

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 895626 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **895626**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/82

C12N 5/04

A01H 3/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.03.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **24.11.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **24.11.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **23.03.1989** **PCT/EP1989/000319**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

25.03.1988 DE 3810286

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Max-Planck-Gesellschaft Zur Förderung Der Wissenschaften E.V., Bunsenstrasse 10, 3400 Göttingen, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Spena, Angelo, Germany, SAKSA, (DE)

2 •Schmülling, Thomas, Germany, SAKSA, (DE)

3 •Salamini, Francesco, Germany, SAKSA, (DE)

4 •St. Schell, Joseph, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Transgeneettinen kasvi, jolla on modifioitu fysiologia, morfologia ja modifioitu hormonimetabolismi, kasvin kudosviljelmää ja menetelmä sen valmistamiseksi

Transgenetisk växt med modifierad fysiologi, morfologi och modifierad hormonmetabolism, vävnadskulturer av växten och förfarande för framställning av densamma

Transgeneettinen kasvi, jolla on modifioitu fysiologia, morfologia ja modifioitu hormonimetabolismi, kasvin kudosisviljelmiä ja menetelmä sen valmistamiseksi

5 Keksintö koskee transgeenisia kasveja tai transgeenisia kasvielimiä, joilla on muunneltu fysiologia, morfologia ja muunneltu hormonimetabolia, menetelmää näiden kasvien ja elimien valmistamiseksi ja kudosisviljelmiä, jotka sisältävät näiden kasvien soluja tai elimiä tai kasvielimien soluja. Keksintö koskee myös transgeenisten kasvien käyttöä jalostettaessa kasveja, joilla on muunneltu biokemiallinen, fysiologinen, kehitysfysiologinen ja morfologinen ominaisuus ja transgeenisen kasvin tai elimen tai niiden kudosisviljelyjen käyttöä sekundaaristen kasvituotteiden valmistamiseksi.

Monissa bakteeri-indusoiduissa fytopatogeneesitapauksissa hormonibiosynteesi näyttää tärkeätä osaa kasvin ja bakteerin välisessä vuorovaikutuksessa. Esimerkki on *Agrobacterium tumefaciens*, joka on äkämäbakterioositaudin etiologinen tekijä. Tämän kasvitaudin aiheuttaa infektoitujen kasvisolujen muuntunut hormonibiosynteesi. Kasvisolut transformoituvat infektioprosessin aikana. Tämän saa aikaan DNA-fragmentin, "T-DNA:n", insertoituminen kasvisolun genomiin ja sitä seuraava T-DNA:n sisältämän geneettisen informaation ekspressio. Tällä tavalla kasvisolun hormonimetaboliaa muunnellaan ja säätelämätön kasvaimen kasvu indusoidaan.

Myös hr-taudin ("karvajuuritauti") patogeenisissä ensimmäinen tapahtuma on yksittäisten kasvisolujen transformatio. Hr-taudin aiheuttaa *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin Ri-plasmidien DNA-fragmentit, jotka integroituvat vaikutukselle alttiin kasvisolun genomiin. *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerin aiheuttamat bakteeriäkämät ovat kimeerisiä kudoksia, koska T-DNA:n geenituotteiden tuottama auksiinien (IAA) ja sytokiniinien (IPT) biosynteesi

edistää sekä transformoituneiden että transformoitumattomien naapurisolujen kasvua. Päinvastaisesti *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin infektiokohdassa indusoimat juurikarvat sisältävät ainoastaan transformoituneita soluja. Sen mukaisesti rol-geenituotteiden, jotka geenit sisältyvät Ri-plasmidin DNA:han ja ovat integroituneet kasvigenomiin, on ajateltu toimivan pääasiassa, jollei yksinomaan, transformoituneissa soluissa. Näin ollen oletettiin, että nämä geenit eivät suoraan ota osaa siirtyvien kasvutekijöiden synteesiin.

Tunnetaan neljä rol-geeniä, nimittäin rolA-, rolB-, rolC- ja rolD-geeni. RolA- rolB- ja rolC-lokukset tai geenit vastaavat avoimia lukuraameja 10, 11 ja 12 Ri-plasmidin T_L-DNA:ssa. Yksityiskohtaisemmat kuvaukset lokuksista ovat antaneet Spena et al., EMBO J., 6 (1987), sivu 3891. *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin T_L-DNA:n sekvenssin ovat julkaisseet Slightom et al., J. Biol. Chem., 261 (1986), sivu 108. Binaarisen vektorin pPCV002 ovat kuvanneet Koncz ja Schell, Mol. Gen. Genet., 204 (1986), sivu 383.

Hr-syndrooma löydetään kasveilta, jotka on regeneroitu Ri-transformoiduista juurista. Tämän syndrooman tunnusomaisia ominaisuuksia ovat jälkikasvuinen juurten muodostus, juuriviljelmien korkea kasvunopeus hormonivapaassa alustassa, alentunut apikaalidominanssi sekä varsissa että juurissa, muuntunut lehtien ja kukkien morfologia, plagiotrooppinen juurikasvu (nimittäin muuttunut geotropismi) ja alentunut hedelmällisyys. Täysin kehittyneen hr-syndrooman muodostuminen korreloituu rolA-, rolB- ja rolC-lokusten tai geenien ekspressioon, joiden geenituotteilla on synergistinen aktiivisuus juurimuodostuksen indusoimisessa; Spena et al., yllä mainitussa paikassa.

Spena et al. kuitenkin lähinnä vain kuvaavat vaikutusta, joka kaikilla kolmella lokuksella, yksittäisillä lokuksilla tai lokusten eri yhdistelmillä, on juurimuodos-

tuksen induktioon infektoituneiden Kalanchoe- tai tupak-
 kakasvien infektiokohdassa. Spena et al. eivät kuitenkaan
 ole kuvanneet rolA-, rolB- tai rolC-lokusten tai näiden
 lokusten spesifisten yhdistelmien spesifisiä biologisia
 5 vaikutuksia kokonaisuin transgeenisiin kasveihin, joissa
 kukin solu, eikä vain infektiokohdassa läsnäoleva solu,
 sisältää nämä lokukset tai niiden yhdistelmät. Promootto-
 rien muunteluiden vaikutuksia, kun käytetään yksittäisiä
 rol-geenejä tai useamman kuin yhden rol-geenin yhdistel-
 10 miä, ei ole tutkittu kokonaisissa transgeenisissä kasveis-
 sa.

Oono et al., Jpn. J. Genet., 62 (1987), 501, esit-
 tävät transgeeniset tupakkakasvit, jotka sisältävät rolC-
 geenin sen luonnollisen promoottorin säätelyn alaisena ja
 15 siksi omaa alentuneen pituuskasvun verrattuna villityypin
 kasveihin.

Koristekasvien alueella on suuri tarve kasveista,
 jotka omaavat selvän kääpiökasvun, kasveista, joiden ku-
 kinta-aikaa voidaan säädellä ja kasveista, jotka kestävät
 20 kauan jopa pidettäessä kukkamaljakoissa, joka tarkoittaa,
 että kestää kauemmin ennen kuin vanhenemisoireita näkyy.
 Lisäksi on olemassa tarve kasveista, joilla on parantunut
 juurisysteemi, jotka kasvavat hyvin jopa vaikeissa kasvu-
 alueen olosuhteissa. Sellaiset fysiologiset ja morfologi-
 25 set ominaisuudet on tähän mennessä saatu aikaan vain kä-
 sittelemällä kasveja kemikaaleilla.

Kasveista, jotka omaavat merkittävän kääpiökasvui-
 suuden, ollaan erikoisen kiinnostuneita kasvihuonevilje-
 lyssä. Siitä asti menetelmä sellaisten kasvimorfologioit-
 30 ten aikaansaamiseksi on sisältänyt, paitsi kemiallisesti
 aktiivisten aineiden käytön, oleellisesti kasvin kasvun
 fysikaalisen heikentämisen.

Kasvit, jotka ovat sopivia mainittuja ominaisuuksia
 omaaviksi jalostettaviksi kasveiksi, on tähän asti ollut
 35 vain rajoitettavasti saatavissa.

Valittaessa vastaviljeltyjä kasveja voi syntyä spesifinen ongelma kahden ristisiitokseen osaaottavan kasvin hedelmällisyydestä.

5 Lisäksi kasvikudosviljelmiä käytetään sekundaaristen kasvituotteiden valmistukseen. Kuitenkin tällä tavoin saadut saannot eivät ole tyydyttäviä.

Niin muodoin esillä olevan keksinnön perustana oleva ongelma on esittää kasvit ja kasvielimet, joilla on muunnellut fysiologiset ja morfologiset ominaisuudet ja antaa niitä uusien kasvien jalostukseen ja edullisten kudosviljelmien valmistukseen. Lisäksi keksinnön perustana oleva tekninen ongelma on esittää menetelmät sellaisten kasvien ja elimien valmistamiseksi.

15 Yllä mainitut ongelmat on ratkaistu suoritustavoilla, jotka on kuvattu patenttivaatimuksissa.

Niin muodoin keksintö koskee transgeenisia kasveja ja kasvielimiä, joilla on muunneltu fysiologia, morfologia ja muunneltu hormonimetabolia, joilla kasveilla on genomissaan

20 a) *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin Ri-plasmidin T_L-DNA:n rolA-geeniä, rolB-geeniä, rolC-geeniä koodittava alue, rolA-geeniä ja rolC-geeniä koodittava alue, rolB- ja rolC-geeniä koodittava alue tai rolA- ja rolB-geeniä koodittava alue ja/tai *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerin
25 Ti-plasmidin T-DNA:n IPT (isopentenyyliadenosiinitransferaasi)-geeniä koodittava alue, mainitun koodittavan alueen (mainittujen koodittavien alueiden) ollessa sen/niiden luonnollisen tai heterologisen promoottorin (luonnollisten tai heterologisten promoottorien) säätelyn alaisena lu-
30 kuunottamatta rolC-geeniä koodittavaa aluetta, joka, jos sitä ei ole sisällytetty yhdessä muun genomissa olevan koodittavan alueen kanssa, on heterologisen promoottorin säätelyn alaisuudessa; ja

35 b) valinnaisesti myös selektoitava merkkigeeni; jossa koodittavat alueet ja merkkigeeni ekspressoituvat.

Keksintö juontuu oleellisesti uusien vaikutusten löytämisestä rolA-, rolB- ja rolC-geeneille transgeenisissa kasveissa ja elimissä. Nämä vaikutukset sisältävät seuraavat:

5 a) rol-geenien erillinen ekspressio transgeenisissa kasveissa ja elimissä aiheuttaa spesifisiä ja erotettavia morfologisia muutoksia, jotka antavat olettaa, että näillä geeneillä on erilaiset biologiset tai biokemialliset vaikutuskohteet;

10 b) kimeeristen geenien, joissa rolB- tai rolC-geenin koodittavan alueen ekspressiota säätelee CaMV:n ("Kukkakaalin mosaiikkivirus") 35S-promoottori, ekspressio aiheuttaa uusia morfologisia muutoksia transgeenisissa kasveissa ja elimissä;

15 c) rol-geenin indusoimat juuret ovat aina transformatuneita; ja

20 d) paras juuren kasvu in vitro viljelmässä saadaan aikaan yhdistämällä rolC-geeni rolB-geenin kanssa tai rolA-geenin kanssa tai kohottamalla rolC-geenin ekspressiota.

Esillä olevan keksinnön tulokset osoittavat, että rol-geenituotteilla on joko erilliset biokemialliset vaikutuskohteet tai niillä on erilainen vaikutus samaan vaikutuskohteeseen, joka ottaa osaa kasvin tai elimen kehityksen säätelyyn. Tulokset osoittavat lisäksi, että näiden geenien ekspression säätely näyttelee tärkeää osaa morfologisten muutosten alkuperässä transgeenisissa kasveissa ja elimissä. Jokainen näistä kolmesta rol-geenistä kykenee itsessään saamaan aikaan juuren muodostuksen esimerkiksi 25 tupakkakasvissa. Suurempi määrä juuria ja kohonnut juuren kasvu saadaan kuitenkin aikaan useamman kuin yhden ainoan rol-geenin aktiivisuudella.

30 Keksinnön kasvit eivät osoita täydellistä hr-syndroomaa, jonka aiheuttaa yhdistetty rolA-, rolB- ja rolC-geenien koodittavien alueiden ekspressio. Niillä on vain 35

valikoituja, haluttuja ominaisuuksia ja muuntelemalla geenisäätelyä ne osoittavat uusia ja/tai parantuneita fenotyyppisiä ominaisuuksia.

Keksinnön transgeenisillä kasveilla on merkittävä
 5 kääpiökasvu, muuttunut kukinta-aika, hidastunut vanhentuminen, muunneltu juurisysteemi, esimerkiksi plagiotrooppinen juurikasvu (kasvavat juuri maanpinnan alapuolella). Ne osoittavat muutoksia hedelmällisyydessään, kukkiensa määrissä ja/tai kukkiensa koossa. Näiden transgeenisten
 10 kasvien ominaisuuksien saamiseksi käytetään yllä mainittuja rolA-, rolB- tai rolC-geenien koodittavien alueiden spesifisiä yhdistelmiä. Lisäksi keksinnön transgeeniset kasvit voidaan valmistaa yksinään tai yhdistelmänä käyttäen yhtä rol-geeneistä IPT-geenin koodittavan alueen
 15 kanssa.

Sellaisten kasvien elimillä, jotka voidaan saada joko niistä tai voivat olla erikseen tuotettuja, on mainittuja kasveja vastaavat ominaisuudet.

Keksinnön kasveilla, joilla on kohonnut ja/tai
 20 muuttunut juuren kasvu, on valintaetu monien luonnollisesti kasvavien kasvien suhteen vaikeissa kasvuolosuhteissa, joita löydetään luonnosta.

Suosittelavassa suoritustavassa heterologinen promoottori on *Drosophila melanogaster*-kärpäsen HSP ("Heat Shock Promoter")-70-promoottori. *Drosophila melanogaster*-
 25 kärpäsen HSP-70-promoottorin ovat kuvanneet Spena et al., EMBO J. 4 (1985), sivu 2739.

Keksinnön toisessa suositeltavassa suoritustavassa heterologinen promoottori on vahva konstitutiivinen
 30 promoottori.

Keksinnön toisessa erityisen suositeltavassa suoritustavassa vahva konstitutiivinen promoottori on CaMV35S-promoottori.

Keksinnön toisessa erityisen suositeltavassa suoritustavassa transgeeninen kasvi tai elin sisältää geno-
 35

missaan *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin Ri-plasmidin T₁-DNA:n rolC-geenin koodittavan alueen, joka on vahvan konstitutiivisen promoottorin säätelyn alaisuudessa, suositeltavasti CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa. Jos

5 CaMV35S-promoottoria käytetään rolC-geenin säätelyyn, vastaavat transgeeniset kasvit ovat dominantteja koiraspuolisesti steriilejä, naaraspuolisesti hedelmällisiä ja omaavat pidentyneen eliniän tai hidastuneen vanhentumisen. Sen avulla, että dominantti geeni tekee kasvit koiraspuolisesti

10 steriileiksi, hybridisiemeniä voidaan tuottaa taloudellisemmin. Vaikka naaraspuolinen hedelmällisyys olisi jonkin verran alentunut, kasvinjalostajan on mahdollista valmistaa sellainen määrä hybridisiemeniä, joka on riittävä määrittämään hybridipopulaation ominaisuudet. Varsinainen

15 etu dominanteilla koiraspuolisesti steriileillä kasveilla on se, että risteytykset eri variaatioiden välillä eivät enää vaadi vastaanottajan heikentämistä. Lisäksi, jos esillä olevan keksinnön transgeeniset kasvit sisältävät kasvimyrkkyresistenssigeenin, on mahdollista kasvattaa

20 puhdas koiraspuolisesti steriili emokasvipopulaatio johdettua siitä, että koiraspuolinen steriliteetti ja kasvimyrkkyresistenssi periytyvät yhdessä, koiraspuolisesti hedelmälliset jälkeläiset voidaan eliminoida koiraspuolisesti steriilien ja koiraspuolisesti hedelmällisten kasvien välisen risteytysten jälkeläistöstä käsittelemällä kasvimyrkyillä.

Esimerkki keksinnön mukaisesta dominantista koiraspuolisesti steriilistä transgeenisestä kasvista on tupakkakasvi, joka sisältää kimeerisen CaMV35S-rolC-geenin.

30 Tämä keksinnön kasvi omaa merkittävän kääpiökasvun ja alentuneen apikaalisen dominanssin. Sillä on myös pidentynyt elinikä ja pidentynyt kukinta- ja nuppuaika tai hidastunut vanhentuminen. Sen kukat ovat pienempiä kuin villityypin kasvilla. Edullista on, että nämä ominaisuudet

35 siirtyvät seuraavalle kasvisukupolvelle. Keksinnön trans-

geenisen tupakkakasvin CaMV-C1-I, jolla on edellä mainitut ominaisuudet, pölyttäminen villityypin kasvin (SR1) kanssa johti 23 kasvin syntymiseen, joilla oli transgeeninen fenotyyppi ja 62 kasvin syntymiseen, joilla oli villityypin fenotyyppi. Toisessa kokeessa transgeenisen fenotyypin omaavien kasvien prosentti oli 50 %.

Koiraspuolisen steriliteetin tai alentuneen naaraspuolisen hedelmällisyyden eliminoimiseksi edellä mainittujen kasvien jälkeläistöstä, jotka sisältävät ja ekspressoivat keksinnön CaMV-C-geeniä, nämä transgeeniset CaMV-C-kasvit voidaan risteyttää koiraspuolisesti hedelmällisten kasvien kanssa, jotka ovat homotsygootteja jonkin seuraavan geenin suhteen:

a) geenin, joka CaMV35S-promoottorin tai muiden promoottorien ekspressiosäätelyn alaisuudessa ekspressoii rolC-transkriptin 'antisense'-RNA-juostetta. RNA/RNA-hybridien muodostumisen johdosta transgeenisten CaMV-C-kasvien ominaista fenotyyppiä ei löydetä jälkeläistöstä (F1-hybridit); katso A. van der Krol, J.N.M. Mol. ja A.R. Stuitje, Gene 72 (1988), 45 - 50;

b) geenin, joka CaMV35S-promoottorin tai muiden promoottorien ekspressiosäätelyn alaisuudessa ekspressoii ribotsyymiä, joka katalyyttisesti katkaisee ja niin muodoin inaktivoi rolC-geenin lähetti-RNA:n jälkeläisillä; katso J. Haseloff ja W.L. Gerlach, Nature 334 (1988), 585-591.

Toisessa esillä olevan keksinnön suositeltavassa suoritustavassa transgeeninen kasvi sisältää IPT-geenin koodittavan alueen *Drosophila melanogaster*-kärpäsän HSP-70-promoottorin alaisuudessa.

Koodittavien alueiden, jotka ovat *Drosophila melanogaster*-kärpäsän HSP-70-geenin 457 emäsparin pituisen DNA-fragmentin, joka sisältää promoottorin ja 199 emäsparia transloimatonta 'leader' -sekvenssiä, säätelyn alaisena, ekspressiota voidaan säädellä lämmöllä tupakkakasveis-

sa; katso Spena et al., EMBO J. 4 (1985), sivu 2739 ja Spena ja Schell, Mol. Gen. Genet. 206 (1987), sivu 436. Tämä promoottori omaa hyvin matalan transkription perustason normaalissa kasvulämpötilassa, jota tasoa voidaan
 5 kuitenkin dramaattisesti kohottaa aktivoimalla lämpöshokilla.

Sytokiniinit ovat kasvihormoneja, jotka säätelevät erilaisia biologisia ilmiöitä, kuten vanhenemista, kukkien morfologiaa, apikaalista dominanssia ja jälkikasvuisten
 10 juurten muodostusta. *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerin Ti-plasmidin T-DNA:n IPT-geeni koodittaa isopentenyyli-transferaasia. Tämä entsyymi katalysoi transgeenisten kasvien kudoksissa isopentenyyliadenosiinin, sytokiniinin, synteesisissä nopeusrajoitettua vaihetta. Transgeeniset kas-
 15 vit, jotka sisältävät genomissaan IPT-geenin sen oman promoottorin tai muiden promoottorien säätelyn alaisuudessa, eivät muodosta juuria johtuen kohonneen sytokiniinitason inhiboivasta vaikutuksesta.

Tämän ongelman välttämiseksi oktopiini Ti-plasmidin
 20 pTi15955 T-DNA:n IPT-geenin koodittava alue sijoitettiin *Drosophila melanogaster*-kärpäsen HSP-70-promoottorin säätelyn alaiseksi. Oktopiini Ti-plasmidin pTi15955 ovat kuvanneet Barker et al., Plant Mol. Biol. 2 (1983), sivu 325. Käytetty kimeerinen HSIPT-geeni koostuu (1)
 25 *Drosophila*-kärpäsen HSP-70-geenin promoottorialueesta (Spena et al., EMBO J. 4 (1985), sivu 2739), (2) transloimattomasta signaalialueesta, joka on muodostettu liittämällä *Drosophila*-kärpäsen HSP-70-geenin 199 emäsparin pituinen transloimaton signaalialue yhteen 16 emäsparin
 30 kanssa, jotka sijaitsevat juuri ylävirtaan IPT-geenin koodittavan alueen ATG-aloituskodonista, (3) IPT-geenin koodittavan alueen 702 emäsparin pituisesta alueesta ja (4) 373 emäsparin pituisesta IPT-geenin 3'-pään viereisestä alueesta, joka ulottuu *RsaI*-entsyymin katkaisukohtaan.

35 Transgeeniset tupakkakasvit, jotka sisältävät mainitun kimeerisen geenin, muodostavat juuria ja omaavat

muunnellun kukkamorfologian. Kukat ovat isompia ja niillä on suuremmat emin luotit kuin villityypin kasveilla (SR1). Kimeerinen HSIPT-geeni voidaan näissä transgeenisissä kasveissa indusoida lämpöshokkijärjestelmällä.

- 5 Toisessa suositeltavassa suoritustavassa transgeeniset kasvit tai elimet sisältävät genomissaan rolB-geenin ja rolC-geenin koodittavan alueen juurispesifisen promoottorin säätelyn alaisuudessa ja niin muodoin omaavat kohonneen juuren muodostuksen ja muunnellun tai edullisen juuren kasvun muiden rolBC-kasveille tai elimille tyypillisten ominaisuuksien puuttuessa.
- 10

- Transgeeniset kasvit tai elimet, joilla on muunneltu fysiologia, morfologia ja muunneltu hormonimetabolia, jotka sisältävät genomissaan rolA-, rolB- ja rolC-geenin koodittavan alueen, ovat myös keksinnön mukaisesti suositeltavia. Kuitenkin ainakin yksi koodittavista alueista on heterologisen promoottorin säätelyn alaisuudessa ja muut koodittavat alueet ovat valinnaisesti niiden omien luonnollisten promoottorien säätelyn alaisuudessa. Suositeltavasti heterologinen promoottori on vahva konstitutiivinen promoottori. CaMV35S-promoottori on erityisen suositeltava.
- 15
- 20

- Keksinnön transgeeniset kasvit tai elimet ovat suositeltavasti peräisin heimoista Solanaceae, Apocynaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae, Boraginaceae, Compositae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caprifoliaceae, Leguminosae, Araceae, Moraceae, suvusta Asplenium, heimosta Euphorbiaceae, kaalityypeistä, auringonkukista, porkkanoista, paprikasta (*Capsicum annuum*), purjolaukasta, retiisityypeistä, lehtisalaattityypeistä, lehtiselleristä (*Apium graveolens*), sipuleista, saksankuminasta (*Foeniculum vulgare*), vehnästä, rukiista, ohrasta, viljasta (maissi), sokerijuurikkaasta, soiapavusta, kauroista, riisityypeistä, daalioista, koristetupakasta, pelargonioista, petunioista, esikoista, orvokeista, astereista, amarantustyy-
- 25
- 30
- 35

peistä, vuokoista, leijonankidoista (*Antirrhinum*), akilei-
joista, koristeasparaguksista, begonioista, tohvelikukas-
ta, rapsista, krysanteemista, syklaamista, kukonkannukses-
ta, puutarhaneilikoista, gerberasta, häpykannuksesta, lu-
5 piinista, neilikasta, heimosta *Portulacaceae*, leinikistä
(*Ranunculus*), salviasta, gloksiiniasta, tageteksesta, ukon
tulikukasta, zinniasta, heimosta *Rosaceae*, saponoriasta
tai *Panax ginseng*-kasvista.

10 Perunoista tai tupakkakasvista peräisin olevat kas-
vit ovat erityisen suositeltavia.

Keskeinen kohta tässä on se, että sekä kaksi- että
yksisirkkaiset ovat sopivia aloitusmateriaaliksi keksinnön
kasvien valmistuksessa.

15 Lisäksi kudosisviljelmät, jotka sisältävät yllä ku-
vattujen transgeenisten kasvien soluja tai elimiä tai yllä
kuvattujen transgeenisten kasvielimien soluja, on myös
esitetty keksinnön mukaisesti.

20 Transgeenisten kasvien *in vitro* juuriviljelmät,
jotka sisältävät *rolC*-geenin koodittavan alueen *CaMV35S*-
promoottorin säätelyn alaisuudessa, kasvavat ainakin 10
kertaa nopeammin kuin villityypin kasvien *in vitro* juuri-
viljelmät. Lisäkohotus kasvunopeuteen voidaan saada aikaan
yhdistämällä *CaMV35S*-promoottorin säätelyn alaisuudessa
oleva *rolC*-geeni *rolB*- tai *rolA*-geenin kanssa, vaihtoeh-
25 toisesti heterologisen promoottorin säätelyn alaisuudessa.

Keksinnön mukaisia transgeenisia kasveja voidaan
käyttää jalostettaessa kasveja, joilla on muunnellut bio-
kemialliset, fysiologiset ja kehitysfysiologiset ja/tai
morfologiset ominaisuudet.

30 Lisäksi näistä kasveista ja elimistä peräisin ole-
via transgeenisia kasveja, elimiä tai kudosisviljelmiä voi-
daan käyttää valmistettaessa sekundaarisia kasvituotteita,
suositeltavasti alkalioideja, monoterpeenejä, seskviter-
peenejä, diterpeenejä, triterpeenisteroideja, tetrater-
35 peenejä, polyketidejä, polyakryleenejä, flavonoideja, fe-

nyyilipropanoideja, amiineja, alkaloidoja, proteiinissa esiintymättömiä aminohappoja, syanoglykosideja tai glukosinolaatteja.

5 Keksinnön mukaiset transgeeniset kasvit tai elimet voidaan valmistaa seuraavan menetelmän mukaisesti.

 Ensiksi kasvin protoplasteja tai kudoksia kasvatetaan yhdessä *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerien tai *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerien kanssa, jotka bakteerit sisältävät rekombinanttiplasmidin, joka on peräisin 10 Ti- tai Ri-plasmidista ja joka sisältää insertteinä *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerin Ri-plasmidin T₁-DNA:n koodittavat alueet ja/tai *Agrobacterium tumefaciens*-bakteerin Ti-plasmidin T-DNA:n IPT-geenin koodittavan alueen ja vaihtoehtoisesti selektoitavan merkkigeenin. Ainoa 15 välttämätön kohta esillä olevan keksinnön mukaisten transgeenisten kasvien valmistuksessa on spesifisten rekombinanttiplasmidien käyttö.

 Sitten transgeeniset solut selektoidaan ja transgeeniset kasvit tai elimet regeneroidaan transgeenisistä 20 soluista.

 Keksinnön menetelmän suositeltavassa suoritustavassa rekombinanttiplasmidit valitaan siten, että yllä mainitut koodittavien alueiden yhdistelmät voidaan insertoida transgeenisen kasvin genomiin.

25 Keksinnön mukaisesti ne suoritustavat yllä mainittujen keksinnön mukaisten kasvien ja elimien valmistusmenetelmäksi ovat suositeltavia, joissa rekombinanttiplasmidi sisältää koodittavat alueet ja promoottorit, joilla on esimerkiksi plasmidien pPCV002-ABC, pPCV002-AB, 30 pPCV002-B1100, pPCV002-B300, pPCV002-CaMVBT, pPCV002-C, pPCV002-CaMVBT+C, pPCV002-CaMV-C, pPCV002-A, pPCV002-AC, biologinen aktiivisuus. Suoritustavat, joissa rekombinanttiplasmidi sisältää koodittavat alueet ja promoottorit sellaisen biologisen aktiivisuuden kanssa, joka sisältyy 35 plasmideihin pPCV002-BC tai pPCV002-HSIPT, ovat erikoisen

suositeltavia. Eivät ainoastaan erikoisesti mainitut plasmidit vaan myös kaikki näiden plasmidien vastaavan biologisen toiminnan omaavat ovat sopivia keksinnön mukaisten transgeenisten kasvien ja elimien valmistamiseksi. Alan asiantuntija, joka tuntee keksinnön, voi esimerkiksi eristää rol-geenien koodittavat alueet eri Ri-plasmideista, joita esiintyy *Agrobacterium rhizogenes*-bakteerissa, ja käyttää niitä muodostamaan rekombinanttiplasmidit, joiden avulla koodittavat alueet voidaan integroida haluttujen kasvien genomiin transgeenisten kasvien ja elimien valmistamiseksi. Plasmidisysteemit, jotka ovat sopivia näihin tarkoituksiin, on kuvattu esimerkiksi EP-A1 116 718:ssa. Samalla tavalla on mahdollista keksinnön mukaisesti käyttää, ei vain promoottoreita, jotka ovat samanlaisia DNA-sekvenssiltään, kuten esimerkiksi ainoastaan spesifistä CaMV35S-promoottoria, vaan myös promoottoreita, jotka ovat biologiselta toiminnaltaan täysin vastaavia, kuten esimerkiksi 35S-promoottoreita, jotka voidaan eristää kukkakaa-
lin mosaiikkiviruksen eri kannoista.

20 Kuviot esittävät:

Kuvio 1: Kaavioesitys käytetyistä rekombinantti-plasmideista.

Kuvio 2: Villityypin (SR1) tupakkakasvin, oikealla, transgeenisen rolABC-kasvin, vasemmalla, ja transgeenisen rolAB-kasvin, keskellä, vertailu. Transgeeninen rolABC-kasvi osoittaa hr-syndrooman fenotyyppisiä ominaisuuksia, kun taas transgeeninen rolAB-kasvi eroaa sekä villityypin (SR1) kasvista että rolABC-kasvista.

Kuvio 3: Villityypin tupakkakasvin (SR1), vasemmalla, ja transgeenisen CaMV-C-kasvin vertailu. CaMV-C-kasvilla on alentunut apikaalidominanssi aiheuttaen kääpiökasvurakenteen. Sillä on korkeampi määrä sivujuuria ja vaalean vihreät keihäsmäiset lehdet. Kukinnoissa on pienemmät kukat, jotka ovat koiraspuolisesti steriilejä.

35 Kuvio 4: Transgeeniset CaMV-C-kasvit.

Kuvio 5: In vitro juuriviljelmät. Kuvio esittää villityypin (SR1) tupakkakasvin, oikealla, ja transgeenisen CaMV-C-kasvin juurikasvun vertailun kasvatettuna pimeässä hormonivapaassa nestemäisessä alustassa (MS) kolme viikkoa.

Kuvio 6: Transgeeninen rolA-kasvi. Kuvattu transgeeninen rolA-kasvi valmistettiin pPCV002-A-rekombinanttiplasmidin avulla. Sillä on kurttuaiset lehdet ja tiivistynyt kukinto. Tämä morfologia johtuu rolA-geenin koodittavan alueen ekspressiosta.

Kuvio 7: Transgeenisen rolC-kasvin, keskellä, villityypin (SR1) kasvin, vasemmalla, ja CaMV-C-kasvin, oikealla, vertailu. Transgeeninen rolC-kasvi valmistettiin pPCV002-C-rekombinanttiplasmidin avulla. Transgeenisella rolC-kasvilla oli hiukan alentunut apikaalidominanssi ja pienemmät kukat, joilla oli alentunut siitepölyn tuotto. Tämä fenotyyppi johtuu oman promoottorinsa säätelyn alaisuudessa olevan rolC-geenin koodittavan alueen ekspressiosta.

Kuvio 8: Transgeeninen rolAC-kasvi. Kuvattu transgeeninen rolAC-kasvi valmistettiin pPCV002-AC-rekombinanttiplasmidin avulla. Sillä on kurttuaiset lehdet, hiukan alentunut apikaalidominanssi ja pienemmät kukat. Tämä morfologia johtuu rolA-geenin ja rolC-geenin koodittavien alueiden yhdistetystä ekspressiosta.

Kuvio 9: Kukkamorfologia I. Kuvio esittää villityypin (SR1) kasvin ja transgeenisten kasvien kukkien vertailun. Transgeenisilla rolA- ja rolB-kasveilla on isommat kukat, kun taas transgeenisilla rolC-kasveilla on pienemmät kukat.

Kuvio 10: Kukkamorfologia II. Kuvio esittää villityypin (SR1) kasvien ja transgeenisten kasvien kukkien vertailun. Transgeenisten CaMV-C-kasvien kukat ovat hyvin pieniä ja koiraspuolisesti steriilejä. Transgeenisten CaMVBT-kasvien, joissa sama promoottori säätelee rolB-gee-

nin koodittavan alueen ekspressiota, kukilla on esiinpuolistuvat emin luotit ja pienentynyt hede.

Kuvio 11: Siemenkapselin koko. Kuvio esittää villi-
tyypin (SR1) kasvien ja transgeenisten kasvien siemenkap-
selien vertailun. Kun transgeenisten rolA- ja rolB-kasvien
siemenkapselin koko on muuttumaton, transgeenisten rolC-
kasvien siemenkapselit ovat huomattavasti pienempiä.
Transgeenisten CaMV-C-kasvien siemenkapselit ovat vielä
pienempiä. Kaikki kuvatut siemenkapselit saatiin ristipö-
lyttämällä naaraspuoliset vastaanottajat SR1-siitepölyllä.

Kuvio 12: Transgeeninen rolBC-kasvi. Kuvattu trans-
geeninen rolBC-kasvi saatiin pPCV002-BC-rekombinanttiplas-
midin avulla. Sillä on alentunut apikaalidominanssi ja
pienemmät kukat. Tämä morfologia johtuu rolC-geenin eksp-
ressiosta. RolB- ja rolC-geenien koodittavien alueiden
yhdistetyn ekspression johdosta tällä transgeenisella kas-
villa on suurentunut juurisysteemi.

Kuvio 13: Transgeenisten rolABC-kasvien polyA-RNA:n
ja transgeenisten CaMV-C-kasvien polyA-RNA:n Northern-
blot-analyysi. RolC-geenin koodittava alue ekspressoituu
transgeenisissa rolABC-kasveissa elinspesifisellä tavalla.
RolC-geenin koodittava alue ekspressoituu transgeenisissa
CaMV-C-kasveissa puolestaan konstitutiivisella tavalla.

Kaistat 1 - 4: Transgeenisen rolABC-kasvin juurien
(r), varsien (s) ja lehtien (l) polyA-RNA.

Kaistat 5 - 7: Transgeenisen CaMV-C-kasvin juurien
(r), varsien (s) ja lehtien (l) polyA-RNA.
Northern-blot hybridisoitiin Agrobacterium rhizogenes-bak-
teerin T_L-DNA:n radioaktiivisesti leimatun EcoRI-fragmentin
15 kanssa, joka fragmentti sisältää rolA-, B- ja C-geenit.

Kuvio 14: Eri transgeenisten kasvikudosten polyA-
RNA:n Northern blot-analyysi. Kuvattu Northern-blot esit-
tää eri rol-geenien ekspression. Seuraavien transgeenisten
kasvikudosten polyA-RNA:ta käytettiin:

Kaista 1: kloonit rolABC 1-27

- Kaista 2: klooni rolA-2
- Kaista 3: klooni rolA-4
- Kaista 4: klooni rolB1100-1
- Kaista 5: klooni rolB1100-2
- 5 Kaista 6: klooni rolCaMVBT-5
- Kaista 7: klooni rolCaMVBT-6
- Kaista 8: klooni rolCaMV-C-2
- Kaista 9: klooni rolCaMV-C-4
- Kaista 10: klooni rolAB-1
- 10 Kaista 11: klooni rolAB-5
- Kaista 12: klooni rolAC-1,5
- Kaista 13: klooni rolAC-2,4
- Kaista 14: klooni rolBC-10
- Kaista 15: klooni rolBC-14
- 15 Kaista 16: klooni rolCaMVBT+C1
- Kaista 17: klooni rolCaMVBT+C3

Kuvio 15: Kuvio esittää transgeenisen CaMVBT-kasvin lehtinekroosia, jonka aiheuttaa rolB-geenin korkeampi ekspressio lehdissä johtuen sen spesifisestä ekspressiosta CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa.

Täysin kehittynyt hr-syndrooma löydetään transgeenisistä kasveista, jotka ekspressoivat rolA-, rolB- ja rolC-geenejä; katso Spena et al., yllä mainitussa paikassa. Transgeenisten kasvien, jotka sisältävät genomissaan näiden kolmen rol-geenin koodittavien alueiden eri yhdistelmät, keksinnön mukainen analyysi paljasti havaittavat ja spesifiset kasvun epänormaaliudet, jotka korreloivat mainittujen koodittavien alueiden ekspression suhteen; katso kuviot 2, 6 - 9, 11, 12. Transgeeniset kasvit, jotka sisältävät genomissaan vain yhden ainoan rol-geenin koodittavan alueen, eivät osoita kaikkia hr-syndrooman fenotyyppisiä ominaisuuksia. Tästä johtuen hr-syndrooman aiheuttaa geenien yhdistynyt vaikutus, joilla kullakin geenillä on havaittava biologinen vaikutus transgeenisessä kasvissa.

Tiedettiin jo, että rolB- ja rolC-geenit Ri-transgeenisissa tupakkakasveissa ja Ri-transgeenisissa perunakasveissa, jotka kuitenkin kaikki sisältävät ainakin kolme geeniä, nimittäin rolA-, rolB- ja rolC-geenin genomissaan, ekspressoituvat elinspesifisellä tavalla. Lisäksi tunnetaan elinspesifinen ekspressio transgeenisilla tupakkakasveilla, jotka sisältävät kaikki kolme geeniä; katso Spena et al., yllä mainitussa paikassa. Näissä kokeissa osoitettiin Northern blot-analyysillä, että rolB- ja rolC-geenien ekspressionopeus on korkea varsissa, hiukan hitaampi juurissa ja paljon hitaampi lehdissä. Nämä tulokset on vahvistanut rolB- ja rolC-promoottorin säätelyn alaisuudessa olevan merkkigeenin ekspressionopeuden analyysi. Oli myös mahdollista määrittää tarkemmin ekspression elinspesifisyys ja soluspesifisyys.

Ekspressionopeuden muutokset saivat myös aikaan kehitysmuutoksia. Sivujuurien kohonnut määrä esimerkiksi korreloi rolC-geenin korkeamman ekspressionopeuden kanssa (kuvio 13). Ekspressionopeuden spesifisyys näyttelee tärkeätä osaa transgeenisten hr-kasvien morfologisten muutosten alkuperässä. Transgeeniset kasvit, jotka sisältävät kimeeriset geenit, joissa rolB- tai rolC-geenin koodittava alue on CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa, osoittavat uusia kasvun morfologisia epänormaaliuksia. Northern blot-analyysin ja histokemiallisten värjäysten avulla on osoitettu, että lehtinekroosi korreloi rolB-geenin kohonneen ekspression kanssa lehdissä (kuvio 15). Tämän geenin kohonnut ekspressio voidaan saada aikaan ekspressiomalla CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa.

Transgeenisten tupakkakasvien, jotka sisältävät genomissaan kimeeriset CaMVBT- ja CaMV-C-geenit, joissa kahta koodittavaa aluetta säätelee sama promoottori, havaittavat kasvutavat antavat olettaa, että näiden geenituotteiden biologinen vaikutus koko kasviin on erilainen. Tästä johtuen rolB- ja rolC-geenituotteilla on joko eri

biokemialliset vaikutuskohteet tai niillä on eri vaikutus samaan vaikutuskohteeseen. Rol-geenien ekspression aiheuttamat muutokset viittaavat muutoksiin hormonisäädelyissä prosesseissa. Tämän vuoksi on ehdotettu malleja, joissa

5 hr-syndrooma selitetään kohonneella auksiiniherkkyydellä, jonka on aiheuttanut rol-indusoitu hormonisignaalin vastaanotto-siirto-systeemin muutos. Toisaalta on oletettu, että rol-geenien toiminta johtaa muutoksiin sytokiniinibiosynteesissä tai sillä on sytokiniinin kaltainen vaikutus.

10 Vastaavissa kokeissa Ti-plasmidin, joka oli mutatoitu IPT-geenin alueelta, virulenssi saatiin takaisin inkorporoimalla Ri-plasmidin T_L -DNA-alue. RolA- ja rolB-geenien tuotteiden biologiset vaikutukset todellakin muistuttavat auksiinin aiheuttamia vaikutuksia ja rolC-geenin herättämät biologiset vaikutukset antavat olettaa sytokiniiniaktiivisuuden läsnäolon. Siitä huolimatta rol-geenien vaikutukset eivät ole helposti selitettävissä malleilla, jotka

15 vaativat kuljetettavien fytohormonien, kuten indolietikkahapon (IAA) ja isopentenyyliadenosiinin (IPT), synteesiä. Näiden geenien vaikutukset on rajoitettu transformoituneisiin soluihin, ainakin juuren muodostuksessa. RolB- ja/tai rolA-indusoidut auksiinin kaltaiset vaikutukset voidaan saada aikaan, ei vain indusoimalla auksiinisignaalin vastaanotto-siirto-systeemin muutos, vaan myös

20 inhiboimalla auksiiniantagonistien, kuten sytokiniinien, vaikutus tai syntetisoimalla ainetta, jolla on auksiinin kaltainen vaikutus, kuten fenyylietikkahappoa, jota ei kuljeteta kasvukudoksissa. Molemmissa tapauksissa tuloksena on kohonnut biologinen auksiinivaikutus ilman muutosta

25 IAA-konsentraatiossa. Toisaalta transgeenisistä CaMV-C-kasveista löydetty ominaisuudet ja hr-kasveissa ja transgeenisissä CaMVBT+C-kasveissa muodostuneet vaikutukset, jotka johtuvat rolC-geenin kohonneesta ekspressionopeudesta, ovat tyypillisiä kohonneelle sytokiniiniaktiivisuudelle.

30 Vastaavasti kohonnut sytokiniiniaktiivisuus voi myös

35

johtua indolietikkahapon inhibitiosta tai osittaisesta inaktivaatiosta tai solun itsenäisen aineen synteesistä, jolla aineella on sytokiniiniaktiivisuutta.

Transgeenisten tupakkakasvien juuriviljelmien kasvukäyttäytymisen tutkimus paljasti, että juuren kasvua voidaan suuresti parantaa in vitro juuriviljelmissä yhdistämällä erikoisesti rolB- ja rolC-geeni, ja jonkinverran vähemmän tehokkaasti yhdistämällä rolA- ja rolC-geeni. Tässä rolB-geeni ryhmästä, joka koostuu rolA-, rolB- ja rolC-geenistä, on tehokkain indusoimaan juuren kasvua. Kuitenkin haaroittuneiden juurten nopea kasvu saadaan paremmin aikaan rolC-geenillä. RolC-geenituotteella on melko rajoittunut kyky indusoida juuren muodostusta. Transgeeniset rolC- ja etenkin CaMV-C-juuret ovat erittäin haaroittuneita ja osoittavat nopean ja plagiotrooppisen kasvun, katso kuvio 5.

Tiedetään, että auksiinit indusoivat lisäjuurien muodostumista (ritsogeneesiä). Kuitenkin muilla fytohormoneilla, kuten sytokiniineillä, on myös vaikutusta ritsogeneesiin. Lisäksi on olemassa osoituksia, jotka antavat olettaa, että korkea auksiini/sytokiniinisuhde on optimaalinen juurten muodostuksen indusoimisessa, kun taas matala auksiini/sytokiniinisuhde on tarpeellinen juurten kasvun jatkumiselle. Sen tähden rolB- ja rolC-geenituotteiden yhdistetty vaikutus on edullinen tehokkaalle juurten muodostukselle ja tehokkaalle juurten kasvulle; rolB-geenituote (auksiinin kaltainen vaikutus) tehokkaasti indusoi juurten muodostumista ja rolC-geenituote (sytokiniinin kaltainen vaikutus) sallii nopean ja haaroittuneen juurikasvun toimien rolB-geenituotteen biologisen aktiivisuuden vastaisesti.

Seuraavissa esimerkeissä käytetyt rekombinanttiplasmidit, plasmidia pPCV002-BC lukuunottamatta, ovat kuvanneet Spena et al., yllä mainitussa paikassa.

Esillä olevan keksinnön transgeeniset kasvit ja elimet voidaan valmistaa esimerkiksi transformoimalla protoplastit rekombinanttiplasmidien avulla seuraavaksi valit-
 5 valituista transgeenisistä soluista.

Materiaalit ja menetelmät

Bakteerikannat ja viljelmät

Bakteerikannat ja viljelmät ovat kuvanneet Spena et al., yllä mainitussa paikassa. Kaikki rekombinanttiplasmidit siirrettiin ensin E. coli-bakteerikantaan SM10 ja
 10 sitten mobilisoitiin Agrobacterium tumefaciens-bakteerikantaan GV3101, Koncz ja Schell, Mol. Gen. Genet. 204 (1986), sivu 383.

Rekombinanttiplasmidien rakentaminen

Käytetyt rekombinanttiplasmidit rakennettiin valmiina olevien menetelmien mukaisesti; Maniatis et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Laboratory, 1982. Kuviossa 1 esitetyt plasmidit ovat
 15 jo kuvanneet Spena et al., yllä mainitussa paikassa, lu-
 20 kuunottamatta rekombinanttiplasmidia pPCV002-BC.

Kasvikudosisviljelmät ja transformaatio

Juurien indusointi Kalanchoe diagremontiana-kasvin lehtiin ja Nicotiana tabacum cv. Petit Havana SR1-kasvin (Nagy ja Maliga, Z. Pflanzenphys. 78 (1976), sivu 453)
 25 steriilien versoviljelmien lehtikiekoille suoritettiin, kuten ovat kuvanneet Spena et al., yllä kuvatussa paikassa.

Kun tutkittiin, olivatko rol-geenien indusoimat juuret transformoituneet kaikissa tapauksissa, lehtikiekoja inkuboitiin eri rakenteiden kanssa ja viljeltiin MS-alustalla ilman kanamysiiniä; Murashige ja Skoog, Physiol. Plant. 15 (1962), sivu 473. Neljän viikon kuluttua juuret leikattiin ja jaettiin kahteen osaan. Toinen puoli altistettiin kanamysiiniselektiolle (50 mg/l) MS-alustalla kal-
 30 lussolukon muodostumisen aikana. MS-alustaan lisättiin 0,6

mg/l naftyylietikkahappoa (NAA) ja 0,2 mg/l kinetiiniä. Transgeeniset kasvit regeneroitiin tavallisella tavalla transgeenisestä kallussolukosta MS-alustalla, johon oli lisätty 0,5 mg/l bentsyyliaminopuriinia (BAP) ja 0,1 mg/l NAA:ta. Transgeenisten kasvien regeneroinnissa kallussolukosta esiintyy kuitenkin vaikeuksia, jos solun genomi inkorporoi koodittavat alueet, jotka ovat peräisin rekombinanttiplasmideista pPCV002-CaMVBT tai pPCV002-CaMVBT+C. Sen vuoksi versoja kasvatettiin 10 - 12 viikkoa MS-alustalla, johon oli lisätty 7,5 mg/l isopentenyyliadenosiinia ja 0,1 mg/l kloorifenoksietikkahappoa; Firoozabady, Plant Science 46 (1986), sivu 127. Versot juurrutettiin hormoni-vapaalle MS-alustalle ja selektoitiin kanamysiiniresistenssin suhteen. Juuriviljelmät muodostettiin joko kiinteällä MS-alustalla tai nestemäisessä MS-alustassa.

DNA- ja RNA-analyysit

DNA ja RNA saatiin transgeenisten kasvien kudoksista Taylor ja Powell; BRL Focus 4 (1983), sivu 4, kuvaaman menetelmän mukaisesti. PolyA-RNA puhdistettiin kromatografimalla oligo-dT-selluloosan läpi valmistajan (Boehringer Mannheim) ohjeiden mukaisesti ja sitten erotettiin 1,5 % agarosiformaldehydigeelissä. Sitten ne siirrettiin nylon-membraaneille ja hybridisoitiin radioaktiivisten koettimien kanssa. Käytetyt koettimet olivat puhdistettuja DNA-fragmentteja, jotka oli leimattu nick-translaatio-menetelmällä BRL:n nick-translaatio-käyttöpakkauksen avulla valmistajan ohjeiden mukaisesti. Northern blot-analyysin hybridisaatio suoritettiin 10 % dekstraanisulfaatin, 1 M natriumkloridin, 1 % natriumlauryylisulfaatin, 100 ug/ml heterologisen DNA:n läsnäollessa 65 °C:ssa. Pesut suoritettiin ensin 2 x SSPE, 1 % SDS-liuoksella huoneen lämpötilassa ja seuraavaksi 0,2 x SSPE-liuoksella ja 1 % SDS-liuoksella 65 °C:ssa. DNA täpläanalyysit käsiteltiin edelleen tavanomaisella tavalla; Maniatis et al., yllä mainitussa paikassa.

Todistus neomysiinifosfotransferaasi-II-aktiivisuudesta

Neomysiinifosfotransferaasi-II-aktiivisuus todistettiin in situ testeillä, kuten ovat kuvanneet Spena et al., EMBO J. 4 (1985), sivu 739.

Esimerkit kuvaavat keksintöä.

Esimerkki 1

Plasmidin pPCV002-BC rakentaminen

Rekombinanttiplasmidi pPCV002-BC saatiin subkloonaamalla 3581 emäsparin pituinen SmaI/EcoRI DNA-fragmentti binaariseen vektoriin pPCV002. Tarkan kuvauksen fragmentista ovat antaneet Spena et al., yllä mainitussa paikassa. SmaI/EcoRI-fragmentti, joka sisältää rolB- ja rolC-geenien koodittavat alueet, eristettiin plasmidista pPCV002-ABC ja subkloonattiin plasmidin pUC19 SmaI/EcoRI-restriktiokatkaisukohtiin. Tämä fragmentti sisältää alueen emäsparista 9863 emäspariin 13445 T_L-DNA:n sekvenssin numeroinnin mukaisesti, jonka numeroinnin ovat kuvanneet Slightom et al. (1986), yllä mainitussa paikassa. Näin saadusta plasmidista pUC19-BC leikattiin EcoRI/XbaI DNA-fragmentti ja subkloonattiin vektorin pPCV002 EcoRI/XbaI-restriktiokatkaisukohtiin. Tällä tavalla saatiin plasmidi pPCV002-BC.

Esimerkki 2

Plasmidin pPCV002-HSIPT rakentaminen

Plasmidi pPCV002-HSIPT rakennettiin valmiina olevien menetelmien mukaisesti; katso Maniatis et al. (1982), yllä mainitussa paikassa. Oktopiini Ti-plasmidin pTi15955 TDNA:n RsaI/RsaI DNA-fragmentti subkloonattiin plasmidin pUC9 SmaI-restriktiokatkaisukohtaan. Tämä DNA-fragmentti sisältää alueen emäsparista 8588 emäspariin 9836 Barker et al., Plant Mol. Biol. 2 (1983), sivut 335-350, julkaiseman numeroinnin mukaisesti. Saatu plasmidi pUC9-IPT katkaisiin EcoRI-restriktioentsyymillä IPT-geenin koodittavan alueen ylävirralla olevasta restriktiokatkaisukohdasta ja

promoottori poistettiin sitten digestoimalla Bal31-ekso-nukleasilla. Translaation aloituskohdasta ylävirtaan jäl-jelle jääneiden emäsparien määrä tarkistettiin DNA-sek-venssoinnilla juosteen terminaatiomenetelmän mukaisesti.

5 Sitten IPT-geenin koodittava alue poistettiin plasmidista pUC9-IPT katkaisemalla EcoRI- ja HindIII-restriktioentsyy-meillä ja subkloonattiin plasmidin pUC8-HSP-70 BamHI/-HindIII-restriktiokatkaisukohtiin EcoRI- ja BamHI-restrik-tiokatkaisukohtien ollessa muutettu tasapäisiksi käsitte-

10 lemällä Klenow-polymeraasilla ennen ligaatiota. Tuloksena syntynyt plasmidi pUC8-HSIPT sisältää näin ollen IPT-gee-nin koodittavan alueen alavirtaan *Drosophila melanogaster*-kärpäsän lämpöindusoituvasta HSP-70-promoottorista. Tämä kimeerinen geeni leikattiin ulos EcoRI- ja HindIII-res-triکتioentsyy-meillä ja subkloonattiin binaarisen kasvivek-

15 torin pPCV002 EcoRI- ja HindIII-restriktiokatkaisukohtaan. Niin muodoin saatu plasmidi pPCV002-HSIPT sisältää seuraa-vat rakenteelliset ominaisuudet:

- 258 emäsparia *Drosophila melanogaster*-kärpäsän HSP-70-
- 20 promoottoria;
- 199 emäsparia *Drosophila melanogaster*-kärpäsän transloi-matonta sekvenssiä;
- 16 emäsparia IPT-geenin transloimatonta sekvenssiä si-sältäen nukleotidisekvenssin "GGATCTAATTC" fuusiokohdassa;
- 25 - 712 emäsparia IPT-geenin koodittavaa aluetta; ja
- 373 emäsparia IPT-geenin terminaatioalueen 3'-pään transloimatonta sekvenssiä.

Esimerkki 3

rolA-, rolB- ja rolC-geenin biologinen vaikutus

30 transgeenisissa tupakkakasveissa

Transgeeniset tupakkakasvit, joissa rolA-, rolB- ja rolC-geenit ekspressoituvat, omaavat kaikki hr-syndroo-malle tyypilliset fenotyyppiset muutokset. Päinvastaisesti transgeeniset tupakkakasvit, joissa yksi ainoa rol-geeni

35 tai näiden geenien kaksoisyhdistelmä ekspressoituu, omaa-

vat muita fenotyyppisiä muutoksia, jotka ovat tyypillisiä sellaisille yksittäisille geeneille tai yhdistelmille. Kuviossa 2 transgeenista tupakkakasvia, joka sisältää ja ekspressoii rolA- ja rolB-geenin koodittavia alueita, on verrattu normaalin villityypin (SR1) tupakkakasvin tai transgeenisen tupakkakasvin, joka sisältää ja ekspressoii rolA-, rolB- ja rolC-geenien koodittavia alueita, kanssa. On helposti havaittavissa, että keksinnön kasvi, joka sisältää ja ekspressoii rolA- ja rolB-geenin koodittavia alueita, eroaa villityypin (SR1) kasvista ja hr-syndrooman omaavasta kasvista, joka ekspressoii kaikkia kolmea koodittavaa aluetta.

Transgeeniset kasvit, jotka sisältävät rolB- ja rolC-geenin tai rolA- ja rolC-geenin koodittavien alueiden yhdistelmät genomissaan, eivät omaa kaikkia hr-syndroomalle tyypillisiä ominaisuuksia, mutta eroavat villityypin kasveista; katso kuvio 12 ja kuvio 8, vastaavassa järjestyksessä.

Samat päätelmät tehtiin, kun tutkittiin risteytyskokeiden jälkeläisiä, joissa kokeissa transgeeniset rolAB-kasvit risteytettiin transgeenisten rolC-kasvien kanssa. Näissä tunnetuilla tavoilla suoritetuissa risteytyskokeissa transgeeninen tupakkakasvi, joka sisältää genomissaan rolA- ja rolB-geenin koodittavan alueen (esimerkiksi AB3-5), risteytettiin transgeenisen tupakkakasvin, joka sisältää genomissaan rolC-geenin koodittavan alueen (esimerkiksi C9a), kanssa. 29 kasvia 100 jälkeläiskasvista omasi täydellisen hr-syndrooman.

Transgeeniset tupakkakasvit, jotka sisältävät ja ekspressoivat rolC-geenin koodittavaa aluetta, omaavat muunnellun lehtimorfologian, pienentyneen kukan koon ja alentuneen siitepölytuoton (kuvio 9), siemenkapselit ovat pienempiä (kuvio 11) ja kasvi on haaroittuneempi (kuvio 7).

Transgeeniset tupakkakasvit, jotka sisältävät rolB-geenin koodittavan alueen genomissaan ja ekspressoivat sitä, kaikki omaavat muita kasvumuutoksia. Näitä ovat oleellisesti muut muutokset lehtimorfologiassa, suurentuneet emin luotit ja kukat (kuvio 9). Siitepölytuotto on vain hiukan alentunut ja siemenkapselien suhteen ei ole haitallista vaikutusta tapahtunut (kuvio 11). Tupakkakasvien, jotka ovat transgeenisia rolA-, rolB- ja rolC-geenien suhteen, kukat ovat pienempiä kuin villityypin (SR1) kasvien, kun taas kasvien, jotka ovat transgeenisia rolB-geenin suhteen, kukat ovat suurempia ja omaavat muuttuneita ominaisuuksia (kuvio 9).

Transgeeniset kasvit, jotka sisältävät genomissaan rolC-geenin koodittavan alueen ja rolA- tai rolB-geenin koodittavan alueen yhdistelmän, omaavat myös pienemmät kukat. Näissä kasveissa yksi koodittavista alueista on vaihtoehtoisesti vahvan heterologisen promoottorin säätelyn alaisuudessa. Sellaiset kasvit voidaan saada esimerkiksi plasmidien pPCV002-AC, pPCV002-BC tai pPCV002-CaMVBT+C, avulla.

Transgeeniset tupakkakasvit, jotka sisältävät rolA-geenin koodittavan alueen genomissaan, eroavat muunneltujen kasvuominaisuuksiensa suhteen sekä transgeenisista kasveista, jotka sisältävät rolB-geenin koodittavan alueen genomissaan, että niistä, jotka sisältävät rolC-geenin koodittavan alueen genomissaan. Eräs erittäin tyypillinen ominaisuus sellaisille kasveille on kurttuaiset lehdet, tiivistynyt kukinto (kuvio 6) ja suuremmat kukat, joilla on muuttunut morfologia (kuvio 9).

Keksinnön transgeenisten kasvien jälkeläistö omaa samanlaiset morfologiset muutokset kuin emokasvi. Lisäksi suoritetuissa kokeissa havaittiin, että muunnellut ominaisuudet erottuvat yhdessä kanamysiinisulfaattiresistenssin kanssa. Toisessa kokeessa keksinnön mukaisia eri tupakkakasveja testattiin tutkittaessa, korreloivatko fenotyyppiset muutokset rol-geenien ekspression kanssa.

Kuvio 13 osoittaa Northern blot-analyysin polyA-RNA:sta, jotka on eristetty keksinnön eri transgeenisten kasvien kudoksista. Kaikissa testatuissa tapauksissa muutunut kasvu korreloi rol-geenien ekspression kanssa.

5 Esimerkki 4

Tyypillisten rol-ominaisuuksien muuttaminen ekspressionopeutta muuttamalla

Transgeeniset kasvit, jotka sisältävät genomissaan rolC-geenin koodittavan alueen, joka on CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa, omaavat erilaisen fenotyypin kuin kasvit, joissa genomien sisältämien rolC-geenien koodittava alue on luonnollisen promoottorin säätelyn alaisuudessa; katso kuvioita 3, 4 ja 7. CaMV35S-promoottorin käyttö johtaa tuuheaan fenotyyppiin, jolla on kohonnut versojen määrä. Kukat ovat erittäin pieniä (kuvio 10) ja lehdet ovat kapeita ja keihäsmäisiä (kuvio 4). Transgeeniset CaMV-C-kasvit ovat koiraspuolisesti steriilejä ja tämä piirre siirtyy jälkeläistölle yhtenä dominanttina geeninä.

20 Testit lyhytaikaisissa ekspressiosysteemeissä tupakan lehtien protoplasteja käyttäen ovat osoittaneet, että rolC-geenin koodittavan alueen ekspressionopeus on 15 kertaa korkeampi, kun käytetään CaMV35S-promoottoria. Tämä pitää paikkansa tulosten kanssa, jotka saatiin transgeenisten kasvien polyA-RNA:lla tehdyillä Northern blot-analyysillä. Tämä on myös vahvistettu analysoimalla ekspressiota transgeenisissä kasveissa, jotka sisältävät kimeerisen geenin, joka koostuu beeta-glukuronidaasin koodittavasta alueesta ja rolC-promoottorista. Niin ollen rolC-geenin koodittavan alueen spesifisen ekspression muutos on vastuussa alentuneesta apikaalidominanssista.

35 Lisäksi valmistettiin transgeeniset kasvit, joissa rolB-geenin koodittava alue on CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa. Nämä kasvit valmistettiin käyttäen rekombinanttiplasmidia pPCV002-CaMVBT. Yksi näiden trans-

geenisten kasvien ominaisuuksista on aikaisempi lehtien vanhentuminen (nekroosi); katso kuvio 15. Näiden transgeenisten kasvien polyA-RNA:n Northern blot-analyysi osoitti, että kimeerinen geeni ekspressoituu lehdissä korkeammalla tasolla kuin transgeenisissä kasveissa, joissa rolB-geenin koodittava alue on luonnollisen promoottorin säätelyn alaisuudessa. Uuden fenotyypin aiheuttaa näin ollen rolB-geenin koodittavan alueen kohonnut ekspressionopeus.

Lisäksi valmistettiin keksinnön mukaiset transgeeniset kasvit, jotka sisältävät CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa olevan rolB-geenin koodittavan alueen ja rolC-geenin koodittavan alueen yhdistelmän. Näiden kasvien valmistuksessa käytettiin rekombinanttiplasmidia pPCV002-CaMVBT+C. Mainitut kasvit omaavat lehtinekroosin, joka on tyypillistä transgeenisille CaMVBT-kasveille; katso kuvio 15. Päinvastaisesti kukkamorfologia on verrattavissa transgeenisiin kasveihin, jotka sisältävät rolC-geenin koodittavan alueen genomissaan.

Nekroottinen prosessi alkaa lehtikudoksessa lehtisuonten välistä ja etenee vaikuttaen koko lehteen; katso kuvio 15. Tämä havaitaan yleensä kasveissa, jotka ovat saavuttaneet kypsyyden ennen kukkien muodostumista. Lehdet, joihin vaikutus kohdistuu ensin, eivät ole vanhimpia eikä nuorimpia, mutta sijaitsevat suurin piirtein kasvin keskikohdalla. Kuitenkin joillakin transgeenisillä CaMVBT+C-kasveilla on kohonnut versojen ja lehtien määrä nekroottisen prosessin ollessa vähemmän selvä näissä kasveissa ja sen ollessa siirtynyt kukinnan jälkeiseen aikaan. Eri transgeenisten CaMVBT+C-kasvien Northern blot-analyysi antaa olettaa, että kasvit, joilla on kohonnut määrä versoja ja hidastunut lehtinekroosi, ekspressoivat CaMVBT-geeniä vähemmän kuin rolC-geeniä. Näin ollen näillä kasveilla on kohonnut suhde rolC-transkriptien määrässä verrattuna rolB-transkriptien määrään.

Esimerkki 5

Transgeeniset rol-geenin indusoimat tupakan juuret

Aluksi tutkittiin sitä, kykynevätkö rol-geenin indusoimat tupakan juuret kasvamaan MS-alustalla, joka sisälsi kanamysiiniä, koska juuret, niiden ollessa tehty plasmidien pPCV002-ABC, pPCV002-B1100, pPCV002-AC avulla, myös sisältävät neomysiinifosfotransferaasi-II-geenin erillään rol-geenin koodittavista alueista. 166 rol-geenin indusoimaa tupakan juurta testattiin. 153 niistä kykeni selvästi kasvamaan MS-alustalla, joka sisälsi kanamysiinisulfaattia. Muut 12 eivät olleet selvästi positiivisia ja ne tutkittiin sen vuoksi in situ testeillä neomysiinifosfotransferaasi-II-geenin aktiivisuuden suhteen. Lisäksi tehtiin Southern blot-analyysit kasvien genomista. Tulokset osoittavat, että nämä juuret olivat todella transformoituneet.

Rol-geenin eri koodittavat alueet tai niiden yhdistelmät omaavat eri vaikutukset juuren kasvuun. Transgeeniset tupakan juuret, jotka sisälsivät yksittäisen rol-geenin, kasvoivat paremmin kuin transformoitumattomat juuret. Transgeeniset juuret, jotka sisälsivät rolC-geenin, haaroittuivat useammin kuin ne, jotka sisälsivät rolA-geenin tai rolB-geenin. Päinvastaisesti transgeeniset juuret, jotka sisälsivät rolC-geenin yhdessä rolA-geenin ja/tai rolB-geenin kanssa, kasvoivat paljon voimakkaammin. RolB-geenillä rolC-geenin kanssa yhdistettynä on vahvempi vaikutus kuin rolA-geenin yhdistelmällä rolC-geenin kanssa. RolA- ja rolB-geenin yhdistelmät eivät johtaneet oleellisesti parantuneeseen juuren kasvuun verrattuna siihen, kun geenejä käytettiin yksinään. Kun rolC-geenin koodittava alue on CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa, juurikasvu paranee (kuvio 5). Päinvastaisesti juuret kasvavat vähemmän voimakkaasti, kun rolB-geenin ekspressio on CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa. Kuitenkin juuret kasvavat nopeammin, jos rolB-geenin koodittava alue on

CaMV35S-promoottorin säätelyn alaisuudessa ja on yhdistetty rolC-geeniin. Tässä tapauksessa juuret ovat erittäin haaroittuneita ja kasvavat plagiotrooppisella tavalla. Spena et al., yllä mainitussa paikassa, kuvaamia ja esimerkiksi 1 kuvattuja rekombinanttiplasmideja käytettiin näiden transgeenisistä kasveista peräisin olevien juurten valmistuksessa.

Juurten kudosviljelmät ovat erittäin sopivia sekundaaristen kasvituotteiden valmistukseen.

Patenttivaatimukset:

1. Haluttuja piirteitä omaava transgeeninen kasvi, joka genomissaan sisältää *Agrobacterium rhizogenes* -bakteerin Ri-plasmidin T₁-DNA:n rol C-geenin koodittavan alueen, jolloin kasvilla on muuttunut morfologia, fysiologia ja hormonimetabolismi mainitun geenin ekspression johdosta, t u n n e t t u siitä, että rol C-geeni on heterologisen promoottorin säätämänä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen transgeeninen kasvi, t u n n e t t u siitä, että heterologinen promoottori on *Drosophila melanogaster* -kärpäsen HSP ("Heat Shock Promotor")-70-promoottori.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen transgeeninen kasvi, t u n n e t t u siitä, että heterologinen promoottori on vahva konstitutiivinen promoottori.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen transgeeninen kasvi, t u n n e t t u siitä, että vahva konstitutiivinen promoottori on CaMV ("Kukkakaalin mosaiikkivirus")-35S-promoottori.
5. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen transgeeninen kasvi, t u n n e t t u siitä, että se on peräisin heimoista Solanaceae, Apocynaceae, Chenopodiaceae, Polygonaceae, Boraginaceae, Compositae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Caprifoliaceae, Leguminosae, Araceae, Moraceae, suvusta *Asplenium*, heimosta Euphorbiaceae, kaalityypeistä, auringonkukista, porkkanoista, paprikasta (*Capsicum annuum*), purjolaukasta, retiisityypeistä, lehtisalaattityypeistä, lehtiselleristä (*Apium graveolens*), sipuleista, saksankuminasta (*Foeniculum vulgare*), vehnästä, rukiista, ohrasta, viljasta (maissista), sokerijuurikkaasta, soiwapavusta, kauroista, riisityypeistä, daalioista, koristetupakasta, pelargonioista, petunioista, esikoista, orvokeista, astereista, amarantustyypeistä, vuokoista, leijonankidoista (*Antirrhinum*), akileijasta, ko-

risteasparaguksesta, begonioista, tohvelikukasta, rapsista, krysanteemista, syklaamista, kukannuksesta, puutarha-neilikoista, gerberasta, häpykannuksista, lupiinista, neilikasta, heimosta Portulaceae, leinikistä (Ranunculus),
 5 salviasta, gloksiiniasta, tageteksesta, ukon tulikukasta, zinniasta, heimosta Rosaceae, saponoriasta tai Panax ginseng -kasvista.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen transgeeninen kasvi, t u n n e t t u siitä, että se on peräisin perunasta tai tupakasta.
 10

7. Kudosviljelmä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisen transgeenisen kasvin soluja tai elimiä tai transgeenisen kasvielimen soluja.

8. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisen transgeenisen kasvin tai patenttivaatimuksen 7 mukaisen kasvikudoksen käyttö sekundaaristen kasvituotteiden valmistamiseen.
 15

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen käyttö, t u n n e t t u siitä, että sekundaariset kasvituotteet ovat alkaloideja, monoterpeenejä, seskviterpeenejä, diterpeenejä, triterpeenisteroideja, tetraterpeenejä, polyketidejä, polyasetyleenejä, flavonoideja, fenyylipropanoideja, amiineja, proteiinissa esiintymättömiä aminohappoja, syanoglykosideja tai glukosinolaatteja.
 20
 25

10. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisen transgeenisen kasvin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) kasvin protoplasteja tai kudosta viljellään yhdessä Agrobacterium tumefaciens- tai Agrobacterium rhizogenes -bakteerien kanssa, jotka bakteerit sisältävät rekombinanttiplasmidin, joka on peräisin Ti- tai Ri -plasmideista ja joka sisältää Agrobacterium rhizogenes -bakteerin Ri-plasmidin T₁-DNA:n rol C-geenin koodittavan alueen
 30
 35 heterologisen promoottorin säätämänä ja valinnaisesti se-

lektoitavan merkkigeenin;

b) transgeeniset solut selektoidaan; ja

c) transgeeninen kasvi tai transgeeninen kasvielin
regeneroidaan transgeenisista soluista käyttämällä isopen-
5 tenyyliadenosiinilla ja kloorifenoksietikkahapolla rikas-
tettua alustaa versojen viljelemiseksi.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että rekombinanttiplasmidi sisäl-
tää koodittavia alueita ja promoottoreita, jotka sisälty-
10 vät kuviossa 1 esitettyihin rekombinanttiplasmideihin.

Patentkrav:

1. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan med
5 modifierad fysiologi, morfologi och modifierad hormon-
metabolism, k ä n n e t e c k n a d e därav, att de i
sitt genom innehåller

a) den kodande regionen av rolA-genen, rolB-genen,
rolC-genen, rolA- och rolC-genen, rolB- och rolC-genen
10 eller rolA- och rolB-genen i T_L-DNA:et av Ri-plasmiden från
Agrobacterium rhizogenes och/eller den kodande regionen av
IPT-genen (isopentyl-adenosintransferas-genen) i T-DNA:et
av Ti-plasmiderna från Agrobacterium tumefaciens, varvid
den eller de kodande regionerna styrs av dess/deras natur-
15 liga eller av en heterolog promotor, med undantag av den
kodande regionen av rolC-genen, vilken, ifall den ej in-
nehålls i kombination med någon av de andra kodande regio-
nerna i genomet, styrs av en heterolog promotor; och

b) eventuellt även en valbar markeringsgen;
20 varvid de kodande regionerna och markeringsgenen ex-
primeras.

2. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt
patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d e därav, att den
heterologa promotorn är HSP ("Heat Shock Promotor")-70-
25 promotorn av Drosophila melanogaster.

3. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt
patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d e därav,
att den heterologa promotorn är en stark, konstitutiv pro-
motor.

30 4. Transgenisk växt eller ett ditoväxtorgan enligt
patentkravet 2 eller 2, k ä n n e t e c k n a d e därav,
att den starka, konstitutiva promotorn är CaMV ("Cauliflo-
wer Mosaic Virus")-35S-promotorn.

5. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt
35 något av patentkraven 1, 3 och 4, k ä n n e t e c k n a -

de därav, att de i genomet innehåller den kodande regionen av rolC-genen av T_L-DNA:et i Ri-plasmiden från *Agrobacterium rhizogenes*, vilken står under styrning av en stark, konstitutiv promotor, företrädesvis av CaMV35S-promotorn.

5 6. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a d e därav, att den kodande regionen av IPT-genen står under styrning av HSP-70-promotorn av *Drosophila melanogaster*.

10 7. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a d e därav, att de i genomet innehåller den kodande regionen av rolB-genen och rolC-genen, vilka står under styrning av en rotspecifik promotor och därigenom uppvisar en modifierad rotbildning och modifierad rottillväxt i frånvaro av andra
15 särdrag, vilka är typiska för transgeniska rolBC-växter.

 8. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan med modifierad fysiologi, morfologi och modifierad hormonmetabolism, k ä n n e t e c k n a d e därav, att de i genomet innehåller den kodande regionen av rolA-, rolB och
20 rolC-genen, varvid åtminstone en av de kodande regionerna står under styrning av en heterolog promotor, företrädesvis av CaMV35S-promotorn, och att de övriga kodande regionerna står under styrning av deras naturliga promotor.

 9. Transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt
25 något av patentkraven 1-8, k ä n n e t e c k n a d e därav, att de deriverats från solanaceae, apocyanaceae, chenopodiaceae, polygonaceae, boraginaceae, compositae, rubiaceae, scrophulariaceae, caprifoliaceae, leguminosae, araceae, moraceae, asplenium, euphoriaceae, kåltyper, solrosor, morötter, paprika (*Capsicum annuum*), purjolök, rädistyper, sallatstyper, celleri (*Apium graveolens*), lök, fänkål (*Foeniculum vulgare*), vete, råg, korn, majs, sockerbeta, sojaböna, havre, ristyper, dalior, prydnadstobak, pelargonja, petunia, primulae, violer, astrar,
30 amaranthustyper, anemoner, lejongap (*Antirrhinum*), ak-

vileja, prydnadssparris, begonior, calceolaria, coleus, chrysanthemum cyklamen, delphinium, nejlikor, gerbera, springkorn, lupiner, lövkojor, portulacaceae, ranunklar (Ranunculus), salvia, gloxinia, tagetes, mullein, cinnia, 5 rosaceae, -saponaria eller Panax ginseng, företrädesvis från potatis eller tobak.

10. Vävnadskultur, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller celler eller organ av en transgenisk växt eller celler från ett transgeniskt växtorgan enligt 10 något av patentkraven 1-9.

11. Användningen av en transgenisk växt enligt något av patentkraven 1-9 för odling av växter med modifierade biokemiska, fysiologiska, utvecklingsfysiologiska och/eller morfologiska särdrag.

15 12. Användningen av en transgenisk växt enligt något av patentkraven 1-9 eller en vävnadskultur enligt patentkravet 10 för framställning av sekundära växtprodukter, företrädesvis alkaloider, monoterpener, seskviterpener, diterpener, triterpensteroider, tetraterpener, polyketider, polyacetylenar, flavonoider, fenylpropanoider, 20 aminer, icke-proteinaminosyror, cyanglykosider eller glukosinolater.

13. Förfarande för framställning av en transgenisk växt eller ett dito växtorgan enligt något av patentkraven 25 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar protoplast eller vävnad från en växt tillsammans med Agrobacterium tumefaciens eller Agrobacterium rhizogenes-bakterier, vilka innehåller en rekombinant plasmid som deriverats Ti- eller Ri-plasmider och som innehåller de kodande regionerna av T_L-DNA i R₁-plasmiden från Agrobacterium rhizogenes och/eller den kodande regionen av IPT-genen av T-DNA i Ti-plasmiden från Agrobacterium tumefaciens och eventuellt en valbar markeringsgen;

b) väljer transgeniska celler; och

35 c) regenererar en transgenisk växt eller ett trans-

geniskt växtorgan från de transgeniska cellerna.

14. Förfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att den rekombinanta plasmiden innehåller kodande regioner och promotorer med den biologiska aktiviteten hos de kodande regionerna och promotorerna i de rekombinanta plasmiderna pPCV002-ABC, pPCV002-AB, pPCV002-B1100, pPCV002-B300, pPCV002-CaMVBt, pPCV002-C, pPCV002-CaMVBt+C, pPCV002-CaMV-C, pPCV002-A, pPCV002-AC, pPCV002-BC eller pPCV002-HSIPT.

15. Rekombinant plasmid, k ä n n e t e c k n a t därav, att den innehåller kodande regioner eller promotorer med den biologiska aktiviteten hos de kodande regionerna och promotorerna i den rekombinanta plasmiden pPCV002-BC.

16. Rekombinant plasmid, k ä n n e t e c k n a t därav, att den innehåller kodande regioner och promotorer med den biologiska aktiviteten hos de kodande regionerna och promotorerna i den rekombinanta plasmiden pPCV002-HSIPT.

17. Förfarande för eliminering av hansterilitet eller reducerad honfertilitet hos en transgenisk växt enligt något av patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att den transgeniska växten korsbefrukts med en hanfertil växt, vilken är homozyg för en gen, vilken

a) under expressionsstyrning av en promotor, vilken är funktionell i den transgeniska växten, exprimerar ett "antisens-RNA", vilket bildar en hybrid med mRNA:et i genen, vilken förorsakar hansterilitet eller reducerad honfertilitet; eller

b) under expressionsstyrning av en promotor, vilken är funktionell i den transgeniska växten, exprimerar ett ribozym, vilket igenkänner och spjälkar i efterkommande led mRNA:et hos genen, vilken förorsakar hansterilitet eller reducerad honfertilitet.

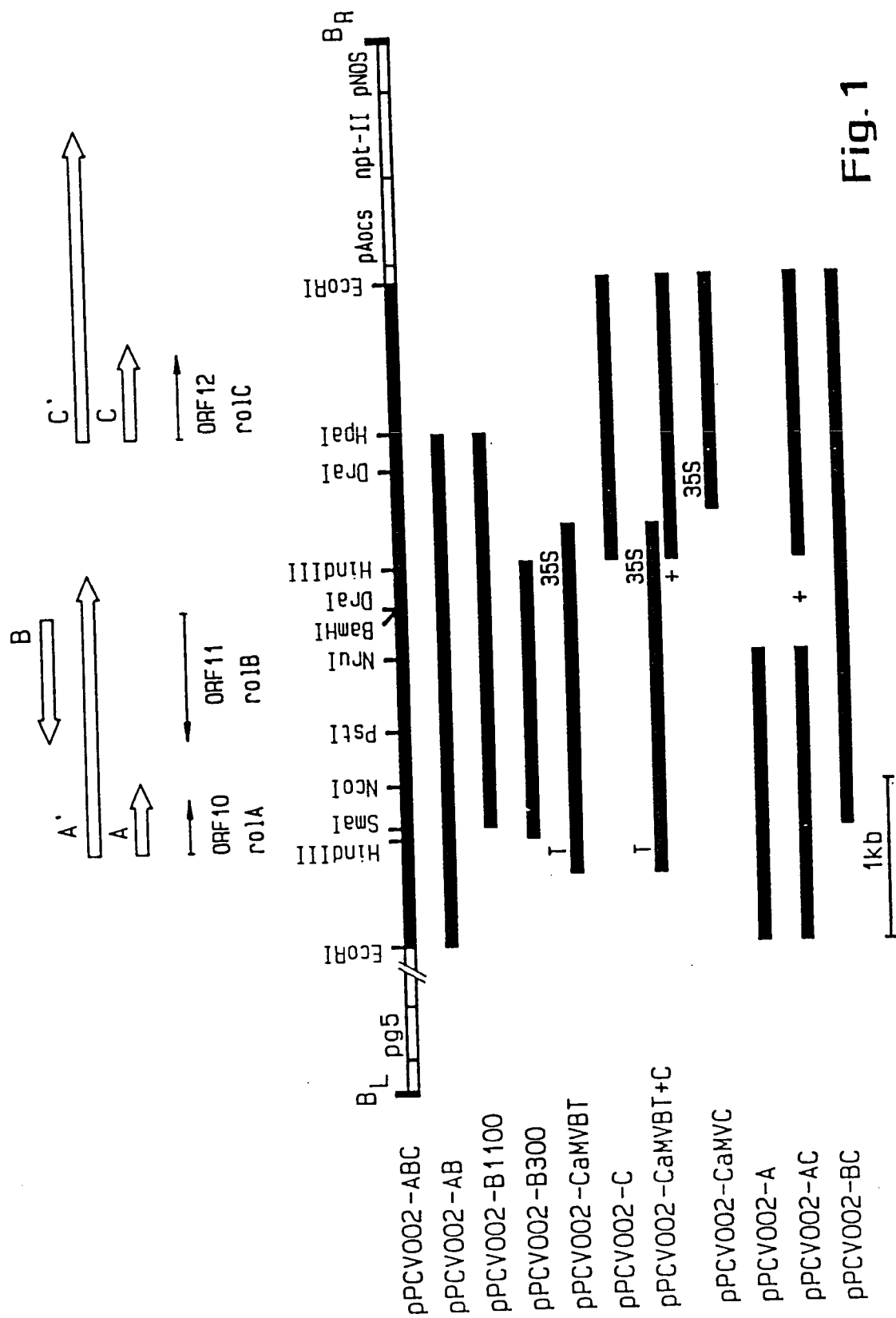


Fig. 1

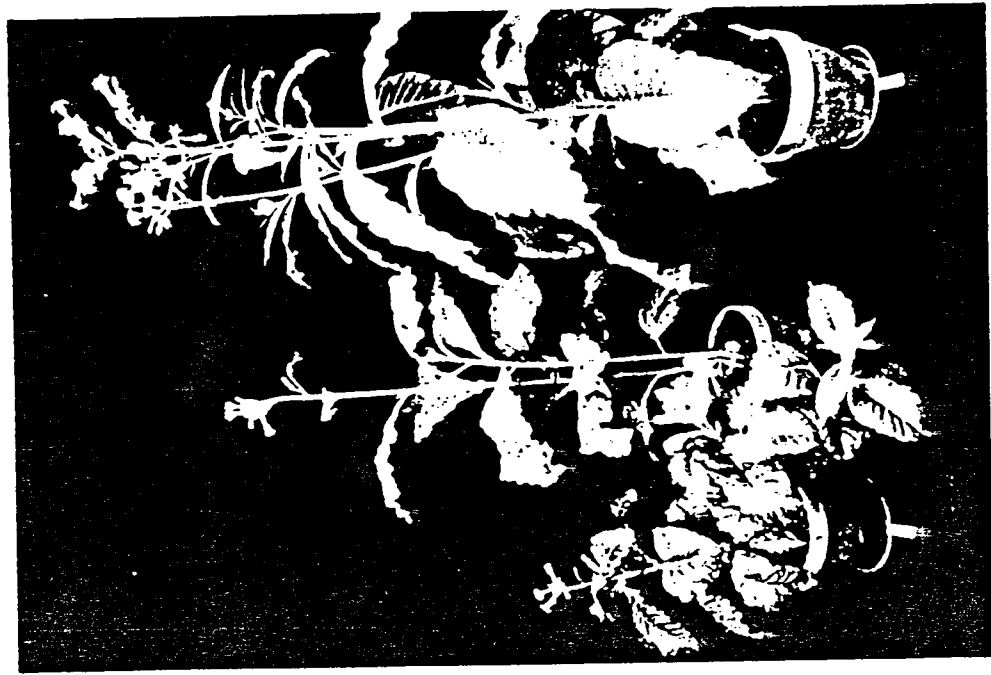


Fig. 2



Fig. 3



Fig. 4

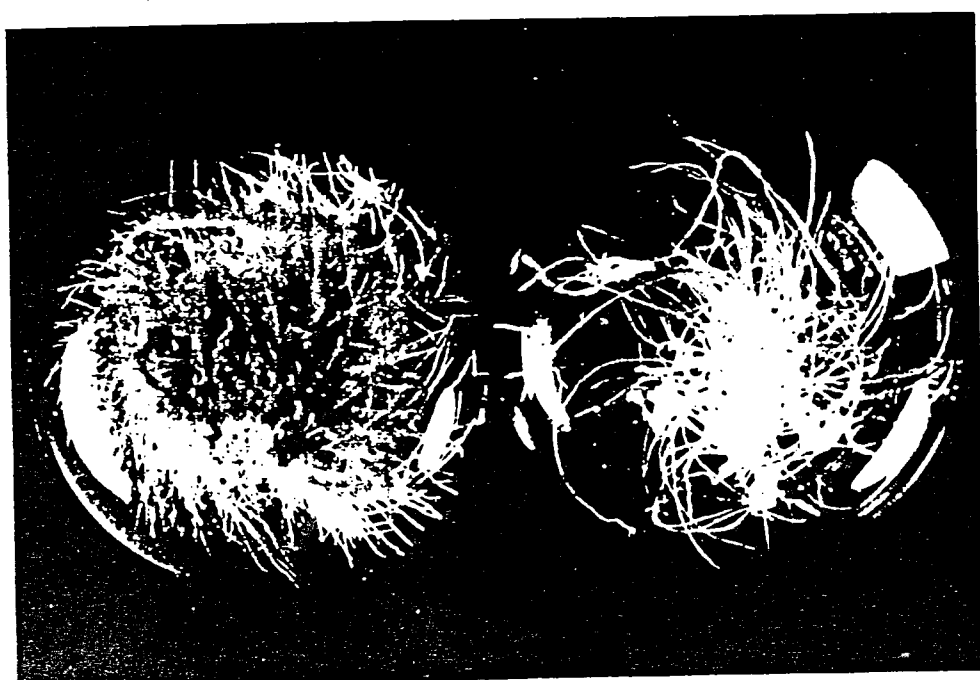


Fig. 5



Fig. 6

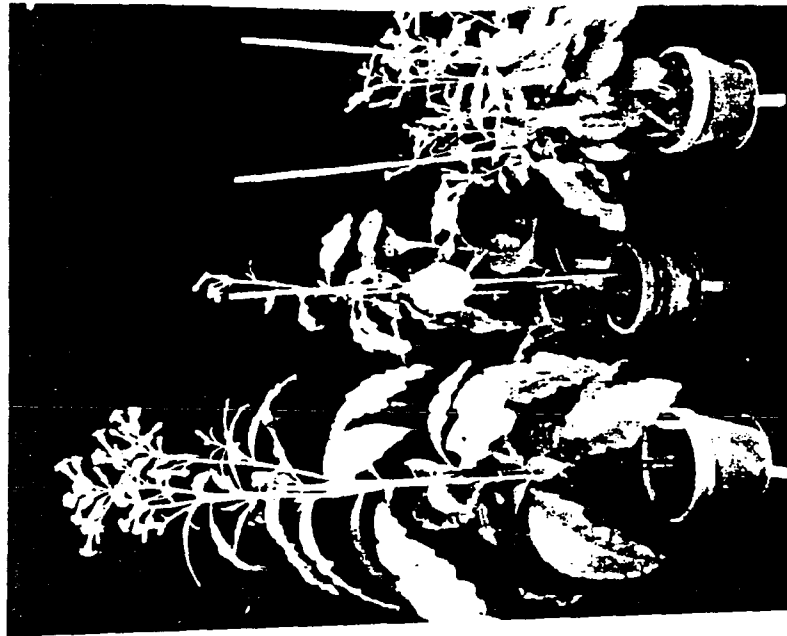


Fig. 7



Fig. 8



Fig. 9

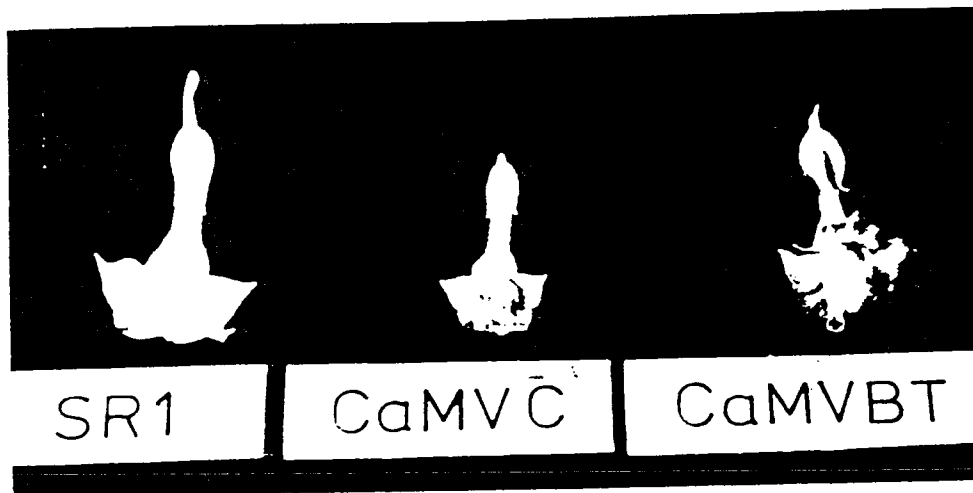


Fig. 10

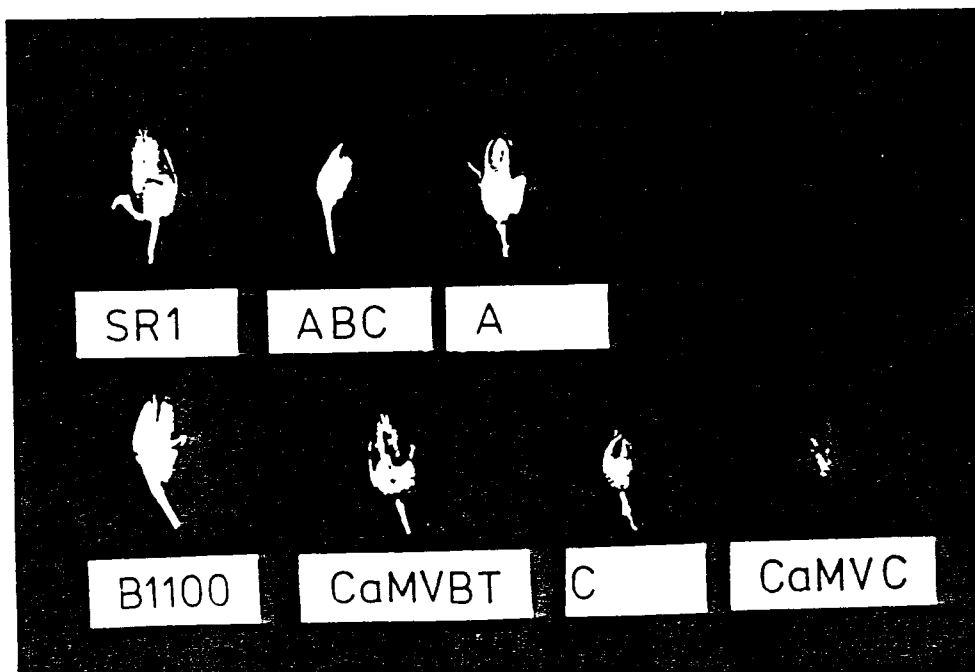


Fig. 11



Fig. 12



Fig. 15

ROL-TRANSGEENISTEN TUPAKKAKASVIEN
JUURIEN, VARSIEN JA LEHTIEN NORTHERN
BLOT -ANALYYSIT

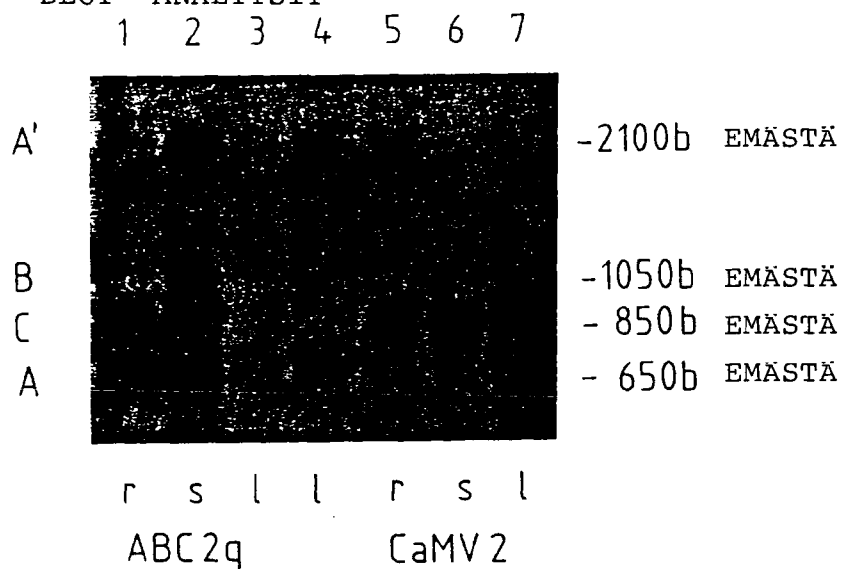


Fig. 13

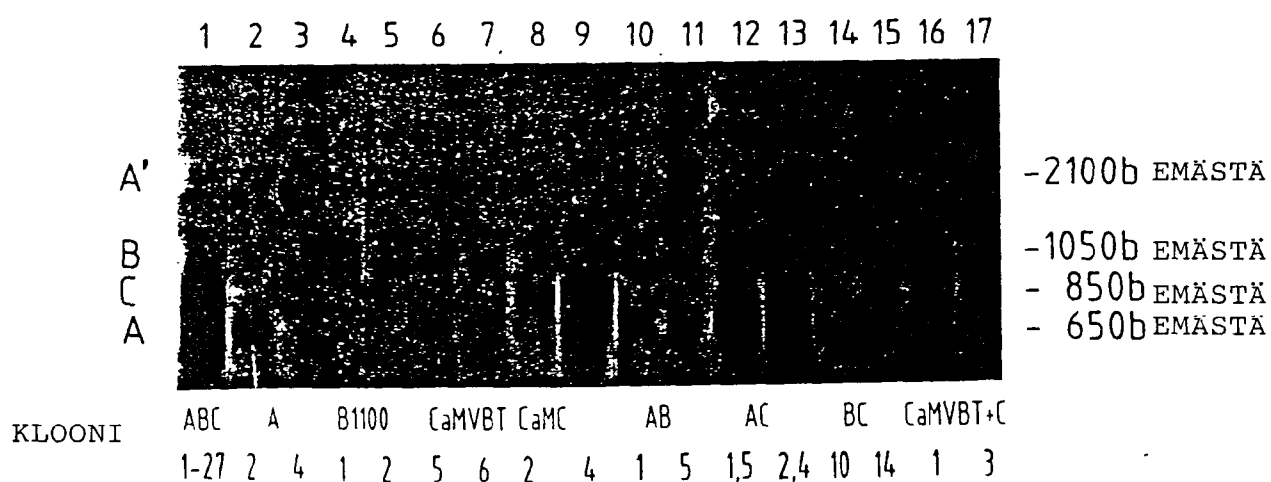


Fig. 14

**PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO**

TUTKIMUSRAPORTTI

[illegible]

[illegible]