréhokoľvek vnútorného alebo vonkajšieho listu obsahujúceho listovú bázu (pozri Obr. 5 a 6). Výhodne sa vyberajú vonkajšie listy, takže vnútorná vrstva zostáva nedotknutá. Zvyšné listy sa môžu mikropropagovať alebo skladovať a pestovať in vitro. Zvyšné listy a novo vzniknuté listy sa môžu neskôr použiť ako zdroj explantátov pre budúce pokusy.

Agrobacteriou môže byť všeobecne ktorákoľvek Agrobacteria a výhodne je to Agrobacterium tumefaciens. Výhodné kmene zahŕňajú, avšak neobmedzujú sa na nich, Agrobacterium tumefaciens kmeň C58, kmeň nopalínového typu, ktorý sa používa na sprostredkovanie prenosu DNA do bunky rastliny, kmeň oktopínového typu, ako je LBA4404 alebo kmene sukcinamopínového typu, napríklad EHA101, či EHA105. Použitie týchto kmeňov na transformáciu rastlín sa uvádzalo a metódy sú odborníkom známe. Štruktúrna sekvencia nukleových kyselín môže byť transkribovateľná sekvencia, ktorá dodáva rastline žiadané vlastnosti. Výhodne štruktúrna sekvencia nukleových kyselín kóduje proteín alebo antimediátorovú RNA sekvenciu.

Alternatívne uskutočnenie sa zameriava na spôsoby prípravy transgénových buniek cukrovej repy z mikropropagovanej kultúry. Mikropropagovaná kultúra sa pestuje, aby tvorila mikropropagovaný výhonok, pričom mikropropagovaný výhonok obsahuje aspoň jeden explantát listu, vrátane listovej báze, odstránenie listu pri listovej báze z mikropropagovaného výhonku a styk explantátu listu v oblasti listovej báze s Agrobacteria, kde Agrobacteria obsahuje vektor, ktorý obsahuje operatívne spojený v orientácii 5' k 3' : promótor, ktorý riadi transkripciu štruktúrnej sekvencie nukleových kyselín; štruktúrnú sekvenciu nukleových kyselín a 3' transkripčný terminátor. Po inkubácii s Agrobacteriom infikovaný explantát listu obsahuje transgénovú bunku cukrovej repy. Agrobacteriou môže byť všeobecne ktorákoľvek Agrobacteria a výhodne je to Agrobacterium tumefaciens. Štruktúrna sekvencia nukleových kyselín môže byť ktorákoľvek transkribovateľná sekvencia, ktorá dodáva rastline žiadané vlastnosti. Výhodne štruktúrna sekvencia nukleových kyselín kóduje proteín alebo antimediátorovú RNA sekvenciu.

Vynález sa tiež zameriava na spôsoby prípravy transgénových rastlín cukrovej repy. Spôsoby výhodne zahŕňajú výber sadeníc cukrovej repy, pričom sadenice obsahujú

kotyledónovú oblasť a hypokotylóvú oblasť; odstránenie kotyledónovej oblasti a hornej polovice hypokotylovej oblasti zo sadeníc; styk kotyledónovej oblasti a hornej polovice hypokotylovej oblasti s mikropropagačným médiom, aby vznikol mikropropagovaný výhonok, pričom mikropropagovaný výhonok obsahuje aspoň jeden list obsahujúci listovú bázu, odstránenie listu z mikropropagovaného výhonku pri listovej báze a styk listu v oblasti listovej báze s *Agrobacteria*, aby sa vytvoril infikovaný list, kde *Agrobacterie* obsahujú vektor, ktorý obsahuje operatívne spojený v orientácii 5' k 3': promótor, ktorý riadi transkripciu štruktúrnej sekvencie nukleových kyselín; štruktúrnú sekvenciu nukleových kyselín a 3' transkripčný terminátor; kultiváciu infikovaného explantátu listu, aby sa vytvoril transgénový výhonok; kultiváciu transgénového výhonku, aby sa vytvoril transgénový zakorenený výhonok a rast transgénového zakoreneného výhonu, aby sa vytvorila transgénová rastlina cukrovej repy. *Agrobacteriami* môžu byť všeobecne ktorékoľvek *Agrobacterie* a výhodne je to *Agrobacterium tumefaciens*. Štruktúrna sekvencia nukleových kyselín môže byť ktorákoľvek transkribovateľná sekvencia, ktorá dodáva rastline žiadané vlastnosti. Výhodne štruktúrna sekvencia nukleových kyselín kóduje proteín alebo antimédiátorovú RNA sekvenciu. Semená cukrovej repy sa môžu sterilizovať akoukoľvek prijateľnou metódou a výhodne stykom semená cukrovej repy s hydroxidom sodným, chlórnanom sodným, etanolom alebo kaptánom. Semená cukrovej repy výhodne klíčia v temne alebo pri slabom svetle. Mikropropagačným médiom môže byť všeobecne ktorékoľvek mikropropagačné médium, ktoré je v obore prijateľné. Príklady vhodných médií by zahŕňali, ale neobmedzujú sa na ne, média založené na MS (Murashige a Skoog *Physiol. Plant.* 15:473, 1962), alebo média založené na N6 (Chu a kol., *Scientia Sinica*, 18:659, 1975) doplnené aditívami média, ktoré môžu zahŕňať, ale neobmedzujú sa na nich, aminokyseliny, makroelementy, železo, mikroelementy, vitamíny a organické látky, uhľovodíky, nedefinované zložky média, ako sú hydrolyzáty kazeínu, vhodný želatínujúci prípravok, ako je forma agaru, ako je agaróza s nízkou teplotou topenia alebo Gelrite, pokiaľ sa to žiada. Odborníci poznajú rôzne tkanivové kultivačné médiá, ktoré, keď sa vhodne doplnia, podporujú rast a rozvoj tkanív rastlín a sú vhodné na transformáciu a regeneráciu rastlín. Tieto tkanivové kultivačné médiá sa môžu získať buď ako komerčné preparáty, alebo sa môžu pripraviť a modifikovať podľa potreby. Vybrané médiá sa môžu doplniť vhodnými aditívami v závislosti na stupni procesu transformácie. Napríklad na mikropropagáciu sa môže použiť médium tu označované ako mikropropagačné médium, ktoré podporuje rast a udržanie tkanív rastlín *in vitro*. Tiež v iných stupňoch procesu transformácie, vrátane nie však iba, klíčenie, indukcia výhonkov a indukcia koreňov, sa používajú médiá doplnené vhodnými aditívami

a môžu zahŕňať, ale neobmedzujú sa na nich, médiá ako Linsmaier a Skoog (Linsmaier a Skoog, *Physiol. Plant* 18: 100, 1965), Uchimiya a Murashige (Uchimiya a Murashige, *Plant Physiol.* 54: 936, 1974), Gamborgovo médium (Gamborg a kol., *Exp. Cell Res.*, 50: 151, 1968), McCown's Woody Plant Média (McCown a Loyd, *Hort. Science*, 16: 453, 1981), Nitsch a Nitsch (Nitsch a Nitsch, *Science*, 163: 85-87, 1969) a Schenk a Hildebrandt (Schenk a Hildebrandt, *Can. J. Bot.* 50: 166, 1972) alebo obmeny týchto médií vhodne doplnené. Odborníci sú si vedomí, že médiá a doplnky médií ako živiny a regulátory rastu na použitie v rôznych stupňoch udržiavania rastlín a v rôznych stupňoch transformácie a regenerácie vedľa iných podmienok kultivácie, ako je intenzita svetla počas inkubácie, pH a teplota inkubácie, sa môžu optimalizovať pre daný variant rastlín.

Nasledujúci experimentálny protokol osvetľuje vynález. Bežný odborník ocení, že možno uskutočniť rôzne modifikácie materiálov, médií, trvania procesov, teploty a podmienok osvetlenia napriek tomu, aby sa odchyľilo od vynálezu.

Sterilizácia semien

Semená sa môžu sterilizovať akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je účinný.

Semená cukrovej repy sa dajú do roztoku hydroxidu sodného obsahujúceho asi 1N hydroxid sodný a miešajú sa asi jednu hodinu pri teplote miestnosti. Kvapalina sa dekantuje a semená sa opláchnu destilovanou vodou, aby sa odstránil zvyšný hydroxid sodný. Pridá sa studená voda a semená sa miešajú asi jednu hodinu. Semená sa z kvapaliny vyberú a malá časť povlaku semena sa odstráni z každého zárodka, aby sa časť zárodka semena exponovala. Semená sa krátko opláchnu 95 % etanolom. Roztok etanolu sa dekantuje a semená sa miešajú asi 20 minút v zriedenom roztoku (2,5 % hmot./obj.) chlornanu sodného. Kvapalina sa odstráni a semená sa opláchnu trikrát sterilizovanou destilovanou vodou. Pridá sa kaptán (zmáčaný prášok používaný ako vodný roztok na kontrolu istých plesňových chorôb, Micro Flo Co., Lakeland, FL) a malé množstvo sterilizovanej vody, ktoré stačí na zakrytie semien. Semená nasakujú aspoň jednu hodinu. Nasakovanie môže pokračovať cez noc, pokiaľ sa to žiada.

Klíčenie semien

Semená môžu klíčiť akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je výhodný. Iné formulácie médií, vrátane, avšak nie iba tých skôr opísaných, môžu byť vhodné na podporu klíčenia miesto formulácií médií opísaných nižšie.

Semená sa prenesú z kaptánovej suspenzie na doštičky obsahujúce MSMO médium (Tabuľka 1). Približne 15 semien sa dá na každú 100 a 25 mm doštičku na klíčenie. Doštičky sa dajú do vreciek, výhodne do plastických vrecúšok bez dier. Výhodne semená klíčia v temne a vrecúška sa dajú do temna pri asi 20 °C až 25 °C, výhodne pri asi 23 °C až 24 °C. Inkubáciu v temne možno robiť akýmkoľvek spôsobom, vrátane, nie však iba, umiestnenie vreciek v uzatvorenej lepenkovej škatuli. Optimálne dĺžka uloženia v temne sa mení podľa genotypu cukrovej repy, avšak bude typicky medzi 2 a 4 týždňami. Povlak semena sa odstráni z vyklíčených sadeníc a sadenice sa potom prenesú do nádob obsahujúcich MSMO médium. Sadenice sa inkubujú pri asi 23 °C až 24 °C asi 1-5 dní, výhodne asi 2 dni. Fotoperiódou počas inkubácie sa udržiava pri cykle svetlo : tma asi 16:8.

Tabuľka 1

MSMO médium	
Zložka	Koncentrácia
MSMO soli (Sigma M-68-99)	4,4 g/l
Sacharóza	30 g/l
Pytagar	7 g/l

Iniciácia a udržiavanie kultúr mikropropagovaných výhonkov

Mikropropagované kultúry výhonkov sa môžu iniciovať akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je výhodný v laboratóriu. Iné formulácie médií skôr opísané môžu byť vhodné na iniciáciu kultúr mikropropagovaných výhonkov miesto formulácie médií opísaných nižšie.

Dolná polovica hypokotylovej oblasti sa opatrne odstráni z vyklíčených sadeníc. Časť sadeníc obsahujúca kotyledóny a horná časť hypokotylu sa preniesie do MSMO média obsahujúceho 0,1 mg/l 6-benzylaminopurínu. Po 3 týždňoch inkubácie s osvetlením ako zhora sa výhonky prenesú do čerstvého média. Po ďalších 3 týždňoch sa listy môžu použiť na transformáciu. Výhodne sa použijú vonkajšie listy a najvnútornejšie listy sa použijú na udržiavanie tkaniva in vitro. Na udržiavanie mikropropagovaných kultúr potom, čo sa listy odstránia na nasledujúcu transformáciu, preniesie sa do čerstvého média vrcholová a najvnútornejšia oblasť listu (všeobecne asi 0,5 – 3,0 cm), aby sa udržiavala kultúra mikropropagovaných výhonkov (pozri Obr. 5 a 6). Obr. 5 znázorňuje pohľad zhora na mikropropagovanú kultúru cukrovej repy. Obr. 6 znázorňuje pohľad z boku, ktorý ukazuje vonkajšie listy, vnútorné listy, oblasť listovej báze a oblasť rezu alebo zranenia, kde sa listy

odoberú pri listovej báze. Mikropropagované kultúry cukrovej repy sa výhodne preniesú do čerstvého média aspoň raz za mesiac, aby sa udržiavali zdravé kultúry a pohotový zdroj tkanív na transformáciu. Udržiavaním tkanív cukrovej repy týmto spôsobom je stále k dispozícii vhodný materiál explantátu na transformáciu bez potreby iniciovať kultúry zo smien, čo ušetri aspoň jeden mesiac procesu.

Príprava bakteriálnych kultúr

Bakteriálne kultúry sa môžu pripraviť akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je výhodný v laboratóriu. Iné formulácie médií môžu byť vhodné na prípravu bakteriálnych kultúr miesto formulácií médií opísaných nižšie. Môže sa použiť akýkoľvek kmeň *Agrobacterium*, ktorý je vhodný na spôsoby podľa vynálezu a výhodné je *Agrobacterium tumefaciens*. Spôsoby rastu a udržiavania kultúr *Agrobacterium* sú odborníkom známe.

Agrobacterium tumefaciens obsahujúce exogénnu sekvenciu DNA, ktorá sa má preniesť do cukrovej repy, typicky sa pestujú na LB médiu obsahujúcom selektívne antibiotiká (pozri napríklad LBsck médium obohatené spektinomycínom, chloramfenikolom a kanamycínom, Tabuľka 2). Baktérie sa pestujú pri teplote miestnosti asi 2 až 3 dni. Baktérie sa použijú na iniciáciu kvapalných kultúr v LBsck 2 dni pred transformáciou, aby sa dosiahla vhodná hustota buniek. Baktérie sa zriedia asi 100 krát do ABsck (Tabuľka 3) alebo YEP (Tabuľka 4) média. Na kultúru sa použije asi 2 ml média, hoci odborník vie, že zmeny v mierke kultúry nebudú mať významný vplyv na rast baktérií. Kultúry sa ponechajú inkubovať cez noc v orbitálnej trepačke. Kultúry baktérii sa zriedia asi 12,5 krát do ABsck média alebo do ABsck média obohateného 200 μ M acetosyringónu, výhodne na celkový objem asi 50 ml. Kultúry sa dajú do orbitálnej trepačky a inkubujú sa cez noc asi pri 26 °C. Kultúra sa sleduje, pokiaľ nedosiahne hustota buniek asi $3,0 \times 10^9$ buniek/ml, čo odpovedá OD₆₀₀ asi 1. Objem sa upraví TXD médiom (Tabuľka 5), aby sa dosiahla hustota buniek asi $1,0 \times 10^9$ buniek/ml.

Tabuľka 2

LBsck médium	
Zložka	Koncentrácia
Peptón	10 g/l
Extrakt z kvasníc	5 g/l
Chlorid sodný	5 g/l

Difco bacto agar	15 g/l
Spektinomycín	100 mg/l
Chloramfenikol	25 mg/l
Kanamycín	50 mg/l

Tabuľka 3

ABsck médium

Zložka	Koncentrácia
Glukóza	5 g/l
Pytagar	7,5 g/l
AB soli	25 ml/l
AB pufor	25 ml/l
Spektinomycín	0,1 mg/l
Chloramfenikol	0,025 mg/l
Kanamycín	0,05 mg/l

AB soli (500 ml): 10 g NH_4Cl , 12,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g KCl , 0,1 g CaCl_2 alebo 0,132 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg FeSO_4 alebo 45,55 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

AB pufor (500 ml): 39,33 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ alebo 30,0 g K_2HPO_4 , 11,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Tabuľka 4

YEP médium

Zložka	Koncentrácia
Extrakt z kvasnic	10 g/l
Peptón	10 g/l
Chlorid sodný	5 g/l
pH = 7	

Tabuľka 5

TXD médium

Zložka	Koncentrácia
MS soli s vitamínmi B5 (Sigma M-6899)	4,4 g/l
PCPA	4 mg/l
Kinetin	5 $\mu\text{g/l}$
Sacharóza	30 g/l
pH upravené na 5,8	

Príprava doštičiek pre kultúry zmesi

Doštičky pre kultúry zmesi sa môžu pripraviť použitím akejkoľvek formulácie médií. Formulácie médií iné, než tie, ktoré sú opísané nižšie, môžu byť vhodné.

Nalejú sa doštičky obsahujúce 1/10 MS médium (Tabuľka 6) s výhodou obohatené 200 μ M acetosyringónom a 1 μ M galakturónovou kyselinou. Acetosyringón a galakturónová kyselina sa pridávajú k MS médiu po autoklávaní. Sterilný filtračný papier sa dá navrch tuhého média a zvlhčí sa TXD médiom pred použitím s explantátmi.

Tabuľka 6

MS médium	
Zložka	Koncentrácia
MS soli (Sigma)	4,4 g/l
Sacharóza	30 g/l
SB vitamín #1	2 ml/l
SB vitamín #2	1 ml/l
pH = 5,95	

Explantovanie listovej báze

Explantovanie možno uskutočniť akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je účinný. Iné formulácie médií skôr opísané môžu byť vhodné na explantovanie miesto formulácií médií opísaných nižšie.

Listy z mikropropagovaných výhonkov sa vyrežú a prenesú sa na Petriho misku obsahujúcu sterilný filtračný papier zvlhčený TXD médiom. Listy z ktorejkoľvek časti mikropropagovaného výhonku sa môžu použiť v tomto vynáleze. Teda ktorýkoľvek vnútorný alebo vonkajší list sa môže použiť na následnú transformáciu. Výhodne sa používajú vonkajšie listy. List sa skladá z listovej čepele a listovej báze a môže sa odrezať akýmkoľvek spôsobom. S výhodou sa listy odstraňujú odrezaním pri základni listu (pozri Obr. 6), takže list je primárne nedotknutý a rezné miesto je pri základni listu. Po odrezaní asi 25 listov z mikropropagovaných výhonkov sa explantáty prenesú do zriedenej bakteriálnej kultúry a inkubujú sa. Inkubácia explantátov listov s Agrobacteriom môže trvať akúkoľvek dlhú dobu. Výhodne je doba inkubácie s Agrobacteriom až 60 minút, výhodnejšie asi 15 až 20 minút a inkubácia sa robí spôsobom, ktorý vystavuje rezné miesto kultúre Agrobacterium. Výhodne je spodné rezné miesto explantátu listu, v listovej báze v styku s kultúrou

Agrobacterium. Explantáty sa prenesú z bakteriálnej kultúry, dajú sa na sterilný filtračný papier, ako je sterilný Whatman filtračný papier, a prenesú sa na doštičky pre kultúry zmesí.

Doba kultivovania zmesí môže trvať akúkoľvek dlhú dobu. Výhodne je doba kultivovania zmesí až 5 dní. Výhodnejšie je doba kultivovania zmesí od 2 do 5 dní. Ešte výhodnejšie je doba kultivovania zmesí 4 dni. Doštičky s kultúrou zmesí sa dajú do zatavených plastických vreciek a inkubujú sa pri asi 22 °C až 24 °C asi 4 dni. Fotoperiódou počas inkubácie sa použije svetlo : tma asi 16:8.

Listy z mikropagovaných výhonkov sa prípadne môžu vyrezať, ako sa opisuje zhora a prenesú sa priamo na doštičky pre kultúry zmesí na predkultivačné obdobie cez noc pri asi 22 °C až 24 °C pred pridaním bakteriálnej kultúry. Hoci sa dáva prednosť predkultivácii cez noc, predkultivácia po aspoň 6 hodín je tiež účinná. Po období predkultivácie sa explantáty infikujú Agrobacteriom pridaním bakteriálnej suspenzie priamo k explantátom na doštičkách pre kultúry zmesí. Po inkubácii asi 20 minút sa baktérie môžu odstrániť akýmkoľvek spôsobom, vrátane odsatia a explantáty môžu zostať na rovnakých doštičkách po trvanie obdobia kultivácie zmesí.

Kultúra a podmienky selekcie

Explantáty sa môžu kultivovať akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je účinný. Iné formulácie médií skôr opísané môžu byť vhodné na kultiváciu a selekciu miesto formulácií médií opísaných nižšie.

Explantáty sa prenesú z doštičiek pre kultiváciu zmesí do kultivačného média. Výhodne je kultivačné médium založené na MS médiu doplnenom 0,5 mg/l benzylaminopurínu (BAP) alebo benzyladenínu (BA), 0,05 mg/l 1-naftalénocetovej kyseliny, 500 mg/l karbenicilínu a 100 mg/l cefotaxímu. Podmienky kultivácie zmesí sa môžu meniť v závislosti na voliteľnom markery. Na selekciu glyfosátu (N-fosfonometylglycín) sa infikované rastliny dajú na oneskorovacie médium bez prídania selektívneho prípravku glyfosátu. Dĺžka oneskorovacej periódy bude závislá na použitom genotypu. Urobia sa pokusy s každým genotypom, aby sa stanovilo optimálne trvanie oneskorovacej periódy. Oneskorovacia perióda sa môže vyskytovať typicky až po 10 dní. Výhodne je oneskorovacia perióda bez selekcie asi 2 až 7 dní. Ešte výhodnejšie je oneskorovacia perióda bez selekcie asi 6 dní pri asi 24 °C, s výhodou v plastických vreckách s dierami. Urobia sa pokusy s každým genotypom, aby sa stanovila optimálna hladina selekčného prípravku. Na selekciu glyfosátu sa infikované rastliny po oneskorovacej perióde prenesú z oneskorovacieho média (bez glyfosátu) do média založenom na MS médiu doplnenom 0,50 mg/l benzyladenínu, 0,05 mg/l

1-naftalénocetovej kyseliny, 500 mg/l karbenicilínu, 100 mg/l cetofaxímu a 0,05 – 0,10 mmol glyfosátu (výhodne asi 0,075 mmol glyfosátu). Explantáty sa môžu kultivovať asi 3 týždne pri asi 24 °C, s výhodou v plastických vreckách bez dier. Použije sa fotoperiódou pre kultiváciu asi 16:8 svetlo : tma. Explantáty sa prenesú do rovnakého média obsahujúceho vhodný selekčný prípravok každé 3 týždne. Všeobecne stačia 2 až 3 prenosy, aby sa identifikovala transgénová rastlina.

Mikropropagačné a zakoreňovacie postupy

Mikropropagáciu a zakoreňovanie možno uskutočňovať akoukoľvek prijateľnou metódou. Zistilo sa, že nasledujúci spôsob je účinný. Iné formulácie médií skôr opísané môžu byť vhodné pre mikropropagáciu a zakoreňovanie miesto formulácií médií opísaných nižšie.

Mikropropagácia je prospešná pri znížení alebo odstránení nežiaducich chimérnych tkanív. Použitie mikropropagácie je zvlášť prospešné na získanie transgénových rastlín a šetrí čas tým, že eliminuje potrebu získavať rastlinný materiál vychádzajúci zo semien.

Tkanivá možno udržiavať v rade nádob pre tkanivové kultúry, vrátane, nie však iba, Petriho misiek alebo pohárov sundae.

Transformované výhonky sa prenesú na mikropropagačné médium obsahujúce médium založené na MS médiu doplnenom 0,5 mg/l benzyladenínu, 500 mg/l karbenicilínu a 100 mg/l cetofaxímu. Výhonky rastú a delia sa v tomto médiu, pokiaľ sa nezíska žiadny počet výhonkov. Pre selekciu glyfosátu možno s výhodou pridať do mikropropagačného média glyfosát, aby sa napomohlo selekcii klonovaného materiálu. Klonovaným materiálom, ako sa tu používa, sa myslí, že celý výhonok sa transformuje a neobsahuje žiadny chimérny rastlinný materiál, ktorý sa skladá tak z transformovaného, ako aj netransformovaného tkaniva. Jednotlivé výhonky sa zakorenia na ½ MS médiu doplnenom 5 mg/l indolmaslovej kyseliny, 100 mg/l cetofaxímu a 500 mg/l karbenicilínu. Korene by sa mali objaviť asi za 4-12 týždňov. Zakorenené výhonky sa môžu presadiť do zeminy, výhodne Metro-Mix 350 (Metro-Mix je zapísaná ochranná známka Scotts Company, Marysville, OH).

Prehľad obrázkov na výkresoch

Nasledujúce obrázky tvoria časť tohto opisu a sú zahrnuté, aby ďalej demonštrovali isté aspekty tohto vynálezu. Vynález možno lepšie pochopiť s odkazom na jeden alebo viac výkresov v kombinácii s podrobným opisom tu uvedených špecifických vyhotovení.

Obrázok	Opis
1	Mapa plazmidu pMON17303
2	Mapa plazmidu pMON13819
3	Mapa plazmidu pMON13835
4	Mapa plazmidu pMON13851
5	Pohľad zhora na mikropropagovanú kultúru cukrovej repy
6	Pohľad z boku na mikropropagovanú kultúru cukrovej repy

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady sú zahrnuté, aby demonštrovali výhodné uskutočnenia vynálezu. Odborníci by mali oceniť, že techniky opísané v príkladoch, ktoré nasledujú, predstavujú techniky objavené vynálezcom, ktoré majú dobre fungovať pri uskutočňovaní vynálezu, a teda sa môžu považovať za výhodné spôsoby pre jeho prax. Avšak odborníci by mali vo svetle tohto opisu oceniť, že možno uskutočniť rad zmien v špecifických uskutočneniach, ktoré opisujeme, a ešte získať rovnaký alebo podobný výsledok napriek tomu, aby došlo k odchýleniu od ducha a rozsahu vynálezu.

Príklad 1

Konštrukty plazmidu

Všetky konštrukty opísané v príkladoch sú vektory transformácie rastlín s dvojitým okrajom obsahujúcim začiatok replikácie *E. coli* (ori322), široký rozsah hostiteľského začiatku replikácie *E. coli* (ori-V) a kódujúcu oblasť (Spc/Str) pre Tn7 adenyltransferázu, čo dodáva odolnosť voči spektinomycínu a streptomycínu. Pre transformáciu rastlín sa použil hostiteľský bakteriálny kmeň *Agrobacterium tumefaciens* kmeň ABI. Promótor, kódujúci oblasť a 3' terminátory, sú znázornené v zátvorkách.

P-e35S je promótor pre 35S RNA z CaMV obsahujúci duplikáciu oblasti -90 až -300, ako opisuje USA patent 5 424 200, P-FMV je promótor 35S z mozaikového vírusu Figwort, ako opisuje USA patent 5 378 619, P-aa-chit je promótor pre kyslú chitinázu z *Arabinopsis*, ako opisuje Samac a Shah (Plant Cell 3: 1063, 1991), AEPS/CTP2 je oblasť tranzitného peptidu z *Arabinopsis* EPS (syntéza 5-enopyruvyl-3-fosfosikimovej kyseliny), ako opisuje USA patent 5 633 435; CP4syn je kódujúca oblasť pre CP4-EPS (syntetická sekvencia), ako opisuje USA patent 5 633 435; fbp je kódujúca sekvencia pre *E. coli* 1,6-bifosfatázu fruktózy, ako opisuje Hamilton a kol. (Nucleic Acids Res. 16: 8707, 1988), glgC16 je gén *E. coli* pre gén ADP fosforylázy glukózy, ako opisuje USA patent 5 648 249; mz SPS je

kódujúca oblasť pre fosfát syntézy sacharózy kukurice, ako opisuje USA patent 5 750 869; ED 3' je koniec génu hrachu E9 rbc, ktorý má funkciu polyadenylačného signálu; 7S je 3' terminačný signál 7S zásobného proteínu semena sóje; GUS:1 je kódujúca sekvencia pre gén beta-glukuronidázy z E. coli (Jefferson, R.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8447-8451, 1987) modifikovaný, aby obsahoval reštrikčné miesto NcoI (CCATGG) v začiatočnom kodóne.

Príklad 2

Transformácia s ABI pMON17303

Vonkajšie listy sa vyrezali priamo z mikropagovaných výhonkov cukrovej repy a použili sa ako explantáty na transformáciu. Listy sa odrezali pri listovej báze a inkubovali sa s Agrobacteriom tak, že listová báza bola v styku s kultúrou Agrobacterium. Agrobacterium tumefaciens kmeň ABI obsahoval konštrukt pMON17303 (P-e35S/mz SPS/E9 3', P-FMV/CP4syn/E9 3', Obr. 1) a metóda transformácie bola rovnaká, ako sa opisuje v časti Podstata vynálezu. Pri transformácii tohto konštruktu sa nepoužila žiadna predkultúra. Selekcia transformovaných buniek sa urobila s použitím 0,075 mM glyfosátu. Z 573 explantátov sa získali 3 transformované rastliny s transformačnou účinnosťou 0,5 %.

Príklad 3

Transformácia s konštruktom ABI pMON13819

Vonkajšie listy sa vyrezali priamo z mikropagovaných výhonkov cukrovej repy a použili sa ako explantáty na transformáciu. Listy sa odrezali pri listovej báze a inkubovali sa s Agrobacteriom tak, že listová báza bola v styku s kultúrou Agrobacterium. Agrobacterium tumefaciens kmeň ABI obsahoval konštrukt pMON13819 (P-e35S/fbp/E9 3', P-FMV/CP4syn/E9 3', Obr. 2). Transformácia a selekcia sa urobili rovnako, ako sa opisuje v príklade 2 a v časti Podstata vynálezu. Z 1875 explantátov sa získalo 52 transformovaných rastlín s transformačnou účinnosťou 3 %.

Príklad 4

Transformácia s konštruktom ABI pMON13835

Vonkajšie listy sa vyrezali priamo z mikropagovaných výhonkov cukrovej repy a použili sa ako explantáty na transformáciu. Listy sa odrezali pri listovej báze a inkubovali sa s Agrobacteriom tak, že listová báza bola v styku s kultúrou Agrobacterium. Agrobacterium tumefaciens kmeň ABI obsahoval konštrukt pMON13835 (P-e35S/mzSPS/E9 3', P-

FMV/CP4syn/E9 3', Obr. 3). Transformácia a selekcia sa urobili rovnako, ako sa opisuje v príklade 2 a v časti Podstata vynálezu. Z 2580 explantátov sa získalo 12 transformovaných rastlín s transformačnou účinnosťou 0,5 %.

Príklad 5

Transformácia s konštruktom ABI pMON13851

Vonkajšie listy sa vyrezali priamo z mikropropagovaných výhonkov cukrovej repy a použili sa ako explantáty na transformáciu. Listy sa odrezali pri listovej báze a inkubovali sa a Agrobacteriom tak, že listová báza bola v styku s kultúrou Agrobacterium. Agrobacterium tumefaciens kmeň ABI obsahoval konštrukt pMON13851 (P-e35S/mzSPS/E9 3'/P-FMV/CP4syn/E9 3', Obr. 4). Transformácia a selekcia sa urobili rovnako, ako sa opisuje v príklade 2 a v časti Podstata vynálezu, navyše s krokom predkultivácie cez noc, pred stykom tkaniva rastlín s Agrobacteria. Z 2890 explantátov sa získalo 14 transformovaných rastlín s transformačnou účinnosťou 0,5 %.

Všetky kompozície a spôsoby tu opísané a nárokované možno urobiť a uskutočňovať bez zbytočného experimentovania vo svete tohto opisu. Hoci kompozícia a spôsoby tohto vynálezu sa opísali v zmysle výhodných uskutočnení, odborníkom bude zrejmé, že sa môžu uplatniť variácie ku kompozíciám a spôsobom a krokom, alebo poradie krokov spôsobov napriek tomu, aby sa odchyľilo od konceptu, ducha a rozsahu vynálezu. Konkrétnejšie bude zrejmé, že isté prípravky, ktoré sú tak chemicky, ako aj fyziologicky príbuzné, môžu nahradiť prípravky tu opísané, pričom sa získajú rovnaké alebo podobné výsledky. Všetky také podobné substitúcie a modifikácie zrejmé odborníkom, sa myslia, že patria do rozsahu ducha, rozsahu a konceptu vynálezu.

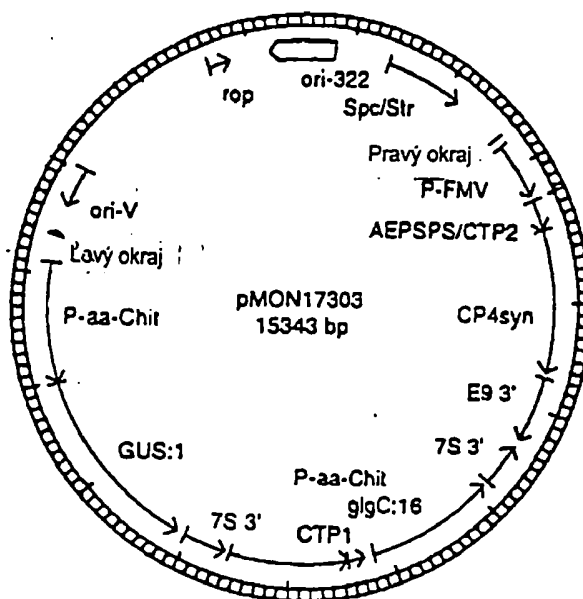
PATENTOVE NÁROKY

1. Spôsob prípravy transgénových buniek cukrovej repy, **vyznačujúci sa tým, že** sa vyberie sadenica cukrovej repy, ktorá obsahuje kotyledónovú oblasť a hypokotylóvu oblasť; kotyledónová oblasť a horná polovica hypokotylovej oblasti sa zo sadenice odstráni, kotyledónová oblasť a horná polovica hypokotylovej oblasti sa uvedú do styku s mikropropagačným médiom pri vzniku mikropropagovaného výhonku, ktorý obsahuje aspoň jeden list alebo jeho časť, vrátane listovej báze; list sa z mikropropagovaného výhonku odstráni pri listovej báze a explantát listu sa uvedie do styku s *Agrobacteria* pri oblasti listovej báze tak, aby vzniklo tkanivo, ktoré obsahuje transgénovú bunku cukrovej repy schopnú expresie exogénnej sekvencie nukleovej kyseliny, kde *Agrobacteria* obsahuje vektor a vektor obsahuje operatívne spojený v orientácii 5' ku 3' : promótor, ktorý riadi transkripciu exogénnej štruktúrnej sekvencie nukleovej kyseliny; exogénnu štruktúrnu sekvenciu nukleovej kyseliny a 3' transkripčný terminátor.
2. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** *Agrobacteria* je *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** list alebo jeho časť obsahuje vonkajší list.
4. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** list alebo jeho časť obsahuje vnútorný list.
5. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** štruktúrna sekvencia nukleovej kyseliny kóduje proteín alebo protizmyslovú RNA sekvenciu.
6. Spôsob podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým, že** list alebo jeho časť sa predkultivuje pred stykom s *Agrobacteria*.
7. Spôsob prípravy transgénových buniek cukrovej repy **vyznačujúci sa tým, že** sa vyberie sadenica cukrovej repy, ktorá obsahuje kotyledónovú oblasť a hypokotylóvu oblasť; kotyledónová oblasť a horná polovica hypokotylovej oblasti sa zo sadenice odstráni; kotyledónová oblasť a horná polovica hypokotylovej oblasti sa uvedú do styku

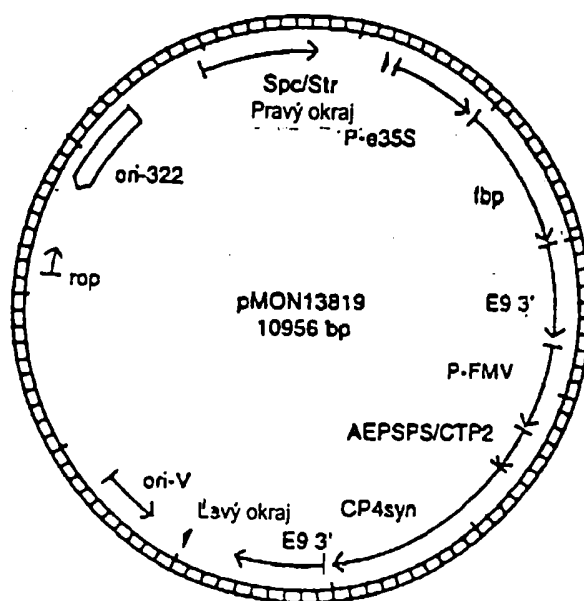
s mikropropagačným médiom pri vzniku mikropropagovaného výhonku, ktorý obsahuje aspoň jeden list alebo jeho časť, vrátane listovej báze; list sa z mikropropagovaného výhonku odstráni pri listovej báze; listová báza sa uvedie do styku s *Agrobacteria* tak, aby vzniklo tkanivo obsahujúce transgénovú bunku cukrovej repy; tkanivo sa kultivuje pri vzniku transgénového výhonku, ktorý sa kultivuje pri vzniku zakoreneného transgénového výhonku, ktorý sa nechá rásť pri vzniku transgénovej rastliny cukrovej repy schopnej expresie exogénnej sekvencie nukleovej kyseliny, kde *Agrobacteria* obsahuje vektor, ktorý obsahuje operatívne spojený v orientácii 5' ku 3': promótor, ktorý riadi transkripciu exogénnej štruktúrnej sekvencie nukleovej kyseliny; exogénnu štruktúrnú sekvenciu nukleovej kyseliny a 3' transkripčný terminátor.

8. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že list alebo jeho časť obsahuje vonkajší list alebo jeho časť.**
9. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že list alebo jeho časť obsahuje vnútorný list alebo jeho časť.**
10. Spôsob podľa nároku, **vyznačujúci sa tým, že semeno cukrovej repy kľíči v tme.**
11. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že mikropropagačné médium obsahuje MSMO médium a 0,1 mg/l 6-aminobenzylpurínu.**
12. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že selekčný prípravok obsahuje glyfosát.**
13. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že *Agrobacteria* je *Agrobacterium tumefaciens*.**
14. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že štruktúrna sekvencia nukleovej kyseliny kóduje proteín alebo protizmyselnú RNA sekvenciu.**
15. Spôsob podľa nároku 7, **vyznačujúci sa tým, že list alebo časť obsahujúca listovú bázu sa predkultivuje pred stykom s *Agrobacteria*.**

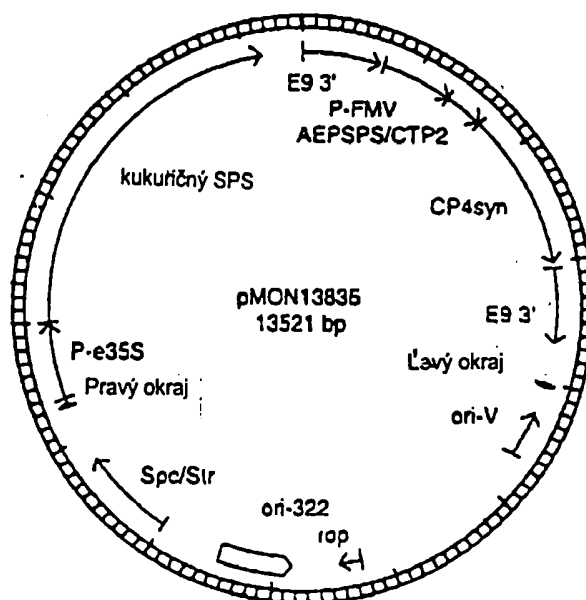
Obr. 1



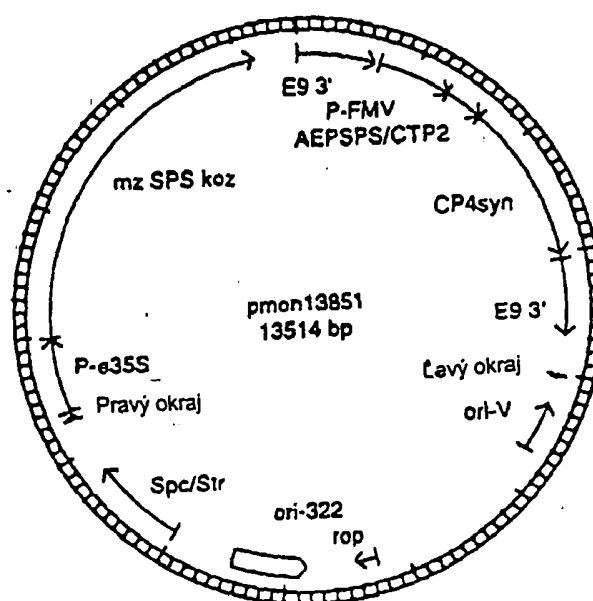
Obr. 2

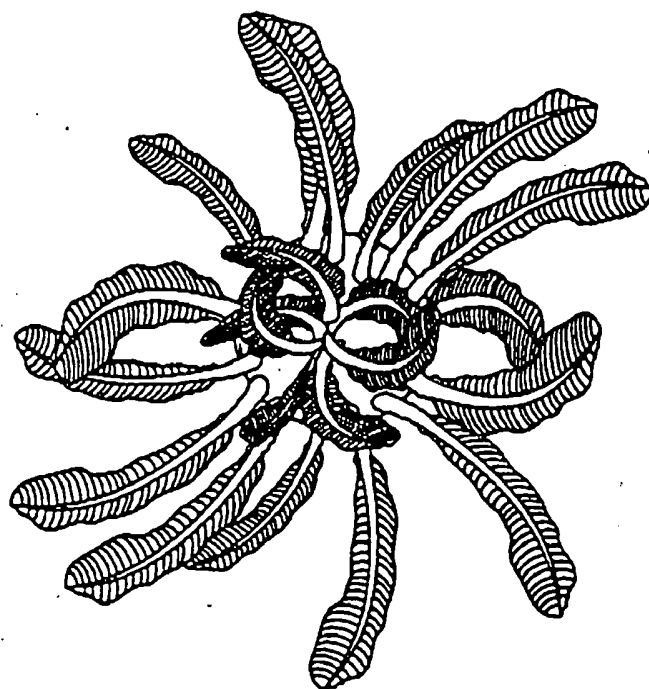


Obr. 3

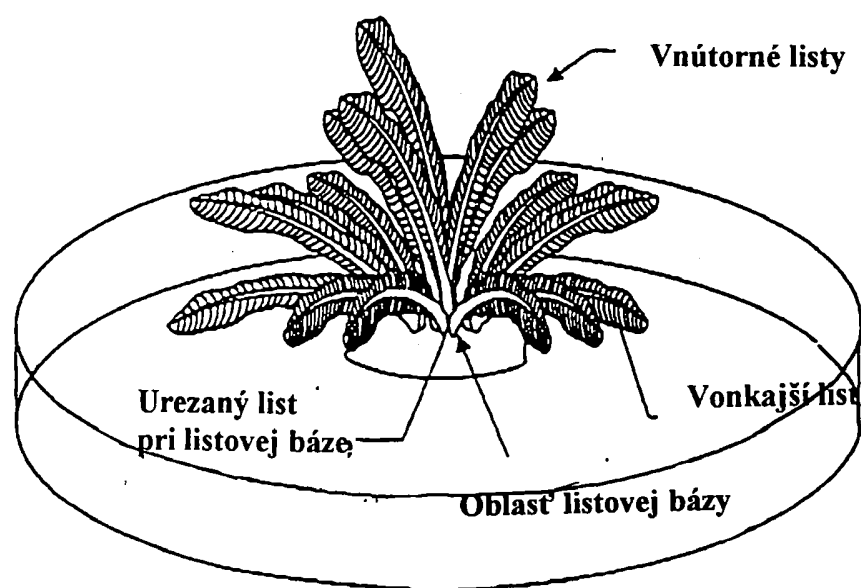


Obr. 4





Obr. 5



Obr. 6