



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11. Lajstromszám:

217 413 B

(21) A bejelentés ügyszám: 2763/89
(22) A bejelentés napja: 1989. 04. 27.
(30) Elsőbbségi adatok:
8810120.9 1988. 04. 28. GB
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 89/00495
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 89/10396

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/29
C 12 N 15/82

(40) A közzététel napja: 1990. 07. 30.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 01. 28.

(72) Feltalálók:

De Beuckeleer, Marc, Merelbeke (BE)
De Greef, Willy, Gent (BE)
Leemans, Jan, Deurle (BE)
Mariani, Celestina, Heusden (BE)

(73) Szabadalmaz:

Plant Genetic Systems N. V., Brüsszel (BE)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54)

Eljárás hímsterilitás kialakítására, valamint hímsteril növény és szaporítóanyag előállítására

KIVONAT

A találmány értelmében egy növényben a hímsterilitás kialakításához nem biológiai lépésként a növény sejtmaggenomját egy idegen DNS-szekvenciával, előnyösen egy idegen kimer DNS-szekvenciával látják el, ahol az idegen DNS-szekvencia tartalmaz:

a) egy hímsteril DNS-t, amely egy első RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely az adott növény porzószálsejtjében termelődve vagy túltermelődve lényegesen megzavarja az adott porzószálsejt metabolizmusát, funkcióját és/vagy fejlődését, és

b) egy első promotert, amely alkalmas a hímsteril DNS-nek szelektíven a növény porzószálsejtjeiben, előnyösen portok-, pollen- és/vagy szálsejtjeiben, elsősorban

a tapétum és/vagy portok epidermális sejtjeiben történő kifejezésének irányítására, ahol a hímsteril DNS ugyanabban az átírási egységben helyezkedik el, mint a szabályozására szolgáló első promoter; azzal a megszorítással, hogy ha az első promoter a hímsteril DNS-t szelektíven a pollensejtben fejezi ki, a transzformált növény nukleáris genomja homozigóta; miáltal a növény porzószálsejtjei elpusztulnak vagy tönkremennek, és a növény képtelenné válik fertilis hímivarsejtek termelésére.

A találmány kiterjed hímsteril növény és szaporítóanyag előállítására, melynek során a növényt és a szaporítóanyagot az idegen DNS-szekvenciával transzformált sejtől regenerálják.

A találmány tárgya eljárás hímsterilitás kialakítására, valamint hímsteril növény és szaporítóanyag előállítására, a hímsteril növény termesztésére, a hibrid mag előállítására, továbbá a hímsterilitást biztosító DNS és az ezt tartalmazó vektor előállítására.

A találmány értelmében a sejtmaggenomjába sejt-transzformációval idegen DNS-szekvenciát viszünk be. Ez az idegen DNS-szekvencia legalább egy első idegen DNS-t (továbbiakban hímsteril DNS) tartalmaz, amely: 1. olyan első RNS-t vagy fehérjét, vagy polipeptidet kódol, amely a növény porzószájsejtjeiben termelődve jelentős mértékben megzavarja a porzószájsejtek metabolizmusát, funkcióját és/vagy fejlődését és 2. ugyanabban az átírási egységben található, mint a szabályozására szolgáló első promoter, amely szelektíven a növény porzószájsejtjeiben biztosítja a hímsteril DNS közvetlen kifejezését.

A találmány tehát olyan, magban hímsteril növényre és szaporítóanyagára vonatkozik, amelyben az idegen DNS-szekvencia egy idegen kimer DNS-szekvencia, amely további szekvenciaként legalább egy második idegen DNS-szekvenciát (marker DNS) tartalmazhat, amely: 1. egy második RNS-t vagy fehérjét, vagy polipeptidet kódol, amely a növény legalább egy specifikus szövetében vagy sejtjében előfordulva biztosítja, hogy az egész növény könnyen megkülönböztethető legyen az olyan növényektől, amelyek nem tartalmaznak második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet, és 2. ugyanabban az átírási egységben található, mint a szabályozására szolgáló második promoter, amely a növény legalább egy specifikus szövetében vagy sejtjében biztosítja a marker DNS közvetlen kifejezését, és 3. a növényi sejtmaggenomon belül ugyanabban a genetikai szakaszban helyezkedik el, mint a hímsteril DNS.

A találmány kiterjed az idegen kimer DNS-szekvencia előállítására, amely legalább egy hímsteril DNS-t tartalmaz, amelyet egy első promoter szabályoz, és amely a hímsteril DNS mellett adott esetben legalább egy marker DNS-t tartalmaz, amelyet egy második promoter szabályoz.

A találmány kiterjed továbbá olyan vektor előállítására, amely a fenti idegen DNS-szekvenciát tartalmazza és növényi sejtekbe transzformálható, miáltal az idegen DNS-szekvencia stabilan beépül a sejtmaggenomjába.

A találmány tárgya továbbá eljárás magban hímsteril növény és szaporítóanyag előállítására, amely olyan idegen DNS-szekvenciát tartalmaz, amelyben a hímsteril DNS: 1. egy első promoter által szabályozott marker DNS-sel azonos genetikai szakaszban helyezkedik el, 2. stabilan beépült a növényi sejtmaggenomjába, és 3. egy első RNS, fehérje vagy polipeptid formájában szelektíven a növény porzószájsejtjeiben fejeződik ki.

A találmány tárgya továbbá eljárás hibrid magok előállítására, amelyekből hibrid növények fejlődnek, amelynek során 1. találmány szerinti hímsteril növényt, amelynek maggenomjában olyan marker DNS található, amely előnyösen herbicidekkel szembeni rezisztenciát biztosító fehérjét kódol, és 2. marker DNS nélküli hím fertilis növényt keresztezünk. A hibrid magok elő-

állítására vonatkozó, találmány szerinti eljárás során előnyösen kereskedelmi célra alkalmas, általában lényegében véletlenszerű populációt képző magokat állítunk elő jelentős kézi munka nélkül.

5 A találmány értelmében előnyösen alkalmazható a növényi genomból származó tapétum specifikus promoter, amely az idegen DNS-szekvenciának a növényi sejtbe történő transzformálását biztosító első promoterként alkalmazható.

10 A hibridizálás általánosan alkalmazott eljárás olyan növények előállítására, amelyek a szülőnövények kívánt tulajdonságait egyesítik magukban. A kapott hibrid növény egyes tulajdonságokban, így terméshozamban, környezeti változáshoz történő alkalmazkodóképességben vagy betegségekkel szembeni ellenálló képességben gyakran tútesz a szülőnövényeken. Ez a képesség az úgynevezett heterózis vagy hibrid életképesség. Ennek következtében a hibridizálást gyakran alkalmazzák a fő kultúrnövények, így a gabona, cukorrépa és napraforgó javítására. Különböző okokból, elsősorban azért, mert a legtöbb növény mind önbeporzásra, mind keresztbe beporzásra képes, a hibrid magok előállítására szolgáló szabályozott keresztbe beporzás jelentős önbeporzás nélkül, kereskedelmi méretekben nehezen valósítható meg.

A természetben szinte valamennyi kultúrnövény egy növényen hím és női szaporodószerveket fejleszt, amelyek általában egy virágon belül egymáshoz közel helyezkednek el. Ez okozza az önbeporzást. Néhány növénynél azonban a szaporodószervek különleges morfológiája miatt kivételesen a keresztbe beporzás részesül előnyben. Ezek a növények fokozott életképességű és alkalmazkodóképességű hibrid utódokat termelnek. Ilyen morfológiával rendelkezik például a Cannabis ssp. (kender), ahol a hím és női szaporodószervek külön növényen fejlődnek. Hasonló morfológiával rendelkezik továbbá a Zea mays (kukorica), ahol a hím és női szaporodószervek ugyanazon növény különböző részein fejlődnek. Másfajta morfológiával rendelkezik az Elaeis guineensis (olajpálma), ahol a hím és szaporodóképes női ivarsejtek a növény fejlődésén belül különböző időpontokban válnak szaporodóképessé.

Más növényfajták, például az Ananas comosus (ananasz) a keresztbe beporzást a szaporodószervek különleges fiziológiája miatt részesítik előnyben. Ezek a növények úgynevezett öninkompatibilis rendszert fejlesztek ki, amelynek következtében az egyik növényhez tartozó pollen nem képes megtermékenyíteni az ugyanahhoz a növényhez vagy más növényhez, de azonos genotípushoz tartozó női ivarsejteket.

Más növényfajok a hímsterilitás nevű genom jellemző természetes előfordulása miatt részesítik előnyben a keresztbe beporzást. Ennél a jellemzőnél a növény portokja elkorcsosul, mielőtt az általa termelt pollen megérne (M. L. H. Kaul: Male-Sterility in Higher Plants, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 10, Springer Verlag, 1987). Ez a természetes hímsterilitás a feltevések szerint egy sor természetes mutáció következménye, amelyek gyakran recesszív fogyatékosságot jelentenek, és ez a jellemző főként ön-

beporzásra hajlamos növényeknél nem tartható fenn egykönnyen, mivel természetes körülmények között magok nem termelődnek.

A természetben a hímsterilitás négy fő típusa figyelhető meg. Mind a négy típus alkalmazható a mesterséges növénynevelési programban, és így biztosíthatjuk, hogy a kultúrnövényeknél, így a kukoricánál, cukorrépánál, olajrepcénél és napraforgónál a hibrid magok előállításánál során keresztsbe beporzás történjen.

Az egyik típusú hímsterilitás a magban kódolt és a feltételezések szerint recesszív allelomorf génként öröklődik. Növénynevelési célból egy recesszív hímsteril szülőnövényt úgy őriznek meg, hogy heterozigóta hím fertilis növényvel keresztezik, amely szintén tartalmazza a recesszív hímsterilitás allelomorf gént, és így az utódok 50%-a recesszív hímsteril növény. A másik 50% hím fertilis növény, ezeket eldobják a keresztezési programban, amely csak akkor végezhető eredményesen, ha a recesszív hímsterilitás allelomorf gén egy szelektálható vagy kimutatható markerrel együtt választódik ki. A 4 727 219 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás a recesszív hímsterilitás hibrid kukorica előállításában történő alkalmazását ismerteti.

A sterilitás második típusa is magban van kódolva, de domináns allelomorf génként öröklődik. A domináns hímsteril növény előnye a recesszív hímsteril növényhez képest, hogy a domináns hímsteril növény hím fertilis növényvel keresztezve fenntartható, amikor is 50%-ban domináns hímsteril utódok képződnek. A domináns, magban hímsteril növény alkalmazhatósága azonban korlátozott, mivel a domináns hímsteril allelomorf gén a legtöbb esetben (azonos genetikai szakaszon belül) nem kapcsolódik szorosan valamely szelektálható vagy kimutatható markerhez.

A hímsterilitás harmadik típusa citoplazmatikusan van kódolva. A legtöbb esetben a citoplazmakód a növény mitokondriális genomjában található, és csak néhány esetben van a kloroplaszt genomon belül. A citoplazmatikusan kódolt hímsterilitás öröklődése nem követi a Mendel-szabályokat, hanem citoplazmafaktoroktól függ. A citoplazmatikusan hímsteril növény és hím fertilis növény kereszteződéséből kapott utódok valamennyien hordozzák a citoplazmatikus hímsteril gént, és ezért sterilek. Ennek következtében az ilyen típusú növények utódai csak akkor rendelkeznek kereskedelmi értékkel, ha az utódok termékét nem vetőmagként, hanem növényként, így dísznövényként vagy cukorrépaként kívánják hasznosítani.

A hímsterilitás negyedik típusa a nukleárisan kódolt hímsterilitás és a citoplazmatikusan kódolt hímsterilitás kombinációja. A hímsterilitást kiváltó sejtmagban előforduló allelomorf gének általában recesszívek, és csak azok a fenotípusosan hímsteril növények, amelyek tartalmazzák a hímsterilitás citoplazma allelomorf génjét, és amelyek a sejtmagbéli allelomorf gén által kiváltott hímsterilitásra homozigóták. Az ilyen növényekben a megfelelő domináns hímsterilitást kiváltó allelomorf gének vagy „termőképesség-helyreállítók” hím fertilis fenotípust eredményeznek. Ennek következtében az ilyen típusú növények hímsteril utódai hím fertilissé

alakíthatók, ha a hímsteril növényeket a termőképesség helyreállítását tartalmazó pollennel porozzuk be. Az ilyen típusú növények utódainak tehát akkor van kereskedelmi jelentősége, ha a termék maga a mag, vagyis kukorica, cirok és napraforgó esetében.

Hibrid magok termelése során általában úgy járnak el, hogy citoplazmatikusan hímsteril növényeket és hím fertilis növényeket ültetnek el és valamilyen úton (például megkülönböztető markerrel) megakadályozzák, hogy a keletkező hibrid magok nem hibrid magokkal keveredjenek. A 3 842 538 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint a hibrid magokat színük alapján választják el a nem hibrid magoktól, ami meglehetősen hosszadalmas eljárás. A 4 351 130 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint a hibrid magoknak nem hibrid magoktól történő elválasztását kiküszöbölik, mivel rövid hímsteril növényeket és magas hím fertilis növényeket alkalmaznak, majd beporzás után a magas hím fertilis növényeket elpusztítják. A 4 658 085, 4 517 763 és a 4 658 084 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint citoplazmatikusan hímsteril növényeket állítanak elő, amelyek herbicidekkel szemben rezisztensek, majd a hím fertilis növényeket beporzás után a herbiciddel elpusztítják. A 4 305 225 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint a hímsteril rizsnövényeket növekedési hormonnal (például giberelinnel) permetezik be, és így biztosítják a virágot hordozó füzérvirágzatnak a rizslevél hüvelyéből történő teljes kinövését, ami növeli a virágoknak hím fertilis növényekről származó virágot fogadó képességét.

Hibrid magok hímsteril növényekből történő ismét előállításainál olyan egyszerű és olcsó módszert keresnek, amely: 1. magas hibridmag-termelékenységet biztosít minden hímsteril növényre, 2. olyan hibridmag-populációt eredményez, amely szinte kizárólag hím fertilis növények virágpórából és hímsteril növények csírasejtjéből származik, és hím fertilis növényekből származó, nem hibrid magoktól lényegében mentes, 3. könnyen felhasználható mind hímsteril, mind hím fertilis növények előállításához, és 4. teljes egészében biztosítja a hím fertilis növényeknek a hímsteril növények beporzása után történő eltávolítását vagy elpusztítását, vagy a hím fertilis növények által előállított, nem hibrid magok elválasztását a hímsteril növények által termelt hibrid magoktól.

A találmány szerinti növényi sejtkben a sejtmaggenomját olyan idegen DNS-szekvenciával, előnyösen idegen kimer DNS-szekvenciával transzformáljuk, amely:

a) olyan hímsteril DNS-t tartalmaz, amely egy első RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely a növény porzószájsejtjében termelődve jelentős mértékben megzavarja a porzószájsejt metabolizmusát, funkcióját és/vagy fejlődését, és

b) a hímsteril DNS mellett olyan első promotert tartalmaz, amely biztosítja a hímsteril DNS-nek szelektíven a növény porzószájsejtjeiben történő direkt kifejezését, és amely első promoter ugyanabban az átírási egységben található, mint az általa szabályozott hímsteril DNS.

A transzformált sejt sejtmaggenomjában az idegen DNS-szekvencia további komponensként, előnyösen a hímsteril DNS-sel azonos genetikai szakaszon belül

c) egy marker DNS-t tartalmaz, amely egy második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely a növény legalább egy specifikus szövetében vagy sejtjében előfordulva biztosítja a növénynek a második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet nem tartalmazó növényektől történő könnyű elválaszthatóságát, és

d) a marker DNS mellett egy második promotert tartalmaz, amely biztosítja a marker DNS-nek a növény legalább egy specifikus szövetben vagy sejtben lévő közvetlen kifejezését, és amely második promotor ugyanabban az átírási egységben található, mint az általa szabályozott marker DNS.

A találmány szerinti idegen kimer DNS-szekvencia egy hímsteril DNS-t és egy első promotert, valamint adott esetben egy marker DNS-t és egy második promotert, valamint adott esetben legalább egy további DNS-t tartalmaz, amely utóbbi egy tranzitpeptidet kódol, amely biztosítja az első fehérjének vagy polipeptidnek vagy a második fehérjének vagy polipeptidnek annak a növényi sejtnek a kloroplasztjába vagy mitokondriumába történő szállítását, amelynek citoplazmájában az idegen kimer DNS-szekvencia kifejeződik.

A találmány értelmében a hímsteril növényt egyetlen növényi sejtből állítjuk elő, ahol a növényi sejt sejtmaggenomjába önmagában ismert módon végzett transzformálással a találmány szerinti idegen DNS-szekvenciát építjük be. Az idegen DNS-szekvencia legalább egy hímsteril DNS-t tartalmaz, amelyhez 5'-végén a szabályozására szolgáló első promotor és 3'-végén megfelelő átírásszabályozó szignál (többek között egy poliadenilezőszignál) kapcsolódik. Ezáltal egy első RNS, fehérje vagy polipeptid termelődik szelektíven a növény porzószálsejtjeiben, amelyek a növényben hímsterilitást váltanak ki. Az idegen DNS-szekvencia további komponensként legalább egy marker DNS-t tartalmaz, amely 5'-végén a szabályozására szolgáló második promotorhoz és 3'-végén megfelelő átírásszabályozó szignálhoz (többek között poliadenilezőszignálhoz) kapcsolódik. A marker DNS előnyösen ugyanazon a genetikai szakaszon belül helyezkedik el, mint a hímsteril DNS, és ezáltal a második RNS, fehérje vagy polipeptid a növény legalább egy specifikus szövetében vagy sejtjében termelődik, és így biztosítja a növénynek a második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet nem tartalmazó növényektől történő könnyű megkülönböztetését és/vagy elválasztását. Ez a megoldás nagy biztonsággal garantálja, hogy mind a hímsteril DNS, mind a marker DNS megjelenjen az utódnövényekben.

A növényi sejtet (előnyösen agrobaktériummal fertőzhető növény sejtjét) a találmány értelmében előnyösen vektorként az idegen DNS-szekvenciát tartalmazó és agrobaktériumban előforduló úgynevezett lefegyverzett Ti-plazmiddal transzformáljuk, vagyis olyan plazmiddal, amelyben egy vagy több rákot okozó gént kiiktattunk vagy inaktívtá tettünk. A transzformáció elvégez-

hető például a 116 718 vagy a 270 822 számú európai szabadalmi leírásban ismertetett módon. Az alkalmazott Ti-plazmid-vektor az idegen DNS-szekvenciát előnyösen a Ti-plazmidhoz tartozó T-DNS határszekvenciái között vagy legalább egy jobb határszekvenciától balra elhelyezkedve tartalmazza. Természetesen a növényi sejt transzformációjához más típusú vektorok is alkalmazhatók a közvetlen géntranszfereljárással (például 223 247 számú európai szabadalmi leírás), a pol-lennel közvetített transzformációval (például 270 356 számú európai szabadalmi leírás, WO 85/01856 számon közrebocsátott nemzetközi szabadalmi bejelentés, 275 069 számú európai szabadalmi leírás), in vitro protoplaszt transzformációval (például 4 684 611 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás), növényi RNS-vírussal közvetített transzformációval (például 067 553 számú európai szabadalmi leírás és 4 407 956 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) és liposzómával közvetített transzformációval (például 4 536 475 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A találmány szerinti, magban hímsteril növény előállításához a növényi sejtet előnyösen olyan legyengített Ti-plazmid-vektorral transzformáljuk, amelyben az idegen DNS-szekvencia mind az első promotor által szabályozott hímsteril DNS-t, mind a második promotor által szabályozott marker DNS-t tartalmazza. A marker DNS a Ti-plazmid-vektoron belül elhelyezkedhet a hímsteril DNS alatt vagy felett, ahol a két DNS előnyösen egymás mellett a Ti-plazmid-vektor határszekvenciái között vagy legalább a jobb határszekvenciától balra helyezkedik el úgy, hogy a növényi sejt sejtmaggenomjába együttesen és teljes egészében átvihetők legyenek. Kivánt esetben eljárhatunk azonban úgy is, hogy a sejtet először hímsteril DNS-t és első promotert tartalmazó idegen DNS-szekvenciával, majd ezt követően a marker DNS-sel és a második promoterral transzformáljuk, ahol a marker DNS és a második promotor a sejtmaggenomon belül ugyanabba a genetikai szakaszba épül be, mint a hímsteril DNS. Ebből a célból alkalmazhatók az idegen DNS-szekvenciával végzett transzformációhoz ismertetett vektorok, előnyösen a legyengített Ti-plazmid-vektor.

A hímsteril DNS kiválasztása nem kritikus. A megfelelő hímsteril DNS önmagában ismert módon kiválasztható és izolálható úgy, hogy kódolja azt az első RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet, amely jelentős mértékben megzavarja azoknak a porzószálsejteknek a szokásos metabolizmusát, funkcióját és/vagy fejlődését, amelyekben a hímsteril DNS kifejeződik, és így előnyösen a porzószálsejtek elpusztulásához vezetnek. A hímsteril DNS-ekre előnyös példaként említhetők azok, amelyek kódolják az RN-ázokat, így az RN-áz T1-et (amely a guanidincsoport utáni kötés hidrolizálásával elbontja az RNS-molekulákat) és a barnázt, valamint a DN-ázokat, így az endonukleázt (például EcoRI), valamint a proteázokat, így a papaint (például a papain-zimogén és a papain aktív fehérjét).

Hímsteril DNS-ként alkalmazhatók továbbá azok, amelyek fitohormonok szintézisét katalizáló enzimeket

kódolnak, ilyen például az izopentenil-transzferáz, amely a citokininbioszintézis első lépését katalizáló enzim és az agrobaktérium T-DNS négyes génje kódolja, valamint az auxin szintézisében részt vevő enzimek, amelyeket az agrobaktérium T-DNS egyes és kettős génjei kódolnak. A hímsteril DNS-ekre további példaként említhetők azok, amelyek glükánázokat, lipázokat, így foszfolipáz A2-t (Verheij és munkatársai: Rev. Biochem. Pharmacol., 91, 92–203, 1981., lipid-peroxidázokat vagy növényisejtfal-inhibitorokat kódolnak. A hímsteril DNS-ekre további példaként említhetők azok, amelyek a növényi sejtre toxikus fehérjéket, így bakteriális toxint (például diftériatoxin B-fragmenst vagy botulint) kódolnak.

A hímsteril DNS-ekre további példaként említhető az olyan antiszenz DNS, amely a növényi porzószájsejtekben egy endogén promotor által szabályozva természetesen átíródó DNS-szállal komplementer DNS-szállal kódol (például 223 399 számú európai szabadalmi leírás). Az ilyen antiszenz DNS a porzószájsejt által természetesen termelt RNS kódoló- és/vagy nem kódoló szakaszához nem kapcsolódó RNS szekvenciába írható be, ami gátolja a természetesen termelődő RNS transzlációját. Az ilyen antiszenz DNS-ekre példaként említhető a TA29 gén antiszenz DNS-e (lásd a 2. példát), amely a TA29 promotor szabályozása alatt a növényi portok tapétumsejtjeiben természetesen kifejeződik.

Az alkalmazható hímsteril DNS-ekre további példaként említhetők azok, amelyek specifikus RNS-enzimet (vagyis úgynevezett ribozimot) kódolnak, amelyek specifikusan hasítanak egy adott mintaszekvenciát (Haseloff és Gerlach: Nature, 334, 585–591, 1988). Ilyen ribozim például a TA29 gén által kódolt RNS-t hasító ribozim.

Az alkalmazható hímsteril DNS-ekre további példaként említhetők azok, amelyek olyan anyagokat kódolnak, amelyek a porzószájsejteket adott betegségekkel szemben érzékennyé teszik, ilyen például a gombás fertőzés. Az ilyen típusú hímsteril DNS olyan növényeknél alkalmazható, amelyekben azok a sejtek, amelyekben a hímsteril DNS nem fejeződik ki, az adott betegségre rezisztensek.

A találmány szerinti idegen DNS-szekvenciával kapcsolatban az idegen kifejezés azt jelenti, hogy az adott szekvencia egy idegen hímsteril DNS-t és/vagy egy idegen első promotert tartalmaz. A DNS-sel, így hímsteril DNS-sel, első promoterral, marker DNS-sel, második promoterral és bármely más DNS-sel kapcsolatban alkalmazott idegen kifejezés azt jelenti, hogy az adott DNS a találmány szerint transzformált növényi sejtben nem tartozik ugyanahhoz a genomkörnyezet-höz, mint az adott DNS eredetűl szolgáló növényi, baktérium-, állati-, gomba- vagy vírussejtben természetesen előforduló DNS. Ez azt jelenti például, hogy az idegen hímsteril DNS vagy marker DNS 1. az eredeti növény sejtmagjának DNS-e, 2. a transzformált növényi sejtre (vagyis a transzformált növényvel azonos genotípusba tartozó növényre) nézve endogén, és 3. a transzformált növényi sejtben található találmány szerinti idegen DNS-szekvencián belül ugyanabban az átírási egységben helyezkedik el, mint a saját endogén

promotere és a 3'-véghez tartozó átírásszabályozó szignál, de 4. a transzformált növényi sejt sejtmaggenomjába más helyen épül be, mint az eredeti növényben, és így a transzformált növényi sejtben más gének veszik körül, mint az eredeti növényben. Az idegen hímsteril vagy marker DNS lehet továbbá például 1. az eredeti növény sejtmagjához tartozó DNS, vagy 2. a transzformált növényi sejtre nézve endogén, de 3. a transzformált növényi sejthez tartozó találmány szerinti idegen kimer DNS-szekvencián belül ugyanabban az átírási egységben helyezkedik el, mint egy különböző, vagyis nem saját, endogén promotor és/vagy 3'-végű átírási szabályozószignál. Az idegen hímsteril vagy marker DNS lehet továbbá például 1. az eredeti növényhez tartozó sejt DNS és 2. a transzformált növényi sejtre nézve endogén, de 3. a transzformált növényi sejthez tartozó idegen kimer DNS-szekvencián belül ugyanabban az átírási egységben helyezkedik el, mint a heterológ promotor és/vagy 3'-végű átírási szabályozószignál. Az idegen hímsteril vagy marker DNS lehet például heterológ a transzformált növényi sejtre nézve, és elhelyezkedhet a transzformált növényi sejthez tartozó találmány szerinti idegen kimer DNS-szekvencián belül ugyanabban az átírási egységben, mint az endogén promotor és/vagy 3'-végű átírási szabályozószignál (például a transzformált növényvel azonos genotípusba tartozó növény sejtmaggenomjából származó szignál). Az idegen hímsteril DNS származhat például a transzformált növényvel azonos genotípusba tartozó növény sejtmaggenomjából és olyan katalitikus enzimet, így proteázt vagy ribonukleázt kódolhat, amely a transzformált növény porzószájsejtjeire nézve endogén, és így az enzim a transzformált porzószájsejtekben termelődve lényegesen megzavarja azok metabolizmusát, funkcióját és/vagy fejlődését. Előnyösen mind a hímsteril DNS, mind a marker DNS heterológ a transzformált növényi sejtre nézve.

A DNS-sel, így hímsteril DNS-sel, első promoterral, marker DNS-sel, második promoterral vagy bármely más DNS-sel kapcsolatban alkalmazott heterológ kifejezés azt jelenti, hogy az adott DNS a transzformált sejtrel azonos genotípusba tartozó növény sejtmaggenomjában természetesen nem fordul elő. A heterológ DNS-re példaként említhető a transzformált növényvel azonos genotípusba tartozó növényből nyert kloroplaszt és mitokondrium DNS, továbbá a transzformált növénytől eltérő genotípusba tartozó növényből származó kloroplaszt, mitokondrium és sejt DNS, állati vagy baktériumsejt magjából származó DNS és gomba vagy vírus genomjához tartozó kromoszomális vagy plazmid DNS.

A találmány szerinti idegen DNS-szekvenciával kapcsolatban alkalmazott kimer kifejezés azt jelenti, hogy a hímsteril DNS-ek közül legalább egy 1. a természetből adódóan nem esik az egyik hímsteril DNS-hez tartozó első promotor szabályozása alá és/vagy 2. a természetből adódóan a marker DNS-ek közül legalább egyiktől eltérő genetikai szakaszban található. A találmány szerinti idegen kimer DNS-szekvenciákra példaként említhető a növényi eredetű első promotor szabá-

lyozása alá eső, bakteriális eredetű hímsteril DNS, és növényi eredetű első promoter szabályozása alá eső növényi eredetű hímsteril DNS, amely a bakteriális eredetű marker DNS-sel azonos genetikai szakaszon belül helyezkedik el.

Mivel a hímsteril DNS szelektíven a növény porzószálejtjeiben fejeződik ki, előnyös, ha az első promoter, amely az idegen DNS-szekvenciában a hímsteril DNS-t szabályozza, olyan promoter, amely képes a növény porzószálejtjeiben szelektíven történő közvetlen génkifejezésre. (Porzószal alatt a növénynek azt a szervét értjük, amely a hím csírasejtet termeli, és magában foglalja a portokot és a szálát.) Az ilyen porzószal-specifikus promoter lehet endogén vagy exogén promoter, és származhat a növényi sejt sejtmaggenomjából, mitokondriális genomjából vagy kloroplasztgenomjából. Minden esetben, az első promoter idegen a transzformált növényi sejt sejtmaggenomjára nézve. Előnyös, ha az első promoter a hímsteril DNS-t csak a portokban, pollenben vagy szálejtkekben, elsősorban a tapétum vagy portok epidermális sejtekben fejezi ki. Az első promoter önmagában ismert módon választható ki és izolálható abból a növényfajból, amelyet hímsterillé kívánunk alakítani, és az első promoter úgy szabályozza a hímsteril DNS porzószálejtéken belüli szelektív kifejeződését, hogy az elpusztítsa a porzószalát és megszüntesse a növényi fertilis hím csírasejtet termelő képességét. Az első promotert előnyösen úgy választjuk ki és izoláljuk, hogy hatásosan akadályozza meg a hímsteril DNS-nek olyan növényi részekben történő kifejeződését, amelyek nem vesznek részt a fertilis pollen termelésében, elsősorban a növény női szervezeteiben. Megfelelő endogén, porzószal-specifikus első promoter a hímsterillé alakítandó növényben azonosítható és izolálható például úgy, hogy

1. a növényben csak a porzószal, előnyösen a portok, pollen vagy szál fejlődése során előforduló mRNS-t keressük,

2. a porzószal-specifikus mRNS-t izoláljuk,

3. a porzószal-specifikus mRNS-ből cDNS-t állítunk elő,

4. a cDNS-t mintaként használva meghatározzuk a növény genomjának azon szakaszait, amelyet a porzószal-specifikus mRNS-t kódoló DNS-t tartalmaznak, majd

5. meghatározzuk a növény genomjának azon szakaszát, amely a porzószal-specifikus mRNS-t kódoló DNS-től számítva felfelé (vagyis 5'-irányban) helyezkedik el, és amely tartalmazza a DNS promoterét.

Az ilyen első promoterekre példaként említhető a TA29 promoter, a TA26 promoter és a TA13 promoter, amelyek dohányból izolált tapétumspecifikus promoterek. Más növényfajtákból is izolálhatunk tapétumspecifikus első promotert, ha a fent ismertetett eljárás 4. lépésében mintaként a TA29, TA26 vagy TA13 gént használjuk. Hibridizálási körülmények között az ilyen minta a másik növényfaj genomjából származó DNS-szekvenciák elegendően a tapétumspecifikus mRNS-t kódoló DNS-sel hibridizál (Maniatis és munkatársai: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.). Ezután az 5.

lépésben más tapétumspecifikus első promoter is azonosítható.

Ha a találmány szerinti idegen DNS-szekvenciákban több mint egy hímsteril DNS található, valamennyi hímsteril DNS az egyetlen első promoter szabályozása alá eshet, de előnyösebb, ha minden egyes hímsteril DNS-nek saját külön első promotere van. Több hímsteril DNS jelenléte esetében az általuk kódolt első RNS, polipeptid vagy fehérje lehet azonos vagy különböző. Így például, ha a hímsteril DNS egy RN-áz, így RN-áz T1-et kódol, akkor előnyös, ha a hímsteril DNS és a hozzá tartozó első promoter legalább három, előnyösen négy-hat másolatban fordul elő az idegen DNS-szekvenciában. Mindenesetre előnyös, ha valamennyi hímsteril DNS és a hozzá tartozó első promoter egymáshoz képest szomszédos helyzetben fordul elő az idegen DNS-szekvenciában és annak növényi sejtbe történő transzformálásához alkalmazott bármely vektorban.

A marker DNS kiválasztása szintén nem kritikus. Megfelelő marker DNS kiválasztható és izolálható önmagában ismert módon úgy, hogy az egy olyan második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódoljon, amely lehetővé teszi, hogy a marker DNS-t kifejező növényeket könnyen megkülönböztethessük és elválasszassuk a második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet ki nem fejező növényektől. A marker DNS által kódolt fehérjékre példaként említhetők azok, amelyek megkülönböztethető szint eredményeznek a növényi sejtben, ilyen például az A1 gén, amely dihidroquercetin-4-reduktázt kódol (Meyer és munkatársai: *Nature*, 330, 677-678, 1987), a glükoronidázgén (Jefferson és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8447, 1988), valamint azok, amelyek különleges morfológiajellemzőt kölcsönöznek a növénynek, ilyen például a törpenövés vagy a különleges levélalak. A marker DNS egyéb példái eredményezhetnek stressztűrő képességet, ilyen például a szuperoxid-dizmutáz-gén (88/402222.9 számú európai szabadalmi bejelentés, amely 0 359 617-es számon lett közzétéve) vagy betegségezisztencia, ilyen például az a gén, amely a *Bacillus thuringiensis* endotoxint kódolja, és rovarrezisztenciát eredményez (01 193 259-es számú európai közzétételi irat, valamint az a gén, amely baktériumrezisztenciát kiváltó bakteriális peptidet kódol (0 289 828 számú európai közzétételi irat).

Az előnyös marker DNS által kódolt második fehérje vagy polipeptid gátolja vagy semlegesíti a herbicidek hatását, ilyen például az sfr gén, az sfrv gén, amelyek által kódolt enzimek rezisztenciát váltanak ki a glutamin-szintetáz-inhibitorokkal szemben, ilyen például a Biolaphos és a foszfino-tricin (0 242 246-os számú európai közzétételi irat), valamint azok a gének, amelyek módosított célenzimeket kódolnak bizonyos herbicidekre nézve, amelyeknek kisebb az affinitása az adott herbicidre, mint a természetesen előállított endogén enzimeknek, ilyen például a módosított glutamin-szintetáz a foszfino-tricinre nézve (240 792 számú európai közrebecsátási irat), és a módosított 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát-szintetáz a glifozátra nézve (218 571 számú európai közrebecsátási irat).

A marker DNS-t szabályozó második promoter szintén önmagában ismert módon kiválasztható és izolálható, amikor is a marker DNS vagy szelektíven egy vagy több speciális szövetben vagy sejtben fejeződik ki, vagy az egész növényben a marker DNS által kódolt második RNS, fehérje vagy polipeptid természetétől függően. Így például, ha a marker DNS herbicidrezisztenciát kódol, előnyös, ha a marker DNS a növény valamennyi sejtjében kifejeződik, és ehhez erős jellegű második promotert, így 35S promotert (Odell és munkatársai: *Nature*, 313, 810–812, 1985), 35S'3 promoter (Hull és Howell: *Virology*, 86, 482–493, 1987), a Ti-plazmidban található nopalinszintetáz-gén promoterét (PNOS) (Herrera–Estrella: *Nature*, 303, 209–213, 1983) vagy oktopin-szintetáz-gén promoterét (POCS) (De Greve és munkatársai: *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499–511, 1982) alkalmazzuk. Ha a marker DNS által kódolt fehérje betegségrezisztenciát vált ki, akkor előnyös lehet, ha a marker DNS szelektíven a beteg szövetben fejeződik ki, amikor is például TR promotert, így Ti-plazmidbeli TR1' vagy TR2' promotert (Velten és munkatársai: *EMBO J.* 3, 2723–2730, 1984) alkalmazunk. Ha a marker DNS herbicid rezisztenciát kódol, akkor előnyös lehet, ha a marker DNS szelektíven a zöld szövetekben fejeződik ki, amikor is például a Rubisco kis alegységét kódoló gének megfelelő promotert (0 242 246-os számú európai közzétételi irat) alkalmazunk. Ha a marker DNS pigmentet kódol, akkor előnyös lehet, ha a marker DNS speciális sejtekben, a virágszirom, a levél vagy a mag sejtjeiben, előnyösen a magbevonat külső rétegében fejeződik ki.

A hímsterilitást és a nem transzformált növénytől történő könnyű megkülönböztethetőséget biztosító szövetspecifikus második promoter önmagában ismert módon azonosítható és izolálható:

1. olyan mRNS-t keresünk, amely a növényben csak megfelelő szövetek, így virágszirom, levél vagy mag fejlődése során van jelen,

2. a szövetspecifikus mRNS-t izoláljuk,

3. a szövetspecifikus mRNS alapján cDNS-t állítunk elő,

4. a cDNS-t mintaként alkalmazva meghatározzuk a növény genomjának azon szakaszát, amely tartalmazza a szövetspecifikus mRNS-t kódoló DNS-t, majd

5. azonosítjuk a növény genomjának azon szakaszát, amely a szövetspecifikus mRNS-t kódoló DNS felett helyezkedik el, és tartalmazza az adott DNS-hez tartozó promotert.

Ha a találmány szerinti idegen DNS-szekvenciában több mint egy marker DNS fordul elő, akkor valamennyit szabályozhatja ugyanaz a második promoter, de előnyösebb, ha minden marker DNS-hez saját külön második promoter tartozik. Még előnyösebb, ha minden marker DNS-hez saját külön második promoter tartozik, és különböző második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódolnak, és így a transzformált növényben egymástól eltérő, megkülönböztethető jellemzőt váltanak ki. Mindenesetre előnyös, ha az egy vagy több marker DNS és a hozzá tartozó egy vagy több második promoter egymáshoz képest és az egy vagy több hímsteril DNS-hez ké-

pest szomszédosan helyezkedik el a találmány szerinti idegen DNS-szekvenciában és annak a növényi sejtben történő transzformálásához alkalmazott bármely vektorban.

5 Általában előnyös, ha a hímsteril DNS által kódolt első RNS, fehérje vagy polipeptid hatását a citoplazmában vagy a sejtmagban kifejtve bekapcsolódik a porzószálszejt metabolizmusába, funkciójába és/vagy fejlődésébe. Ha szükség van arra, hogy az első fehérje vagy polipeptid és/vagy a második fehérje vagy polipeptid a citoplazmából a transzformált növény sejtjeinek kloroplasztjába vagy mitokondriumba kerüljön, akkor az idegen DNS-szekvencia további idegen DNS-t tartalmazhat, amely egy tranzitpeptidet kódol. A további idegen DNS a hímsteril DNS és az első promoter között helyezkedik el, ha az első fehérjét vagy polipeptidet kell elszállítani, és a marker DNS és a második promoter között helyezkedik el, ha a második fehérjét vagy polipeptidet kell elszállítani. A tranzitpeptid kifejezés olyan polipeptidfragmenst jelöl, amely normálisan egy kloroplaszt, vagy mitokondriális fehérjéhez vagy fehérjealegységhez kapcsolódik, és a fehérjében a sejtmag DNS-e által kódolva prekurzorfehérjeként termelődik. A tranzitpeptid felelős a sejtmag által kódolt kloroplaszt- vagy mitokondriális fehérjének vagy alegységnek a kloroplasztba vagy a mitokondriumba történő szállításáért és a folyamat során a tranzitpeptid elkülönül vagy proteolitikusan eltávozik a kloroplaszt- vagy mitokondriális fehérjétől vagy alegységtől. A találmány szerinti idegen DNS-szekvenciában egy vagy több további idegen DNS fordulhat elő, attól függően, hogy egy vagy több első vagy második fehérjét vagy polipeptidet kell elszállítani (0 189 707-es számú európai közzétételi irat, és a 0 319 353-as számú közzétett) 88/402222.9 számú európai szabadalmi bejelentések, valamint Van den Broeck és munkatársai: *Nature* 313, 358–363, 1985, Schatz: *Eur. J. of Bioch.* 165, 1–6, 1987, Boutry és munkatársai: *Nature*, 328, 340–342, 1987). A kloroplasztba történő szállításra alkalmas tranzitpeptidre példaként említhető az RUBP karboxiláz-enzim kis alegységének tranzitpeptide (0 189 707-es számú európai közzétételi irat) és a mitokondriumba szállító tranzitpeptidre példaként említhető az Mn-szuperoxid-dizmutáz-enzim tranzitpeptide (lásd a 16. példát).

45 A találmány szerinti idegen DNS-szekvenciában 3 átírásszabályozó szignál választható ki azok között, amelyek biztosítják az mRNS növényi sejtben történő korrekt átírását, terminálását és poliadenilezését. Az átírásszabályozó szignál lehet természetes eredetű, és származhat az átírandó génből, de lehet idegen vagy heterológ is. A heterológ átírásszabályozó szignálra példaként említhető az oktopin-szintetáz-gén (Gielen és munkatársai: *EMBO J.*, 3, 835–845, 1984) és a T-DNS gén 7 (Velten és Schell: *Nucleic Acids Research*, 13, 6981–6998, 1985) átírásszabályozó szignálja.

50 Azok a növényi sejttenyészetek, így portoksejttenyészetek, amelyek olyan találmány szerinti, idegen DNS-szekvenciát tartalmaznak, amelyben az első promoter hímsteril DNS-szekvencia kifejezését a pollen fejlődésének adott szakaszában, előnyösen a miózis

után biztosítja, felhasználhatók homozigóta domináns hímsteril növények előállítására (E. B. Swanson, M. P. Coumans, S. C. Wu, T. L. Barby és W. D. Beversdorf: Plant Cell Reports, 6, 94–97, 1987).

A hibrid növények előállítására alkalmas hibrid magok találmány szerinti előállítása során kétféle módon járhatunk el. Az egyik eljárásnál egy magban hímsteril növényt, amely legalább egy marker DNS-t tartalmaz, hím fertilis növényvel keresztezünk, amely utóbbi marker DNS-t nem tartalmaz. Mind a hímsteril növényt, mind a hím fertilis növényt egymáshoz közel, külön sorokba ültetjük. A másik eljárás során egy magban hímsteril növényt, amely legalább két különböző marker DNS-t tartalmaz, olyan hím fertilis növényvel keresztezünk, amely a két különböző marker DNS közül homozigóta formában csak egyet tartalmaz. Mind a hímsteril növényt, mind a hím fertilis növényt lényegében véletlenszerű populációban termesztjük, és így növeljük a keresztezés beporzás esélyét anélkül, hogy az ültetéshez pontos mintát alkalmaznánk. A hím fertilis növényt ezután a populációból könnyen eltávolíthatjuk, amikor is a nem szokásos marker DNS által kódolt megkülönböztető jelet alkalmazzuk, amely a hím fertilis növényben nincs jelen. Az eljárás során előnyösen olyan hím steril növényt alkalmazunk, amelyben a nem közönséges marker DNS-t egy alkotó jellegű promotor szabályozza, és a marker DNS olyan fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely a hímsteril növényben különböző herbicidekkel szemben rezisztenciát vált ki. A hím fertilis növényt a keresztezés beporzás után a szokásos herbicidekkel elpusztítjuk.

A találmány szerinti növények, amelyekbe transzformáció segítségével stabilan egy hímsteril DNS-t vagy egy hímsteril DNS-t és egy herbicid rezisztenciát kódoló marker DNS-t építünk be, amely generációkon át domináns allelomorf gén formájában öröklődik, a jelenleg ismert citoplazmatikusan hímsteril növényekkel szemben a növénynevelés és hibrid kultúrnövények előállítása szempontjából egy sor előnnyel rendelkezik:

1. Keresztezés beporzásos növényeknél a nevelési stratégia jelentős mértékben leegyszerűsödik, mivel a kereskedelmileg forgalmazható hibrid magok előállításához a hím fertilis növénybe nem kell helyreállító gént bevinni. Egy heterozigóta magban hímsteril szülővonal egy másik hím fertilis szülővonalal keresztezve 50% hímsteril hibrid utódot és 50% hím fertilis hibrid utódot eredményez, amelynek következtében a kultúrnövény elegendő pollent termel ahhoz, hogy megfelelő kitermeléssel kapjunk magokat. Az ilyen kultúrnövényekre példaként említhető a kukorica és az olajrepece.

2. A termesztési stratégia azoknál a növényeknél is leegyszerűsödik, amelyeknél nem a mag képezi a kereskedelmi terméket, itt sincs szükség helyreállító gének a hím fertilis szülővonalba történő bevezetésére. Ezeknél a kultúrnövényeknél nincs jelentősége annak, hogy a kereskedelmileg forgalmazott hibrid magok 50%-a hímsteril. Az ilyen növényekre példaként említhető a cukorrépa és a lucerna.

3. A találmány lehetővé teszi, hogy a meglévő beltenyésztett vonalokból egy művelettel magban hímsteril

vonalakat és fenntartó vonalakat állítsunk elő visszakeresztelés nélkül. Ez legalább 6–8 generációval csökkentheti a tenyésztés kezdete és a kereskedelmi forgalmazás közötti időt. Hímsteril DNS-t tartalmazó és kifejező szülőnövényből kiindulva a hibrid növények előállításának stratégiája lehet például:

- 5 1. beltenyésztett vonalak keresztezésével teszthibrideket állítunk elő és vizsgáljuk a kombinációs készséget és a szelektált jellemzőket (2 év),
- 10 2. a szelektált magban hímsteril hibridekből a találmány szerinti eljárással egy szülővonalat állítunk elő (1 év),
- 15 3. a kapott magban hímsteril szülőnövényt (továbbiakban AS) és annak fenntartó vonalát (továbbiakban A), valamint a beporzó hím fertilis szülőnövényt (továbbiakban B) elszaporítjuk (3 év), és ugyanebben a periódusban elvégezzük a kiválasztott hibrid hivatalos kísérleti termesztését (3 év),
- 20 4. a megfelelő hibrid magokat előállítjuk és kereskedelmi forgalomba hozzuk (1 év).

4. Ha a magban a hímsterilitást herbicidrezisztenciát kódoló marker DNS-sel kombináljuk, akkor tetszőleges kombinációkban kettő-, három- és négyutas hibrideket állíthatunk elő. Tapasztalataink szerint elegendő, ha a hímsteril DNS-t és vele szomszédosan a marker DNS-t bevezetjük egy olyan növény sejtmaggenomjába, amelyet kettő- vagy háromutas hibridek előállításánál az egyik nagyszülő beltenyésztett vonalként alkalmazunk, és két olyan növény sejtmaggenomjába, amelyeket

- 30 30 négyutas hibridek előállításánál két nagyszülővonalaként alkalmazunk. Valamennyi beltenyésztett vonal fenntartható például az alábbi két keresztezéssel, ahol SH a hímsterilitás (S) és a herbicidrezisztencia (H) domináns allelomorf génje és sh a hímsterilitás (s) és a herbicid érzékenység (h) recesszív allelomorf génje:
- 35 a) SH/sh × sh/sh, amely 50% SH és 50% sh utódot eredményez és a H által rezisztenciát biztosító herbiciddel beporozva 100% steril magot eredményez,
- b) sh/sh × sh/sh 100%-ban fertilis utódot eredményez.

5. A tenyésztő számára biztosítja a hímsteril rendszerbe bevitt marker DNS védelmét, mivel a konkurens csak nagy nehézséggel tudja a marker DNS-t saját beltenyésztett vonalába bevezetni.

A találmány szerinti eljárás bemutatására két kultúrnövény vonatkozásában az alábbi termesztési vázlatot adjuk meg:

1. számú vázlat: Egymás mellett hímsteril DNS-t és herbicidrezisztenciát kódoló marker DNS-t tartalmazó növény termesztése

- 50 1A) Az AS hímsteril vonal fenntartása:
 $A^{SH/sh}$ vonal × $A^{sh/sh}$ vonal, amelynek eredménye
 50% $A^{SH/sh}$ (fenotípus: hímsteril herbicidrezisztens)
 50% $A^{sh/sh}$ (fenotípus: hím fertilis herbicidérzékeny)

- 55 1B) Hibrid mag előállítása:
 a) $B^{sh/sh}$ magok (hím növény) elültetése és a kapott magok 1A) szerinti keresztezése, ahol az $A^{SH/sh}$ és $A^{sh/sh}$ (női növény) növényeket külön sorokba ültetjük.

- 60 b) Az $A^{sh/sh}$ genotípust kiiktatjuk úgy, hogy a női sorokat herbiciddel permetezzük.

- c) Keresztbe beporzás: $A^{SH/sh} \times B^{sh/sh}$ és $B^{sh/sh} \times B^{sh/sh}$, amelynek során a női sorokban 50% $AB^{SH/sh-t}$ (fenotípus: hibrid, hímsteril, herbicidrezisztens) és 50% $AB^{sh/sh-t}$ (fenotípus: hibrid, hím fertilis, herbicidérzékeny) kapunk, míg a hím sorokban 100% $B^{sh/sh-t}$ kapunk.
- d) A $B^{sh/sh}$ genotípust a hím sorokban herbiciddel történő bepermetezéssel vagy mechanikai úton kiiktatjuk.
- e) A c) pont alatt keresztbe beporzott női sorok hibrid magjait betakarítjuk, ezek képezik a kereskedelmi forgalomba hozható magot.
2. számú vázlat: Egymás mellett hímsteril DNS-t és két különböző herbicidrezisztenciát kódoló marker DNS-t (H1 és H2. tartalmazó növény termesztése
- 2A) Az A^S hímsteril vonal fenntartása:
 $A^S: A^{SH1H2/sh1h2} \times A^{sh1h2/sh1h2}$, amelynek eredménye 50% $A^{SH1H2/sh1h2}$ (fenotípus: hímsteril, kettős herbicidrezisztens) és 50% $A^{sh1h2/sh1h2}$ (fenotípus: hím fertilis, mindkét herbicidre érzékeny)
- 2B) A B vonal fenntartó beporzása:
 $B^{sh1H2/sh1H2} \times B^{sh1H2/sh1H2}$, amelynek eredménye 100% $B^{sh1H2/sh1H2}$ (fenotípus: hím fertilis, 1 herbicidre érzékeny és 2 herbicidre rezisztens)
- 2C) Hibrid magok előállítása:
- Véletlenszerűen elültetjük a 2A) és 2B) pont szerint kapott magokat.
 - Az $A^{sh1h2/sh1h2}$ genotípust 2 herbiciddel bepermetezve kiiktatjuk.
 - Keresztbe beporzást hajtunk végre:
 $A^{SH1H2/sh1h2} \times B^{sh1h2/sh1H2}$, amelynek eredménye 50% $AB^{SH1H2/sh1H2}$ és 50% $AB^{sh1h2/sh1H2}$ valamint önbeporzást hajtunk végre:
 $B^{sh1H2/sh1H2} \times B^{sh1H2/sh1H2}$, amelynek eredménye 100% $B^{sh1H2/sh1H2}$.
 - A B szülővonalból önbeporzással kapott $B^{sh1H2/sh1H2}$ genotípust 1 herbiciddel bepermetezve kiiktatjuk.
 - A c) pont szerinti keresztbe beporzással kapott $A^{SH1H2/sh1H2}$ növények hibrid magjait betakarítjuk.
- A leíráshoz a következő ábrákat csatoljuk:
1. ábra az 1. példa szerinti pTA29S3-ban lévő TA29 cDNS és ennek ClaI fragmensének hasítási térképe.
 2. ábra a 2. példa szerinti TA29 gén PstI fragmensének cDNS-szekvenciája.
 - 3A. ábra a TA29 gén DNS-szekvenciája és aminosavszekvenciája a ClaI helytől a HindIII helyig. A szekvenciák felett megjelöltük a fontos hasítási helyeket, míg a szekvenciák alatt megadtuk a kódolt aminosavszekvenciát.
- További jelölések:
- 1446–1452 nukleotid (nt) között: TATA box (csillagok)
 - 1477 nt-nél: a TA29 mRNS átírási iniciálóhelye (csillag),
 - 1514–1537 nt között: a 2. példa szerinti szintetikus oligomer 3–5. szekvenciája,
 - 1940–2296 nt között (nyilak): a TA29 cDNS ki-egyesített szekvenciája.
- A 3B. ábra a TA13 cDNS (felső vonal) és a TA29 cDNS (alsó vonal) felsorolása (lásd a 4. példát). A homológ nukleotidokat vízszintes vonal jelzi.
- A 3C. ábra a TA26 cDNS-szekvenciája (lásd a 4. példát), ORF aláhúzva.
- A 4A. példa a 3. példa szerinti pMB2 vektor vázlatos előállítására.
- A 4B. ábra a 3. példa szerinti pMB3 vektor térképe. Az 5. ábra az 5. példa szerinti pTTM3 vektor térképe. A 6. ábra a 7. példa szerinti pTTM4 vektor térképe. A 7A. ábra a 9. példa szerinti pTTM6 vektor térképe. A 7B. ábra a 11. példa szerinti pTTM6A⁻ vektor térképe.
- A 8. ábra a 12. példa szerinti pTTM8 vektor térképe. A 9A. ábra a 14. példa szerinti pTVEP1 vektor térképe.
- A 9B. ábra a 14. példa szerinti pTVEP2 vektor térképe.
- A 10A. ábra a 16. példa szerinti pTVEP63 vektor térképe.
- A 10B. ábra a 16. példa szerinti pTVEP62 vektor térképe.
- A 11. ábra normál dohánynövény virágjának és a 9. példa szerinti hímsteril DNS-sel transzformált dohánynövény virágjának fényképe.
- A 12. ábra normál dohánynövényportok ferde metszetének és a 9. példa szerinti hímsteril DNS-sel transzformált dohánynövényportok ferde metszetének fényképe (250-szeres nagyítás).
- A találmány szerinti eljárást közelebbről az alábbi példákkal világítjuk meg anélkül, hogy az oltalmi kör a példákra korlátozódna. A példákban ellenkező értelmű megjelölés hiányában valamennyi művelet rekombinációs DNS-sel Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 előírásai szerint végeztük. A példákban alkalmazott és alább felsorolt plazmidokat és vektorokat a Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSM) gyűjteményben a Budapesti Szerződés előírásai szerint helyeztük letétbe:
- | Plazmid vagy vektor | DSM-szám | Dátum |
|---------------------|----------|-------------------|
| pMB3 | 4470 | 1988. március 21. |
| pGSC1600 | 4467 | 1988. március 21. |
| pGCC1700 | 4469 | 1988. március 21. |
| pGV2260 | 2799 | 1983. december |
| pGSC1701A | 4286 | 1987. október 22. |
| pTTM4 | 4471 | 1988. március 21. |
| pMAC5–8 | 4566 | 1988. április 25. |
| pTTM6 | 4468 | 1988. március 21. |
1. példa
Portokspecifikus gén (TA29 gén) szubklónozása
Robert Goldberg professzor (University of California, Los Angeles, USA) a rendelkezésünkre bocsátott

egy *Nicotiana tabacum* portokspecifikus cDNS-t (TA29 cDNS), amely PstI fragmensként GC farkazással pBR329-be (Covarrubias és Bolivar: Gene 17, 79, 1982. van klónozva, valamint a megfelelő genom klónt („lambda TA29”), amely egy *N. tabacum* „Samsun” genomtárból mintaként TA29 cDNS-t alkalmazva izoláltak és a cH32 lambda fág vektor (Loenen és Blattner: Gene 26, 171, 1983. EcoRI helyére építettek be. A TA29 cDNS 365 bázispár hosszúságú ($\pm 0,4$ kb). A TA29 cDNS-t az *N. tabacum* portokjából származó poli A⁺ mRNS 0,24%-át kitevő 1100 nukleotid hosszúságú tapétum specifikus mRNS-sel hibridizáltuk. Mint az 1. ábra mutatja, a lambda TA29 két EcoRI fragmenst tartalmaz, a teljes beépítés mérete 13,2 kb.

Mint az 1. ábrán látható, a lambda TA29-ből származó és a TA29 gént tartalmazó belső 7,5 kb ClaI fragmenst pLK31-be (Botterman és Zabeau: DNA, 6, 6, 1987) szubklónoztuk, amely a pTA29S3 plazmidot eredményezi. A lambda TA29 EcoRI/ClaI/HindIII/HindIII-EcoRI kombinációval és ClaI-EcoRI kombinációval emésztett és TA29 cDNS-sel szemben hibridizált nitro-cellulóz-kötésű fragmensei igazolják a TA29 cDNS-sel homológ szekvencia jelenlétét.

2. példa

A pTA29S3-ből származó TA29 cDNS és homológ szekvenciái nukleotidszekvenciájának meghatározása, a TA29 gén térképezése és annak promotere

A pBR329-ben található TA29 cDNS PstI beépített szakaszát teljes egészében szekvenálták (Maxam és Gilbert: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560, 1977). A cDNS-szekvenciát a 2. ábra mutatja. Mint az ábrából látható, a teljes cDNS-szekvenciában egy nyitott leolvasókeret található (az ábrán jelölve).

A pTA29S3-ban található ClaI beépített szakasz szekvenciáját meghatároztuk a ClaI helytől a HindIII helyig (3261 bázispárhossz). A TA29 cDNS-szekvencia és a pTA29S3 szekvencia összehasonlításából látható, hogy a pTA29S3-ban található egy olyan szakasz, amely teljesen homológ a TA29 cDNS-szekvenciájával.

A pTA29S3-ban található TA29 gén szekvenciáját a 3A. ábra mutatja. A TA29 cDNS-szekvenciájával azonos szakaszt a 3A. ábrán a nyilak között találjuk. A megfelelő aminosavszekvenciában feltehető nyílt leolvasókeret azonosítható. Ez arra utal, hogy a TA29 gén 321 aminosavból álló fehérjét kódol, és a kódolászakaszban nincsenek intronok. A nyílt leolvasókeret hossza 964 (+ vezető) nukleotid, amely egyenlő annak az átírásnak a méretével, amely megtalálható fiatal (12–20 mm hosszú) dohányvirágrügyből izolált portokból előállított dohányportok-mRNS-ben, de nincs jelen a levélből és öreg virágból (a rügy kinyílt és a virágszirmok megjelentek) izolált mRNS-ben. A fenti mRNS mérete mintegy 1100 nukleotid.

Két ATG kód található, az egyik az 1527. nukleotidnál, a másik az 1560. nukleotidnál, amelyek a nyílt leolvasókeret kezdőkódjaként működhetnek, és amelyek 33 nukleotid távolságban helyezkednek el. Egy TATA együttműködés-szekvencia található az 1446. nukleotidnál az első ATG kódtól 5'-irányban 81 nukleotid tá-

volságban (a 3. ábrán csillagokkal jelölve). Annak igazolására, hogy a TATA szakasz a TA29 gén promotere részét képezi, meghatároztuk a TA29 mRNS 5'-végét. Ezt primer meghosszabbítással (McKnight és munkatársai: Cell 25, 385, 1981. végeztük. Ebből a célból egy 24 nukleotidból álló oligomert, amelynek szekvenciája

5' GGA GCT ACC ATT TTA GCT AAT TTC 3'

használtunk, mivel az komplementer a TA29 gén 1514–1537 nukleotidja közötti szakaszával.

Ezt az oligonukleotidot ³²P-vel jelöltük az 5'-végen. Portok-mRNS-sel végzett hibridizálás után az oligonukleotidot reverz transzkriptázzal meghosszabbítottuk. A kapott meghosszabbított oligonukleotidot szekvenálógélen analizáltuk egy szekvenálólétra mellett, és így meghatároztuk a pontos méretet. A fragmens 61 nukleotidból áll. Ez arra utal, hogy a TA29 mRNS átírási kezdete az 1477. nukleotidra esik (a 3. ábrán csillaggal jelölve). A TA29 gén tehát egy TATA szakasszal rendelkezik az átírás kezdeti helyétől számítva felfelé a 31. nukleotidnál. Az mRNS egy 51 nukleotid hosszúságú vezetőszekvenciát tartalmaz az 1477–1527 nukleotid között, egy 964 nukleotidból álló kódolászakaszt tartalmaz az 1527–2491 nukleotid között és egy mintegy 100 nukleotid hosszúságú 3' nem kódoló szakaszt tartalmaz a 2492–2590 nukleotid között. A jelenleg ismert növényi gének mintegy 92%-ához (Joshin: Nucleic Acids Research, 15 (16), 6643, 1987) hasonlóan itt is feltehető, hogy az mRNS első AUG kódja biztosítja a transláció kezdetét. A TA29 promotor tehát a ClaI restrikciós hely és az 1477. nukleotid között helyezkedik el.

3. példa

TA29 génből származó promoterszakasz (PTA29) előállítás

A 4. ábrán bemutatott módon olyan kimer DNS-szekvenciát állítunk elő, amely 5' szabályozószakaszt és egy promotert tartalmaz, amely a TA29 génen belül azonos átírási egységbe tartozik az általa szabályozott első heterológ hímsteril DNS-sel. Ebből a célból a pTA29S3-ből származó 2,5 kb ClaI/AccI fragmenst a pMAC5-8 (0319353-as számú európai közzétételi irat) polilinker AccI helyére szubklónozzuk. Így pMB2 vektort kapunk, amely felhasználható a helyspecifikus mutációhoz szükséges egyszálú DNS előállítására.

Ezután az első ATG kódot körülvevő AAAATGGTA szekvenciát ACCATGGTA szekvenciára módosítjuk úgy, hogy két adeninmaradékot citozinmaradéokra cserélünk. Ez a mutáció CCATGG szekvenciát eredményez, ami az NcoI restrikciós enzim felismerőhelye. A pMB2-n belül ezt a helyspecifikus mutációt 24 nukleotidból álló és alábbi szekvenciájú szintetikus oligonukleotid felhasználásával végezzük:

3' GTT TAA TCG ATG GTA CCA TCG AGG 5'.

A kapott pMB3 plazmidot, amely tartalmazza az újonnan előállított NcoI helyet, a 4B. ábra mutatja. Az NcoI helyet körülvevő pontos nukleotidszekvenciát meghatározva megállapíthatjuk, hogy az a TA29 gén 5'-szekvenciájától csak az AA-CC helyettesítéssel különbözik, amely előállította az NcoI helyet. Az 1507

nukleotid hosszúságú ClaI-NcoI fragmens a PTA29 jelet kapja.

4. példa

Más porzósál-specifikus mRNS-ből előállított cDNS-klónok meghatározása

Annak bemutatására, hogy más portokspecifikus mRNS is a TA29 génnel azonos módon alkalmazható cDNS klónok izolálására, Goldberg professzortól két további *N. tabacum* portokspecifikus cDNS-t (TA13 cDNS és TA26 cDNS) szereztünk be.

A TA13 cDNS 1100 bp nagyságú klón, amely két darab, mintegy 1100 és 1200 nukleotid hosszúságú mRNS-sel hibridizálódik, amelyek a tapétumsejtekre specifikusak és a portok fejlődésének nagyon korai szakaszában fordulnak elő. A TA13 cDNS-t a 2. példában leírt módon szekvenáltuk és összehasonlítottuk a TA29 cDNS-szekvenciájával. Az összehasonlításból adódik, hogy a TA13 cDNS és a TA29 cDNS 92%-os homológiát mutat, és az ORF nagyon sok glicint tartalmaz.

A TA26 cDNS-t poli-G/C farkazással PstI beépített szakaszként pBR329-be vittük be. Ez egy olyan 519 bp klón, amely egy 580 nukleotidból álló dohány mRNS-sel hibridizálódik, amely mRNS specifikus a tapétumsejtekre, és a portok fejlődésének egy bizonyos szakaszában fordul elő. A teljes TA26 cDNS-t a 2. példában megadott módon szekvenáltuk és a TA29 cDNS-szekvenciájával összehasonlítva megállapítottuk, hogy homológiát nem mutat. A TA26 cDNS-szekvenciáját a 3C. ábra mutatja.

5. példa

PTA29-et és egy glükuronidázgént tartalmazó kimer DNS-szekvencia előállítás

Az 5. ábra szerinti pTTM3 plazmidot az alábbi közismert DNS-fragmensekből állítottuk össze:

1. pGSC1600-ből származó és T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens,

2. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amely egy kereten belül béta-glükuronidáz kódoló *E. coli* gént tartalmazó pMB3 NcoI/EcoRI fragmensevel (Jefferson és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 8447, 1986, Jefferson és munkatársai: EMBO J., 6, 3901, 1987) és egy oktopin szintáz gén (Dhaese és munkatársai: EMBO J., 2, 419, 1983) 3'-végű szignáljával van egyesítve,

3. Arabidopsis SSU promotert (PSSU vagy PSSUARA), herbicid rezisztens sfr gént (0 242 246-os számú európai és egy T-DNS-gén 7 (Velten és Schell: Nucleic Acid Research, 13, 6981, 1985) 3'-végű szignálját tartalmazó kimer szekvencia, és

4. a pGSFR401 EcoRI/SacI fragmensét tartalmazó kimer szekvencia, amely egy nopalinn-szintáz-promotert (PNOS), egy kanamicinrezisztenciát kódoló neo gént és egy oktopin-szintáz-gén (0 242 246-os számú európai közzétételi irat, ahol a pGSFR401-et pGSR4-nek jelölik) 3'-végű szignálját tartalmazza.

A pTTM3 olyan T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között két kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr, amelyben az sfr a második promoter-

ként PSSU szabályozása alá eső marker DNS (0 242 246-os számú európai közzétételi irat), és PTA29-GUS, amelyben a GUS egy riporter gén, amelynek a TA29 promoter szabályozása alatt történő kifejeződése növényben és növényi sejtekben könnyen lokalizálható és meghatározható.

6. példa

Az 5. példa szerinti kimer DNS-szekvencia dohányba történő bevitele

Rekombináns agrobaktérium-törzset állítunk elő úgy, hogy *E. coli*-ból származó pTTM3-at (5. példa), pGV2260-at (De Blaere és munkatársai: Nucleic Acid Research 13, 4777, 1985) tartalmazó agrobaktérium C58C1 Rif^R-be viszünk be. A bevittet a 116 718 számú európai közrebocsátási iratban leírt módon végezzük, amelynek során segítőként pRK2013-at (Figurski és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1648, 1979) tartalmazó *E. coli* HB101-et alkalmazunk. A kapott agrobaktérium-törzs egy hibrid Ti-plazmidot tartalmaz, amelyben pGV2260 és pTTM3 található.

Ezt a törzset alkalmazzuk ahhoz, hogy a például 0 242 246-os számú európai közzétételi iratban leírt, standard eljárással dohánylevéllemezeket (*N. tabacum* Petite Havane SR1. transzformáljunk. A transzformált hegeket és hajtásokat úgy szelektáljuk, hogy a közegbe 5 mg/l mennyiségben foszfino-tricin-herbicidet adagolunk (De Block és munkatársai: EMBO J., 6, 2513, 1987). A transzformált herbicidrezisztens hegekben és hajtásokban béta-glükuronidáz-enzimaktivitás nem mutatható ki.

A transzformált hajtásokat gyökerezettettük, elültettük, és üvegházban virágzásig termesztettük. A virágokat megvizsgáltuk, és csak a porzósál portokjának tapétumsejtjeiben találtunk béta-glükuronidáz-aktivitást. Ez azt mutatja, hogy a TA29 promoter képes a heterológ géneknek, így a béta-glükuronidáz-génnek szelektíven a növény tapétumsejtjeiben történő direkt kifejezésére.

7. példa

PTA29 és gén 4 szekvenciát tartalmazó kimer DNS előállítás

A 6. ábra szerinti pTTM4 plazmidot állítottunk elő az alábbi közismert DNS-fragmensekből:

1. pGSC1700-ből származó (Cornellisen és Vandewiele: Nucleic Acid Research 17 (1), 19–29, 1989) és T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens,

2. 5. példa szerinti kimer szekvencia (3 szám), amely a herbicidrezisztens sfr gén és a T-DNS gén 73'-végű kifejezését szabályozó CSSU promotert tartalmaz,

3. 5. példa szerinti kimer szekvencia (4 szám), amely neogén és oktopin szintáz gén 3'-végű kifejezését szabályozó PNOS promotert tartalmaz és

4. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amely a keretben izopentenil-transzferázt kódoló agrobaktérium T-DNS-gén 4-gyel (Akiyoshi és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 5994, 1984, Barry és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 4776, 1984) van egyesítve, amely tartalmazza a saját 3'-végű átírásszabályozó szignálját.

A pTTM4 egy biner típus T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között az alábbi kimer szekvenciákat tartalmazza: PSSU-sfr és PNOS-neo, amelyekben az sfr és neo gének a növényre nézve szelektív domináns markert kódoló marker DNS-ek, és amelyeket második promoterként a PSSU és a PNOS szabályoz, valamint PTA29 gén 4, amelyben a gén 4 az első promoterként a PTA29 szabályozása alá eső hímsteril DNS és citokinin túltermelését okozó izopentenil-transzferázenzimet kódol. A tapétumsejtekben a TA29 promotor szabályozása alatt kiváltott fokozott citokinintermelés megzavarja a tapétumsejtek metabolizmusát és organogenezisét.

8. példa

A 7. példa szerinti kimer DNS-szekvencia dohány-növénybe történő bevitel

A 6. példában leírt módon a 7. példa szerinti pTMM4-et viszünk be *E. coli* törzsből agrobaktérium C58C1 Rif^R törzsbe. A kapott agrobaktérium-törzs pGV2260-at és pTTM4-et tartalmazó, biner típusú Ti-plazmidot tartalmaz.

Szintén a 6. példában leírt módon ezt a törzset felhasználhatjuk dohánylevéllemezekbe történő transzformálásra és a transzformált hegeket és hajtásokat 5 mg/l foszfino-tricin segítségével szelektáljuk. Gyökereztetjük azokat a transzformált herbicidrezisztens hajtásokat, amelyekben a 4 gén még nem fejeződött ki.

A növényeket elültetjük és üvegházban virágoztatjuk. A virágokat megvizsgáljuk és azt találjuk, hogy a porzószámban a portok tapétumsejtjei nem funkcionálnak. Ez azt igazolja, hogy a TA29 promotor képes a heterológ 4 génnek a tapétumsejtekben történő közvetlen kifejezésére.

9. példa

PTA29 és RN-áz T1 gént tartalmazó kimer DNS-szekvencia előállítás

A 7A. ábra szerinti pTTM6 plazmidot állítunk elő az alábbi közismert DNS-fragmensekből:

1. pGSC1600-ból származó és T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens,

2. 5. példa szerinti kimer szekvencia (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS 7 gén 3'-végét tartalmazza, és

3. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amelyben egy kereten belül A. oryzae-ból származó RN-áz T1-et kódoló szintetikus gén (Quaas és munkatársai: Biophosphates and their Analogues-Synthesis, Structure, Metabolism and Activity, Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, 1987, Quaas és munkatársai: Eur. J. Biochem. 173, 617–622, 1988) és nopalín-szintáz- (NOS) gén 3'-végi szignáljai (An és munkatársai: EMBO J., 4, (2), 277, 1985) egyesülnek.

A pTTM6 olyan T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között két kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr, amely második promoterként PSSU szabályozása alatt működő marker DNS és PTA29-RN-áz T1 gén, amely az első promoterként PTA29 szabályo-

zása alá eső hímsteril DNS. A hímsteril DNS TA29 promotor szabályozása alatt tapétumsejtekben történő kifejeződése olyan RN-áz T1-et termel, amely letális a sejtekre nézve, mivel az RN-áz T1 elroncsolja azokat az RNS-molekulákat, amelyek nélkülözhetetlenek a sejtm metabolizmusához.

10. példa

9. példa szerinti kimer DNS-szekvencia dohányba történő bevitel

A 6. példában leírt módon rekombináns agrobaktérium-törzset állítunk elő úgy, hogy *E. coli*-ból származó, 9. példa szerinti pTTM6-ot agrobaktérium C58C1 Rif^R törzsbe viszünk be. A kapott agrobaktérium-törzs, amely pGV2260-ból és pTTM6-ból álló Ti-plazmidot tartalmaz, felhasználható dohánylevéllemezek transzformálásához. A transzformált hegeket és hajtásokat 5 mg/l foszfino-tricinnel szelektáljuk. Az a tény, hogy az RN-áz T1 gén nem fejeződik ki a transzformált herbicidrezisztens hegekben és hajtásokban, a növekedésükből látható.

A transzformált hajtásokat gyökereztetjük, elültetjük és üvegházban virágoztatjuk. A transzformált dohánynövények a portoktól eltekintve normális virágokat fejlesztenek. A portok, bár normális alakú, később nyílik, mint a nem transzformált dohánynövény portokja. (Lásd a 11. ábrát.) A portok nyílása után a transzformált növényből legfeljebb csak kevés pollen szabadul fel, és a transzformált növények által termelt pollenszemcsék térfogatukban mintegy 50–100-szor kisebbek, mint a normál pollenszemcsék, és alakuk szabálytalan. Emellett a transzformált növény legtöbb pollenszemcséje csírázásra alkalmatlan, és a transzformált növény pollenjének csírázási képessége mintegy 0–2% a normál pollenszemcsék csírázási képességéhez viszonyítva. A transzformált növények sem természetes, sem kézzel végzett önbeporzással nem termelnek magot.

A transzformált növény vékonyrétegű keresztmetsetének mikroszkopikus vizsgálatával megállapítható, hogy normális tapétumréteg nem képződik, és a pollenszák üres marad. (Lásd a 12. ábrát.) Ezt azt jelenti, hogy a TA29 promotor alkalmas a heterológ RN-áz T1 gén szelektíven a transzformált növény tapétumsejtjeiben történő közvetlen kifejezésére, és hogy az RN-áz T1 képes a tapétumsejtek megfelelő roncsolására, és így a növényben hímsterilitás kialakítására.

11. példa

9. példa szerinti kimer DNS-szekvencia származékának olajrepcébe történő bevitel

Rekombináns agrobaktérium-törzset állítunk elő úgy, hogy *E. coli*-ból származó pTTM6A-t agrobaktérium C58 Rif^R törzsbe viszünk be, amely pMP90-et tartalmaz (Koncz és Schell: Mol. Gen. Genetics 204, 383–396, 1986). Az pMP90 vir és transz funkcióval rendelkezik, és nem hordoz ampicillinrezisztenciát kódoló gént. Mint a 7B. ábra mutatja, a pTTM6A- a 9. példa szerinti pTTM6 származéka, amelyben az ampicillinrezisztenciát kódoló béta-laktamáz-gént annak ScaI helyére történő DNS-szekvencia beépítésével inaktívtuk.

A kapott agrobaktérium-törzs (A3144) hordozza a pMP90-et és a pTTM6A-t és felhasználható Brassica napus transzformálásához (Lloyd és munkatársai: Science, 234, 464–466, 1986, és Klimaszewska és munkatársai: Plant Cell Tissue Organ Culture 4, 183–197, 1985). A közös tenyésztés után az A3144-et karbenicilinnel elpusztítjuk. A transzformált hegeket 5 mg/l foszfino-tricinnel és 100 µg/ml kanamicinnel szelektáljuk, és a rezisztens hegeket visszavisszük a növényekre. Hajtások és gyökerek előállítás után a transzformált növényeket üvegházba visszük és virágoztatjuk. A virágokat megvizsgáljuk és azt találjuk, hogy azok lényegében ugyanolyan fenotípussal rendelkeznek, mint a 10. példa szerinti transzformált dohánynövények. Ez azt igazolja, hogy a TA29 promoter képes a heterológ RN-áz T1 gén dohánytól eltérő növények tapétumsejtjeiben történő szelektív és közvetlen kifejezésére, és így himsterilitás kialakítására.

12. példa

PTA29-et és barnázzgént tartalmazó kimer DNS-szekvencia előállítása

A 8. ábra szerinti pTTM8 plazmidot az alábbi közismert fragmensekből állítjuk elő:

1. pGSC1700-ból származó T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens (Cornelissen és Vancewiele: Nucleic Acid Research, 17 (1), 19–29, 1989), amely béta-laktamáz-gént (a 8. ábrán 1') tartalmaz, amelyet az ScaI helyre DNS-szekvencia beépítésével inaktiváltunk,

2. 5. példa szerinti kimer szekvencia (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS-gén 3'-végét tartalmazza,

3. 5. példa szerinti kimer szekvencia (4 szám), amely PNOS promotert, neo gént és oktopin-szintáz-gén 3'-végét tartalmazza, és

4) 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amelyhez egy kereten belül Bacillus amiloliquefaciensből származó barnázzgén (Hartley és Rogerson: Preparative Biochemistry, 2 (3), 243–250, 1972. és 9. példa szerinti nopalil-szintáz-gén 3'-vége egyesül.

A pTTM8 olyan biner típusú T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között három kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr és PNOS-neo, amelyek második promoterként PSSU-val és PNOS-sel kifejezhető marker DNS-ek, valamint PTA29-barnázzgén, amely első promoterként PTA29 szabályozása alá eső himsteril DNS. A himsteril DNS TA29 promoter szabályozása alatt történő kifejezésével szelektíven a tapétumsejtekben termelünk barnázt, amely bekapcsolódik a sejtek metabolizmusába.

13. példa

12. példa szerinti kimer DNS-szekvencia dohányba és olajrepcébe történő bevitele

A 11. példában leírt módon rekombináns agrobaktérium-törzset állítunk elő úgy, hogy E. coliból származó pTTM8-at (12. példa) pMP90-et tartalmazó agrobaktérium C58C1 Rif^R törzsbe (Koncz és Schell: Mol.

Gen. Genetics 204, 383–396, 1986) visszük be. A kapott A3135 törzs pMP90-et és pTTM8-at hordoz, és dohánylevéllemezzel és olajrepcével transzformálható. A transzformált hegeket és hajtásokat 5 mg/l foszfino-tricinnel és 100 µg/ml kanamicinnel szelektáljuk. Az a tény, hogy a barnázzgén nem fejeződik ki a transzformált herbicidrezisztens hegekben és hajtásokban, a fejlődésükből látszik.

A transzformált hajtásokat gyökereztetjük, elültetjük és üvegházban virágoztatjuk. A dohány- és az olajrepcvirágokat megvizsgálva azt tapasztaljuk, hogy a transzformált növény virágjainak fenotípusa lényegében azonos a 10. példa szerinti transzformált dohánynövény fenotípusával. Ez azt jelenti, hogy a TA29 promoter képes a heterológ barnázzgén szelektíven tapétumsejtekben történő közvetlen kifejezésére, és így himsterilitás kialakítására.

14. példa

PTA29-et és papain kódoló gént tartalmazó kimer DNS-szekvencia előállítása

A 9A. ábra szerinti pTVEPI plazmidot állítunk elő a következő, közismert fragmensekből:

1. pGSC1700-ból származó T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens, amelyben a béta-laktamáz-gént (9A. ábra, 1') az ScaI helyre DNS-szekvencia beépítésével inaktiváltuk,

2. 5. példa szerinti kimer szekvencia (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS gén 3'-végét tartalmazza,

3. 5. példa szerinti kimer szekvencia (4 szám), amely PNOS promotert, neo gént és oktopin-szintáz-gén 3'-végét tartalmazza, és

4. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amelyben egy kereten belül

a) Carica papaja gyümölcsből származó papaingén, amely peptid- és észterkötések megtámadására alkalmas növényi endopeptidáz papain zimogént (Cohen és munkatársai: Gene 48, 219–227, 1986) kódol, amelynek DNS-szekvenciájában Cohen és munkatársai a 3. példában leírt módon az alábbi, helyspecifikus mutációt hajtották végre.

i) az első ATG kódtól felfelé az első helyzetben található A nukleotidot C nukleotidra cserélve egy megfelelő NcoI hasítási helyet alakítottak ki, és

ii) a 47, 118 és 135 helyzetben lévő glutamátot kódoló GAA kódokat glutamint kódoló CAA kódokra cserélték, és

b) a 9. példa szerinti nopalil-szintáz-gén 3'-vége egyesül.

A pTVEPI olyan biner típusú T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciája között három kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr és PNOS-neo, amelyek a második promoterként PSSU és PNOS szabályozása alatt a transzformált növényre nézve szelektálható marker kódoló marker DNS-ek, valamint PTA29-papain gén, amely első promoterként a PTA29 szabályozása alá eső himsteril DNS. A himsteril DNS-nek a TA29 promoter szabályozása alatt a tapétumsejtekbe történő

kifejezésével olyan endopeptidázt (papain zimogént) kapunk, amely hasítja a tapétumsejtekben található fehérjéket, és így elpusztítja ezeket a sejteket.

A 9B. ábra szerinti pTVEP2 plazmidot az alábbi közismert fragmensekből kapjuk:

1. pGSC1700-ból származó T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens, amelyben a béta-laktamáz-gént (9B. ábra, 1') az ScaI helyre DNS-szekvenca beépítésével inaktiváltuk,

2. 5. példa szerinti kimer szekvenca (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS-gén 7 3'-végét tartalmazza,

3. 5. példa szerinti kimer szekvenca (4 szám), amely PNOS promotert, neo gént és oktopin-szintáz-gén 3'-végét tartalmazza, és

4. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvenca, amelyben egy kereten belül

a) Carica papaja gyümölcsből származó papaingén, amely a papain zimogén aktív fehérjéjét kódolja, amelyben a DNS-szekvenciában Cohen és munkatársai 3. példa szerinti helyspecifikus mutációval az alábbi módosításokat hajtották végre:

i) az aktív fehérje első Ile csoportjától felfelé az Asn-t kódoló AAT kódot GAT kódra cserélték, amely megfelelő EcoRV hasítási helyet (GAT ATC) biztosít, az EcoRV hasítási hely közvetlenül a PTA29 szakaszhoz kapcsolódik, és így a kereten belül közvetlen kapcsolatot létesít a promoter és a papain zimogén aktív fehérjéjét kódoló szekvenca között, és

ii) a 47, 118 és 135 helyzetű glutamátot kódoló GAA kódokat glutamint kódoló CAA kódra cserélték, és

b) 9. példa szerinti nopalín-szintáz-gén 3'-vége kapcsolódik.

A pTVEP2 a pTVEP1-hez hasonlóan olyan biner típusú T-DNS-vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között három kimer gént tartalmaz: PSSU-sfr és PNOS-neo, amelyek a növénytranszformációnál domináns szelektálható markert kódolnak, és PTA29-papain gén, amely a tapétumsejtekben lévő fehérjéket hasító endopeptidázt kódol, és így ezeket a sejteket elpusztítja.

15. példa

14. példa szerinti kimer DNS-szekvenca dohányba és olajrepcébe történő bevitele

A 11. példában leírt módon egymástól külön pTVEP1-et és pTVEP2-t viszünk be *E. coliból* agrobaktérium C58C1 Rif^R törzsbe, amely pMP90-et hordoz.

A kapott törzseket, amelyek a pMP90 mellett pTVEP1-et, illetve a pMP90 mellett pTVEP2-t hordoznak, a 11. és 13. példa szerint dohány- és olajrepcenövényekbe transzformálunk. Az a tény, hogy a transzformált herbicid- és kanamicinrezisztens hegekben, hajtásokban és gyökerekben a papaingén nem fejeződik ki, a növekedésen látszik.

A transzformált növényeket üvegházban helyezzük és talajba ültetve virágoztatjuk. A dohány- és olajrepcvirágokat megvizsgálva megállapíthatjuk, hogy a transzformált növények fenotípusa lényegében azonos a

10. példa szerinti transzformált dohánynövény fenotípusával. Ez azt jelenti, hogy a TA29 promoter képes a pTVEP1-ben és pTVEP2-ben lévő heterológ papaingén szelektíven a növény tapétumsejtjeiben történő közvetlen kifejezésére, és így hímsterilitás kialakítására.

16. példa

PTA 29-et és EcoRI-et kódoló gént tartalmazó kimer DNS-szekvenca előállítása

A 10A. ábra szerinti pTVE63 plazmidot állítunk elő az alábbi közismert fragmensekből:

1. pGSC1701A2-ből származó T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens (87/115985.1 számú európai szabadalmi bejelentés),

2. 5. példa szerinti kimer szekvenca (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS-gén 7 3'-végét tartalmazza,

3) 5. példa szerinti kimer szekvenca (4 szám), amely PNOS promotert, neo gént és oktopin-szintáz-gén 3'-végét tartalmazza,

4. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvenca, amelyben egy kereten belül

a) *E. coliból* származó EcoRI restriktions endonukleáz kódoló gén (Green és munkatársai: *J. Biol. Chem.* 256, 2143–2153, 1981, Botterman és Zabeau: *Gene*, 37, 229–239, 1985), amely képes GAATTC szekvenciának kettős szálú DNS-en történő felismerésére és hasítására, és amelyben a Green és munkatársai féle DNS-szekvenciában a 3. példa szerint az alábbi helyspecifikus mutációt végeztük:

i) az ATG kezdeti kód nukleotidjait ATGCA nukleotidokra cseréltük, amellyel a kezdeti kódnál egy NsiI helyet alakítottunk ki, és így az alábbi nukleotidszekvenciát kaptuk:

ATCCA, TCT, AAT, ..., és

ii) a pEcoR12-be klónozott EcoRI gén HindII-HindIII fragmensét (Botterman és Zabeau idézett műve) pMAC5–8 helyspecifikus mutációs vektorba klónoztuk,

és

b) a 9. példa szerinti nopalín-szintáz-gén 3'-végét egyesíti, és

5. saját, természetes promotere szabályozása alatt EcoRI metiláz kódoló gén (Botterman és Zabeau: *Gene* 37, 229–239, 1985), amely *E. coliban* vagy agrobaktériumban gátolja az EcoRI aktivitását, és így kijavítja az EcoRI gén lehetséges hibás kifejeződését.

A pTVE63 dimer típusú T-DNS vektor, amely a T-DNS-határszekvenciák között három kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr és PNOS-neo, amelyek a második promoterként PSSU és PNOS szabályozása alatt marker DNS-ként szolgálnak, és a PTA29-EcoRI gén, amely első promoterként PTA29 szabályozása alatt hímsteril DNS-ként szolgál. A hímsteril DNS TA29 promoter által szabályozott és tapétumsejtekben bekövetkező kifejezése olyan EcoRI restriktions endonukleáz termel, amely a tapétumsejtek kettős szálú DNS-ét a GAATTC helyen hasítja (lásd a II. típusú restriktions modifikációs rendszereket, így Wilson: *TIG* 4 (11), 314–318, 1988), ami a sejt pusztulását okozza.

A 10B. ábra szerinti pTVE62 plazmidot az alábbi közismert fragmensekből állítjuk elő:

1. pGSC1701A2-ből származó T-DNS-határszekvenciákat tartalmazó vektorfragmens,

2. 5. példa szerinti kimer szekvencia (3 szám), amely PSSU promotert, sfr herbicidrezisztens gént és T-DNS-gén 73'-végét tartalmazza,

3. 5. példa szerinti kimer szekvencia (4 szám), amely PNOS promotert, neo gént és oktopin-szintáz-gén neo 3'-végét tartalmazza,

4. 3. példa szerinti PTA29 promotert tartalmazó kimer szekvencia, amelyben egy kereten belül

a) Mn-szuperoxid-dizmutáz (Mn-SOD) tranzitpeptidjét kódoló génfragmens; amely a pSOD1 HpaI-HindIII fragmenséből származó NcoI-PstI fragmens (Bowler és munkatársai: EMBO J. 8, 31–38, 1989), amelynek DNS-szekvenciájában Bowler és munkatársai a 3. példában leírt helyspecifikus mutációval az alábbi módosításokat végezték:

i) az ATG kezdeti kódtól felfelé a –2 és –1 pozícióban elhelyezkedő AA nukleotidokat CC nukleotidokra cserélték, és így a kezdeti kódnál egy NcoI helyet alakítottak ki, amely a következő nukleotidszekvenciának felel meg:

–CCATGGCACTAC

NcoI

ii) a tranzitpeptid működési helyétől közvetlenül lefelé elhelyezkedő T, TCG, CTC nukleotidokat C, TGC, AGC nukleotidokra cserélték, és így egy PstI helyet alakítottak ki a működési hely mögött, amely a következő nukleotidszekvenciának felel meg:

L Q T F S L

CTC, CGC, GGC, TTG, CAG, ACC, TTT, TCG, CTC

CTC, CGC, GGC, TTG, CAG, ACC, TTC, TGC, AGC...

PstI

ahol a nyíl a tranzitpeptid működési helyét mutatja, míg a felső vonal az Mn-SOD kódoló szekvenciának megfelelő aminosavszekvenciát mutatja, az NcoI-PstI fragmens egy kereten belül EcoRI restriktions endonukleáz kódoló génnel van egyesítve (Green és munkatársai: J. Biol. Chem. 256, 2143–2153, 1981, Botterman és Zabeau: Gene 37, 229–239, 1985), amely alkalmas a pTVE63-ban található kettős szálú DNS GAATTC szekvenciájának felismerésére és hasítására, és

b) 9. példa szerinti nopalin-szintáz-gén 3'-vége van egyesítve és

5. természetes promoterek szabályozása alatt EcoRI metilázt kódoló gén (Botterman és Zabeau idézett műve), amely E. coliban vagy agrobaktériumban gátolja az EcoRI aktivitását, és így kiküszöböli az EcoRI gén esetleges hibás kifejeződésének következményeit, amely gén a vektorfragmensben belül a határszekvenciákon kívül helyezkedik el.

A pTVE62 biner típusú T-DNS-vektor, amely a határszekvenciákon belül három kimer szekvenciát tartalmaz: PSSU-sfr és PNOS-NPTII, amelyek második promoterként PSSU és PNOS szabályozása alatt álló mar-

ker DNS-ek, valamint pTA29-tranzitpeptid-EcoRI endonukleáz gén, amely első promoterként PTA29 szabályozás alá eső himsteril DNS és ezek között elhelyezkedő tranzitpeptid-kódoló szekvencia. A himsteril DNS tapétumsejtben TA29 promotor szabályozása alatt történő kifejeződése olyan restriktions endonukleáz eredményez, amely beépül a tapétumsejt mitokondriumába és a sejtek kettős szálú DNS-ét a GAATTC helyen hasítja. Ez a sejtek pusztulását okozza.

17. példa

16. példa szerinti kimer DNS-szekvencia dohányba és olajrepcébe történő bevitel

A 11. és 15. példában leírt módon E. coliból származó pTVE62-t és pTVE63-at agrobaktérium C58C1 Rif^R-be viszünk be, amely pMP90-et hordoz. A kapott törzsek, amelyek pMP90-nel együtt pTVE62-t, illetve pMP90-nel együtt pTVE63-at hordoznak, felhasználhatók dohány és olajrepcé transzformálására a 11. és 13. példában leírt módon. Azt a tényt, hogy az EcoRI endonukleáz gének a transzformált herbicid- és kanamicinrezisztens hegekben, hajtásokban és gyökerekben nem fejeződnek ki, azok fejlődésén látjuk.

A transzformált növényeket üvegházban talajba ültetve virágoztatjuk. A dohány- és olajrepcévirágokat megvizsgálva azt találtuk, hogy a transzformált növények fenotípusa lényegében azonos a 10. példa szerinti transzformált dohánynövények fenotípusával. Ez azt jelenti, hogy a TA29 promotor képes a heterológ EcoRI endonukleáz gén szelektíven a pTVE62 és pTVE63 transzformált növények tapétumsejtjeiben történő közvetlen kifejezésére, és így himsterilitás kiváltására.

A találmány szerinti eljárás nem korlátozódik valamely konkrét növény transzformálására. Az eljárás megvalósítható minden olyan növényenél, amelynek sejtmaggenomja himsteril DNS-sel transzformálható, amely egy első promotor szabályozása alatt szelektíven a növény porzószálsejtjeiben közvetlenül kifejezhető, és a növény mind önbeporzó, mind keresztbeporzó lehet. A növényekre példaként említhető burgonya, paradicsom, olajrepcé, lucerna, napraforgó, gyapot, zeller, hagyma, kukorica, szójabab, dohány, káposztafélék és cukorrépa.

A találmány oltalmi köre továbbá nem korlátozódik a példákban említett plazmidokra és vektorokra, hanem kiterjed minden olyan plazmidra és vektorra, amely egy első promotor szabályozása alá eső himsteril DNS-t tartalmaz.

A találmány oltalmi köre nem korlátozódik továbbá a példákban említett promoterekre, így a TA29 promoterre, hanem kiterjed minden olyan DNS-szekvenciára, amely valamely himsteril DNS-nek szelektíven a porzószálsejtben történő közvetlen kifejeződésére alkalmas promotert kódol. Ebben a vonatkozásban az oltalmi kör kiterjed a 3A. ábra szerinti TA29 promotor DNS-szekvenciájára, valamely bármely ekvivalens DNS-szekvenciára, így a 3B. ábra szerinti TA13 promotor és a 3C. ábra szerinti TA26 promotor DNS-szekvenciájára, amelyek felhasználhatók a himsteril DNS-nek szelektíven a növény tapétumsejtjeiben történő kifejezésé-

re. A TA29, TA26 és TA13 promoter DNS-szekvenciái módosíthatók:

1. néhány kód azonos vagy más aminosavat kódoló kódra történő kicserélésével, és/vagy

2. néhány kód kiiktatásával vagy hozzáadásával, azal a feltétellel, hogy ezek a módosítások lényegében nem változtatják meg a kódolt promoternek azt a tulajdonságát, hogy szabályozza a hímsterilitás tapétumspecifikus kifejeződését.

A találmány oltalmi köre továbbá nem korlátozódik a példákban említett hímsteril DNS-ekre, hanem kiterjed minden olyan DNS-szekvenciára, amely olyan első RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely lényegesen megzavarja azoknak a porzószájsejteknek a metabolizmusát, működését és/vagy fejlődését, amelyekben az első promoter szabályozása alatt kifejeződtek.

Az oltalmi kör nem korlátozódik végül a példákban említett marker DNS-ekre, hanem kiterjed bármely olyan DNS-szekvenciára, amely olyan második RNS-t, fehérjét vagy polipeptidet kódol, amely legalább egy olyan speciális növényi szövetnek vagy sejtnak, amelyben az adott DNS-szekvencia kifejeződik, egy megkülönböztethető jelleget kölcsönöz, az olyan növényi szövethez vagy sejthez viszonyítva, amelyben az adott DNS-szekvencia nem fejeződik ki.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hímsteril növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

i) a növény sejtjének nukleáris genomjába egy, a) hímsteril DNS-t és egy b) első promotert tartalmazó idegen DNS-szekvenciát juttatunk be, amelyben a hímsteril DNS ugyanabban a transzkripciós egységben helyezkedik el, mint az első promoter, úgy, hogy egyben annak irányítása alatt áll, és az első promoter alkalmas a hímsteril DNS expressziójának szelektíven a növény porzószájsejtjeiben történő irányítására, és

ii) a növényi sejtből növényt regenerálunk, *azzal a megszorítással*, hogy amennyiben első promoterként a hímsteril DNS expresszióját szelektíven a polensejtekben irányító promotert alkalmazunk, akkor a transzformált növény nukleáris genomjába a DNS-t homozigóta módon juttatjuk be.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként egy, a porzószájsejteket – amelyekben a DNS expresszálódik – megőző első fehérjét vagy polipeptidet kódoló DNS-t alkalmazunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az expressziót szelektíven a porzószájsejtekben irányítani képes első promoterként a hímsteril DNS-nek a növény specifikus portoksejtjeiben történő expresszióját eredményező első promotert alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a hímsteril DNS-nek a tapétumsejtekben történő expresszióját eredményező promotert alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a 3A. ábrán bemutatott TA29 gén promotérét alkalmazzuk.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a 3C. ábra szerinti cDNS-szekvenciának megfelelő TA26 gén promotérét, a 3B. ábra szerinti cDNS-szekvenciának megfelelő TA13 gén promotérét vagy a TA29 génnel, a TA26 génnel vagy a TA13 génnel hibridizálódni képes, tapétumspecifikus mRNS-t kódoló DNS promotérét alkalmazzuk.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként RN-ázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként barnázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként RN-áz-T1-et kódoló DNS-t alkalmazunk.

10. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként DN-ázt, proteázt, glükánázt, lipázt, lipidperoxidázt, sejtfalinhitort vagy bakteriális toxint kódoló DNS-t alkalmazunk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként endonukleázt vagy papaint kódoló DNS-t alkalmazunk.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként zimogén papaint, aktív papainfehérjét vagy foszfolipáz-A2-t kódoló DNS-t alkalmazunk.

13. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként növényi hormon szintézisét katalizáló enzimet kódoló DNS-t alkalmazunk.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként *Agrobacterium* T-DNS-ének 1. génje, 2. génje vagy 4. génje által kódolt enzimet alkalmazunk.

15. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként ribozimot kódoló, előnyösen a 3A. ábra szerinti TA29 gén által kódolt mRNS elleni, a 3C. ábra szerinti cDNS-szekvenciát tartalmazó TA26 gén által kódolt mRNS elleni vagy a 3B. ábra szerinti cDNS-szekvenciát tartalmazó TA13 gén által kódolt mRNS elleni ribozimot kódoló, vagy egy antiszensz DNS-t, előnyösen a TA29 gén, a TA26 gén vagy a TA13 gén antiszensz DNS-ét kódoló DNS-t alkalmazunk.

16. Az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként egy tranzitpeptidet kódoló első DNS-t is tartalmazó, és az első DNS-t a hímsteril DNS-sel és az első promoterral azonos transzkripciós egységben, a kettő közötti helyzetben tartalmazó idegen DNS-szekvenciát alkalmazunk.

17. Az 1–14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként egy c) marker DNS-t és d) egy második promotert is tartalmazó idegen DNS-szekvenciát alkalmazunk, amelyben a marker DNS a második promoterral azonos transzk-

ripciók egységben helyezkedik el úgy, hogy annak irányítása alatt áll; és a második promotor alkalmas a marker DNS expressziójának a növény legalábbis specifikus szövetében vagy sejtjeiben történő irányítására.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként herbicidrezisztencia-gént vagy egy, herbiciddel szembeni, módosított, a módosítatlan enzimnél a herbiciddel szemben kisebb affinitású célnzimet kódoló gént alkalmazunk.

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként glutamin-szintetáz inhibitorával szemben rezisztenciát biztosító gént, vagy „glyphosate”-tal szembeni célnzimként egy módosított 5-enol-piruvilsikimát-3-foszfát-szintáz kódoló gént vagy glutamin-szintetáz inhibitorával szembeni célnzimként egy módosított glutamin-szintetáz kódoló gént alkalmazunk.

20. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként foszfinotricinnel szemben rezisztenciát biztosító gént alkalmazunk.

21. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként sfr gént vagy sfrv gént alkalmazunk.

22. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként legalább a specifikus szövetnek vagy a specifikus sejteknek szint biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént; egy növénynek stresszel szembeni tűrőképességet biztosító gént; vagy egy betegséggel, vagy kártevővel szemben rezisztenciát biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént alkalmazunk.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként GUS-gént vagy A1-gént, Mn-szuperoxid-dizmutáz kódoló gént, rovarokkal szemben rezisztenciát biztosító, *Bacillus thuringiensis* endotoxint kódoló gént vagy baktériummal szemben rezisztenciát biztosító baktericid peptidet kódoló gént alkalmazunk.

24. A 17–23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy második promoterként egy konstitutív promotert, sérüléssel indukálható promotert, a génexpressziót szelektíven fotoszintetikus aktivitással rendelkező növényi szövetben irányító promotert, vagy a génexpressziót szelektíven levélsejtben, szíromsejtben vagy magsejtben irányító promotert alkalmazunk.

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy második promoterként 35S promotert, PNOs promotert vagy POCS promotert, TR1' vagy TR2' promotert, SSU promotert vagy a génexpressziót szelektíven magburoksejtben irányító promotert alkalmazunk.

26. A 17–25. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként egy tranzitpeptidet kódoló második DNS-t is tartalmazó és az első DNS-t a marker DNS-sel és a második promoterral azonos transzkripciók egységben, a kettő közötti helyzetben tartalmazó idegen DNS-szekvenciát alkalmazunk.

27. Az 1–26. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként a 6. ábrán bemutatott pTTM4 vektor, a 7A. ábrán bemu-

tatott pTTM6 vektor, a 7B. ábrán bemutatott pTTM6A vektor, a 8. ábrán bemutatott pTTM8 vektor, a 9A. ábrán bemutatott pTVEP1 vektor, a 9B. ábrán bemutatott pTVEP2 vektor, a 10B. ábrán bemutatott pTVE62 vektor vagy a 10A. ábrán bemutatott pTVE63 vektor T-DNS-ét tartalmazó DNS-szekvenciát alkalmazunk.

28. Eljárás hímsteril növény és szaporítóanyagok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a növény egy sejtjének nukleáris genomjába idegen DNS-szekvenciát viszünk be és a növényt regeneráljuk a növényi sejtől az 1–27. igénypontok bármelyike szerinti eljárás i) és ii) lépéseivel megegyező módon – azzal a megszorítással, hogy amennyiben első promoterként a hímsteril DNS expresszióját szelektíven a pollensejtben irányító promotert alkalmazunk, akkor a transzformált növény nukleáris genomjába a DNS-t homozigóta módon juttatjuk be – majd az idegen DNS-szekvenciát tartalmazó növényből a szaporítóanyagokat kinyerjük.

29. Eljárás sejtjeinek nukleáris genomjában az alábbiakat tartalmazó idegen DNS-szekvenciát hordozó hímsteril növény termesztésére:

- egy hímsteril DNS-t és egy első promotert, amely hímsteril DNS ugyanabban a transzkripciók egységben helyezkedik el, mint az első promotor úgy, hogy egyben annak irányítása alatt áll, és amely első promotor alkalmas a hímsteril DNS expressziójának szelektíven a növény porzószálejtjeiben történő irányítására, és
- egy marker DNS-t és egy második promotert, amely marker DNS a második promoterral azonos transzkripciók egységben helyezkedik el úgy, hogy annak irányítása alatt áll; és amely második promotor alkalmas a marker DNS expressziójának a növény legalábbis specifikus szövetében vagy sejtjeiben történő irányítására,

azzal jellemezve, hogy

- a hímsteril növényt keresztbe beporozzuk egy, ugyanahhoz a vonalhoz tartozó, a második promotert és a marker DNS-t hordozó idegen DNS-szekvenciától mentes hímtermékeny növényvel, majd
- a hímsteril növényt és/vagy a keresztbe beporzásból származó hímsteril utódait különválasztjuk a hímtermékeny növénytől és/vagy hímtermékeny utódtól, kihasználva azt, hogy a hímtermékeny növény mentes a marker DNS-től és a második promotertől, majd
- (iii) a hímsteril növényből magokat nyerünk, és azokból növényeket termesztünk.

30. Eljárás hibrid magok előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

- egy olyan hímsteril növényt, amely sejtjeinek nukleáris genomjában egy, az alábbiakat tartalmazó idegen DNS-szekvenciát tartalmaz:
 - egy hímsteril DNS-t és egy b) első promotert, amely hímsteril DNS ugyanabban a transzkripciók egységben helyezkedik el, mint az első promotor, úgy, hogy egyben annak irányítása alatt áll, és amely első promotor alkalmas a hímsteril DNS expressziójának szelektíven a növény porzószálejtjeiben történő irányítására;

keresztbe beporzunk egy, az idegen DNS-szekvenciától mentes hímtermékeny növényvel, majd

ii) a hímsteril növényből hibrid magokat takarítunk be.

31. A 29. vagy a 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy expressziót szelektíven a növény porzószájsejtjeiben irányító első promoterként a hímsteril DNS portoksejtokban történő expressziót eredményező promotert alkalmazunk.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a hímsteril DNS tapétumsejtjeiben történő expresszióját eredményező promotert alkalmazunk.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a 3A. ábra szerinti TA29 gén promotert alkalmazunk.

34. A 31–33. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril DNS-ként RN-ázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

35. A 34. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként barnázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

36. A 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként

c) marker DNS-t és d) egy második promotert is tartalmazó idegen DNS-szekvenciát alkalmazunk, amelyben a marker DNS a második promoterral azonos transzkripció egységben helyezkedik el, úgy, hogy annak irányítása alatt áll; és a második promoter alkalmas a marker DNS expressziójának a növény legalábbis specifikus szövetében vagy sejtjeiben történő irányítására.

37. A 29. vagy 36. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként egy herbicidrezisztencia-gént vagy egy, herbiciddel szembeni, módosított, a módosítatlan enzimnél a herbiciddel szemben kisebb affinitású célnzimet kódoló gént alkalmazunk.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként glutamin-szintetáz inhibitorával szemben rezisztenciát biztosító gént, vagy „glyphosate”-tal szembeni célnzimként egy módosított 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát-szintetáz kódoló gént vagy glutamin-szintetáz inhibitorával szembeni célnzimként egy módosított glutamin-szintetáz kódoló gént alkalmazunk.

39. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként foszfinotricinnel szemben rezisztenciát biztosító gént alkalmazunk.

40. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként sfr gént vagy sfrv gént alkalmazunk.

41. A 29. vagy a 36. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként legalább a specifikus szövetnek vagy a specifikus sejteknek színt biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént; egy növénynek stresszel szembeni tűrőképességet biztosító gént; vagy egy betegséggel, vagy kártevővel szemben rezisztenciát biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént alkalmazunk.

42. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként GUS-gént vagy A1-gént, Mn-szuperoxid-dizmutáz kódoló gént, rovarokkal szemben rezisztenciát biztosító, *Bacillus thuringiensis* endotoxint

kódoló gént vagy baktériummal szemben rezisztenciát biztosító baktericid peptidet kódoló gént alkalmazunk.

43. A 37–42. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy második promoterként egy konstitutív promotert, sérüléssel indukálható promotert, a génextpressziót szelektíven fotoszintetikus aktivitással rendelkező növényi szövetben irányító promotert, vagy a génextpressziót szelektíven levélsejtben, szíromsejtben vagy magsejtben irányító promotert alkalmazunk.

44. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy második promoterként 35S promotert, PNOS promotert vagy POCS promotert, TR1' vagy TR2' promotert, SSU promotert vagy a génextpressziót szelektíven magburoksejtjeiben irányító promotert alkalmazunk.

45. A 37–44. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril növényt vagy a keresztbe beporzásból származó hímsteril utódait különválasztjuk a hímtermékeny növénytől vagy hímtermékeny utódaitól, kihasználva azt, hogy a hímtermékeny növény vagy hímtermékeny utódja mentes a marker DNS-től.

46. A 45. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként herbicidrezisztencia-gént alkalmazunk, és a hímtermékeny növényt vagy hímtermékeny utódját herbiciddel való permetezéssel elimináljuk.

47. A 37–46. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril növényként nukleáris genomjában a marker DNS mellett egy második marker DNS-t is tartalmazó hímsteril növényt, és hímtermékeny növényként egy marker DNS-t – de a két marker DNS közül az egyiket nem – tartalmazó hímtermékeny növényt alkalmazunk, és a hímsteril növény különválasztását a hímtermékeny növénytől azt kihasználva végezzük, hogy a hímtermékeny növény mentes az egyik marker DNS expressziójától.

48. A 37–47. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril növények közül többet és a hímtermékeny növények közül is többet külön sorba ültetünk.

49. A 37–47. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril növények közül többet és a hímtermékeny növények közül is többet lényegében véletlenszerű eloszlásban termesztünk.

50. Eljárás a) egy hímsteril DNS-t és b) egy, a hímsteril DNS expresszióját szelektíven egy növény porzószájsejtjeiben irányító első promotert tartalmazó idegen DNS-szekvencia előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril DNS-t az első promoter irányítása alá és azzal azonos transzkripció egységbe építjük be.

51. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy expressziót szelektíven porzószájsejtjeiben irányító első promoterként egy, a hímsteril DNS expresszióját a növény specifikus portoksejtjeiben irányító promotert alkalmazunk.

52. Az 51. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a hímsteril DNS-nek a tapétumsejtjeiben történő expresszióját eredményező promotert alkalmazunk.

53. Az 52. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy első promoterként a 3A. ábra szerinti TA29 gén promoterét alkalmazzuk.

54. Az 50–53. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hímsteril DNS-ként RN-ázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként barnázt kódoló DNS-t alkalmazunk.

56. Az 54. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként RN-áz-T1-et kódoló DNS-t alkalmazunk.

57. Az 50–53. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hímsteril DNS-ként DN-ázt, proteázt, glükánázt, lipázt, lipidperoxidázt, sejtfal-inhibitort vagy bakteriális toxint kódoló DNS-t alkalmazunk.

58. Az 50–57. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az idegen DNS-szekvenciába a második promoter irányítása alá és azzal azonos transzkripciósi egységbe egy marker DNS-t építünk be.

59. Az 58. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként egy herbicidrezisztenciagént vagy egy, herbiciddel szembeni, módosított, a mó-

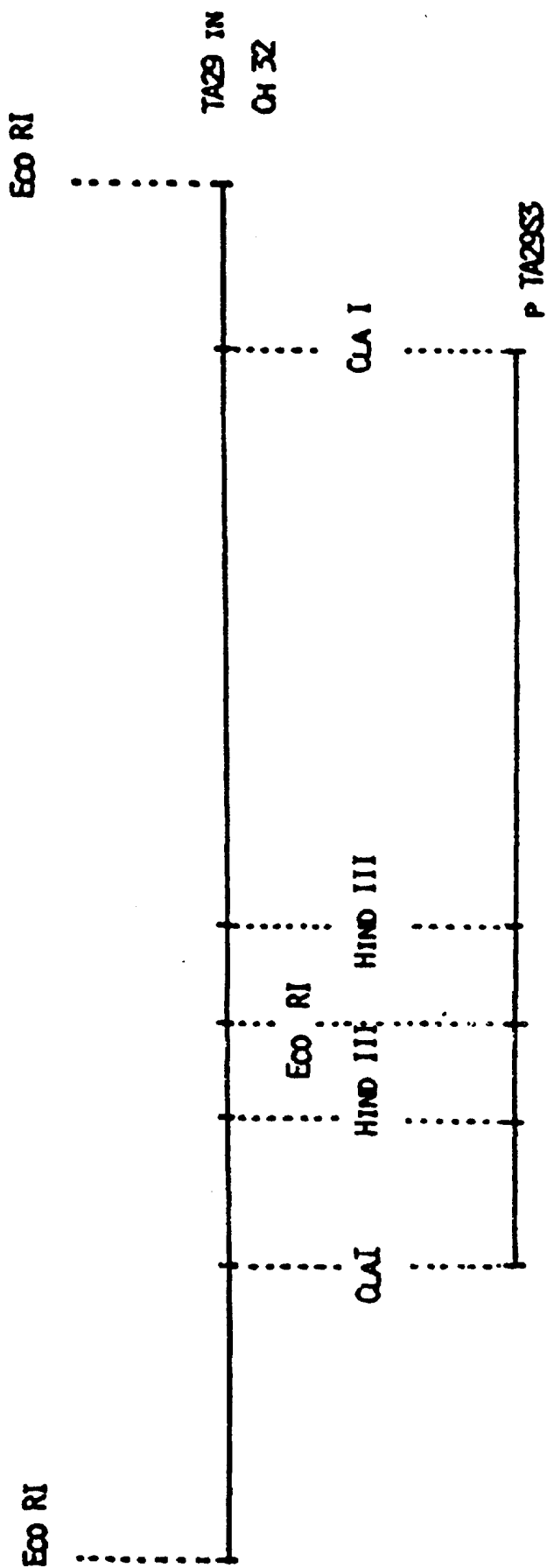
dosítatlan enzimnél a herbiciddel szemben kisebb affinitású célenzimet kódoló gént alkalmazunk.

60. Az 59. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként foszfinotricin-rezisztenciát biztosító gént alkalmazunk.

61. Az 59. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként sfr gént vagy sfrv gént alkalmazunk.

62. Az 58. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy marker DNS-ként legalább a specifikus szövetnek vagy a specifikus sejteknek színt biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént; egy növénynek stresszel szembeni tűrőképességet biztosító gént; vagy egy betegséggel, vagy kártevővel szemben rezisztenciát biztosító fehérjét vagy polipeptidet kódoló gént alkalmazunk.

63. Az 50–62. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy idegen DNS-szekvenciaként a 6. ábrán bemutatott pTTM4 vektor, a 7A. ábrán bemutatott pTTM6 vektor, a 7B. ábrán bemutatott pTTM6A vektor, a 8. ábrán bemutatott pTTM8 vektor, a 9A. ábrán bemutatott pTVEP1 vektor, a 9B. ábrán bemutatott pTVEP2 vektor, a 10B. ábrán bemutatott pTVE62 vektor vagy a 10A. ábrán bemutatott pTVE63 vektor T-DNS-ét tartalmazó DNS-szekvenciát alkalmazunk.



1. ábra

27 5A
CAA TCC GCT AGA CTA TAC CGT TGC ANG CCA GCG CCA AAT ATG TGT GAC AGT AAA
Q S A R L Y R C K P G P N M C D S K

81 108
GAC TGT AAT GAG CTT CTC CTA CAC TTT GTT TTC CCA ATG CAA GAC AAA CAT GAC
D C N E L L L H F V F P M Q D K H D

135 162
AAT AAA CAA GAA CAT CTA AGA TAT GGA GGA GGC CCA GGT ATA GGT CTC ACT GTG
N K Q E H L R Y G G R R G I G L T V

189 216
GGA GGA GTT GGC GGT TTT GGA AIT GGT TTT GGT GCT TGG GGT GGT GGT GGT GGC
G G V G G F G I G F G A W G G G G G

2. ábra

243 270
CGA GGA GGT GGT GGT TCT GAT GGC CCT GGT TGT AGT AAC GAT GGC TGT GAC CCT
G G G G S D A P G C S N D G C D P

297 324
GGT TTT GGC TGT CCC CCG GGC TGT GGT TAT GCA TGT CCT GGC AAC AAT CCT AGT
G F G C P P G C G Y A C P A N N P S

351
CGA GGA ATA ACT GAA TTC CAT ATC TCA GGA TTG TTG GCA
G G I T E F H I S G L L A

2. ábra (folytatás)

Clai

GTTGACAGCTAATCATCGATTATATATAGGATTTTACACAAATAGCGGCTATA 56

TTAATGTTTACTTTTCTAACCATATACATAGATTATACATGATTATACACATTTAAT 126

ATATAAATTATGCATATAATATACATTCGCTGTTAATTTTAGTTAAGTTATAGGGTGGGAGGCTAAT 196

GGATTAATTCITTTATATATAATAATTAATTAACGAATTCGGTGTGACGGTGTAATCATATGTAATTGATA 266

CTGTGCTCTCTTTTATTAATTTAGTGATTAGATTCGCTAGAACTACCAATGCTGTTTTAGGTTTC 336

GTATAATATGAGAAAAGTTAATTTTAGTGGCTTCCAAATATATATTATATACTTTCTCGGTCGACAA 406

TAAGTGAATTTTGGTTGTTTCACAGATTAGAAATTCACATTTTAACATTAATAGCAATGAAAT 476

GATCATATTAACCTTACTAATTCACATAAATTCATTTCTACATCTCCACACACACACACACTTACTCCAA 546

GGCCACTGTAGTAAAAAATAATTAATCAATTTTGAATCTAAAAACTCACTTATTTTGGACCATAAA 616

3A. ábra

AAAAGCGCCAAAATAACTTATTGTGGACCGGAGAGAGTAATACAGTTTTTTGGTTAGCGAATCCAATTA 686
ATTAGACATTGTGTATGTCCAGTTAACCGCTTCCCTCCACTTCTTTCGAATCTATCTCTCGATAGAAA 756
ATTGTGATACTTTCGCACTTCTATCAGAGGACTTTTTTGTGTTTCCATGTIACAATCTGTCAATTTTCGATGG 826
GGAGATTTCCAGCAATAGCCATTTTATGTGTCCCAATTTAAMTTTTAACCCCATGTCCGATCAGAACTTAG 896
CCACGAGCCAGAGAAGTTTGTATGGATATGTGACTTTGTGACTIATCCGGTTIACATAATCAAGAGCTIATTT 966
TATTCAAAATTGGATATCTIAGCTIAGTATACTGGATAATTTGCATTAACAGATTTGATATAGTGGCAA 1036
CAAGAGGGACAATTGCCTTGTACCTTTATGTAAGATGATTCAAACATGATTTTTTATGTACTAATATAT 1106
ACATCCCTACTCGAATTAAGCGACATAGGCTCGAAGTATGCACATTTAGCAATGTAAATTAATCAGTTT 1176
TTGATCAAGCTAAAGCAGACTTCATAGGTGGTGGCTGGACTIAGATAACATCTTCTCTAGCACA 1246

3A. ábra (l. folytatás)

GCTTCATAATGTAATTTCCATAACTGAAATCAGGGTGAGACAAAATTTTGGTACTTTTCTCAGACTAA 1316
GTCCATGTTTGCACAACAATTAATACATGAAACCTTAATGTTACCTCAGATTAGCCTGCTACTCCCATTT 1386
TTCCTCGAAATGCTCCACAACAAGTTAGTTTCCAGTTGTTGGTATGTTGCTGCTATATATATATGCC 1456
TTGTCGTCAGTGTAAACAGTACAGATCATCAGTCAATCAAGTTTACTTAAGAANAATTAGCTAAA 1526
TACCATCGAGG HindIII
ATGGTAGCTCCAAAATGGGTTTCATTTCTTTATGATTTTGGTAAAGCTTAGCAATAAGCTCTGCCCAGC 1596
M V A P K W V F I S F M I L L S L A I C S G Q P
CTGTACCTCTGATGCCAATTAAGGCTAAGGAGCTGATCATGACAACCTCAAGCTCAGACTCTGAGTAA 1666
V T S D A I K A K E A D H D N L K A H T L S N
TATCGACCCAAAGCCTTTGAGAGGAGCCGGTGCATTTGCCATTTGGTGGTTGGCCGGTGGTGGGA 1736
I D A K G F G G G G F G I G G W A G G G G

3A. ábra (2. folytatás)

GGTGGTGGAGATGGTGGTGGTTCGACACACCCCTAAGTACCGTTATAACCTGGCTGCAGTATCCATGGTT 1806
G G G D G G S D T P N Y G Y N P G C S I H G C

GCACGTCCCTGGCTTGGTTCCTACCTAAACCGTCTTGGTGTCCAGTCTATCCCTGGTTGGG 1876
T V P G F G F L P K P V F G V P V Y S P G C G

cDNA clone TA29 --> ACAATCC

CTATGTGTCCGGCGATATTCCTACTGGAGGATGACTGATCCAAATCAGAGGATATCACAATCC 1946
Y V C P A D I P T G G M T E S K I T G I S Q S

GCTAGACTATACCGTTGCCAAGCCAGCCCAATATGTGTGACAGTAAAGCTGTAATGAGCTTCTCTAC
GCTAGACTATACCGTTGCCAAGCCAGCCCAATATGTGTGACAGTAAAGCTGTAATGAGCTTCTCTAC 2016
A R L Y R C K P G P N M C D S K D C N E L L L H

ACTTGTITTCOAATGCCAAGACAACATGACATAAACAAGACATCTAAGATATGGAGGACCCCGAGG
ACTTGTITTCOAATGCCAAGACAACATGACATAAACAAGACATCTAAGATATGGAGGACCCCGAGG 2086
F V F P M Q D K H D N K Q. E H L R Y G G R R G

3A. ábra (3. folytatás)

TATAGGTCACGTGGAGGAGTGGCGGTTTGGCAATGGTTTGGCTTGGCTGGGGTGGTGGTGGCC
TATAGGTCACGTGGAGGAGTGGCGGTTTGGCAATGGTTTGGCTTGGCTGGGGTGGTGGTGGCC 2156
I G L T V G G V G G F G I G F G A W G G G G G

GGAGGAGGTGGTTCGATGCCCCCTGGTTGTAGTAAAGATGGGTGTGACCCCTGGTTTGGCTGTCCCC
GGAGGAGGTGGTTCGATGCCCCCTGGTTGTAGTAAAGATGGGTGTGACCCCTGGTTTGGCTGTCCCC 2226
G G G G S D A P G C S N D G C D P G F G C P P

EcoRI

CGCGCTGGTTATCCATGTCTGCCAACAATCCTAGTGGAGGAATAAGTGAATTCATATCTCAGGATT
CGCGCTGGTTATCCATGTCTGCCAACAATCCTAGTGGAGGAATAAGTGAATTCATATCTCAGGATT 2296
G C G Y A C P A N N P S G G I T E F H I S G L

<-- end cDNA clone TA29

ATCAGATTGGATGGACCTTACAGATGTAGCCAGATAITGIGTGAAGTGAAGTGTAACTTCTT 2366
S R F D G P Y R C R P D M C E S E D C N E L L

CTACACTTGTTCCTCCAAATGCCACACAAACATGACAACCCAGATCATATAGTAAAGGATGTGTG 2436
L H F V S P M Q H K H E N R R H D H I V E R S D E

3A. ábra (4. folytatás)

AGGAGGAGGCCATCATCAGTCAAGCAGCATAAAGCGAGACATCATAACTAGGCTCTCCACAAAC 2506

E E A H H Q S K Q H K D E D I I N *

CAAAAAAAGGAACATAATATGTAGCTTCAGCCAAAAAAGTGTATACACTGTCTAAGAATACTCAGCTC 2576

CAACGAACTTAATAAAGTAGTTAGAGTGGATTGGGATATAATCAGTTGGACAATTTGCTAAACCTCC 2646

TCATGCACTGTAAAAATAGACTTGTACTAGTATTTGGAAATAATGCTGAATAATTTTGTGTACTTT 2716

GOCTAATGTC AATCAGCAATTCCTCTGTAGTTAGAAATGAAGGAGATCAGGAAACTCAT 2786

ATTTAAGGATGAATAATTTAAGATCCGAGCAGTCACANTTTATAGTACCAGGAAATAATCTAT 2856

AGGATCAGAGACTTTTGTATTATCAATTAAGGAGCAACTGGGAAATGTGAATGATGACAT 2926

AATGCTGAAGCTATTGATCAGATGTTGGATTGATTTGGTAGGAGCAATATGATTTAAGATTATTTC 2996

AACAAGATGCCATAAAGTAGCATATCATTGTAAATTTACATTATTACCTCAACTCAGGAGATTGT 3066

3A. ábra (5. folytatás)

CAATTTACCCCTCAAAACAAGTTTAAAGCCCTTCAGTCTCTCAACCACAGTGGCCACCTGCCCAATTGCC 3136

AGCACTTCCCGGGGAGATGCTGTGGAGTTTGGGTACAAATCCACCTCGAAATCAGACATTGATG 3206

EndIII

TTTCCTTCATCATCTCCGGTCCAAATTCCTTTTACTTTGGCAGTGGGATGATCAAGCTT 3266

3A. ábra (6. folytatás)

1 aaagctttacttaagaaattagc taaaa tggtagctccaaaa tggctttcatttcttctttatgat tttg
73 taagcttagcaatagctctggccagcc ttaaccttgatgcaat taaggc taaggaa gctgatcatgaca
145 acctcaagctcacactctaa gtaatatcgacaccaaa ggc tttggaggagggc ggtggattggcattggctg
217 gtgttgggcccggagg tgg tgg tgg tgg tctgacgccc taacta cgg t tataa ccc tggc tgcagta
289 tccgtggtgcactg tccc tggcttggcttccctacc taa tcc tgg ttttgg tgt tccag tctattcccctg
361 gtgtggctatgtgtccagccgatat tctgctgaaggaa tga ctgaa tccaaaaa tccacaggaa tatacag
1
Ac

3B. ábra

721 CCGCCCTGTGGTTATGCATGCTCTGCCAACAAATCCTAGTCGAGGAAATAACTGAATTCATATCTCAGGATTAT
|||||
|||||
288 CCGCCCTGTGGTTATGCATGCTCTGCCAACAAATCCTAGTCGAGGAAATAACTGAATTCATATCTCAGGATTGT
793 cacglaacaatggaccttacagatgtaggcagatatgtgtgagagtgaaattgtaatgaacttctactac
|
|
360 tggcag
865 actttgtttctccaagtaacacacaacgagaaacgacatgatcatagtagaaagaaatgaagaggagag
937 aagctcatcatcagccaagcatcataaagcgaagacatcataaactag

3B. ábra (2. folytatás)

10 20 30 40 50 60 70
CGCAGCGGGG GCGCGCGGGG GCGCGCCAAA GATGTCATA ACTTCCAAGT TCTTCTAGT TATGTCCCTA

80 90 100 110 120 130 140
GGACTAATAG TTTTACCAC ATTTCACCTT CCTGATCAAC ACTACCAATC TACCAACAT GACCTGGAC

150 160 170 180 190 200 210
GTTCTGATAC TAATCAGCTA AACATGANTG GTTACTTAGC CATGGAAACCA GCACCACCAG ACCTTGAGCA

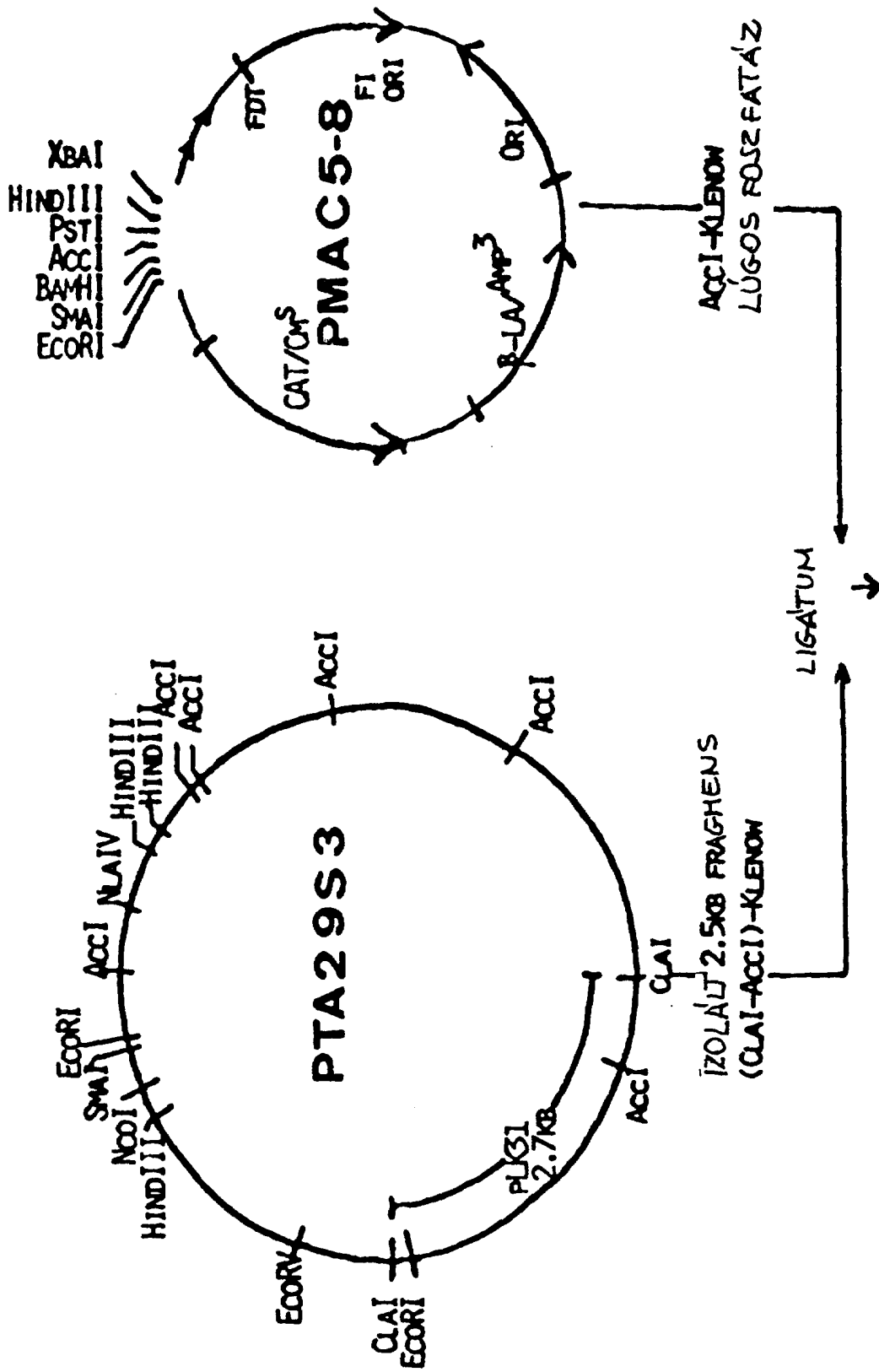
220 230 240 250 260 270 280
AGAAGCCCAT ATGTGGGCT TGAAGCAGA CTCGATGCC ATCGAACCCAG CACCACCAGA CCTTGAGCAA

290 300 310 320 330 340 350
GAAGTCATA TGTGGGGCTT GAACGAGCAC TCGATGCCA TGGAACCCAG ACCAAGTTT GACCTAGAG

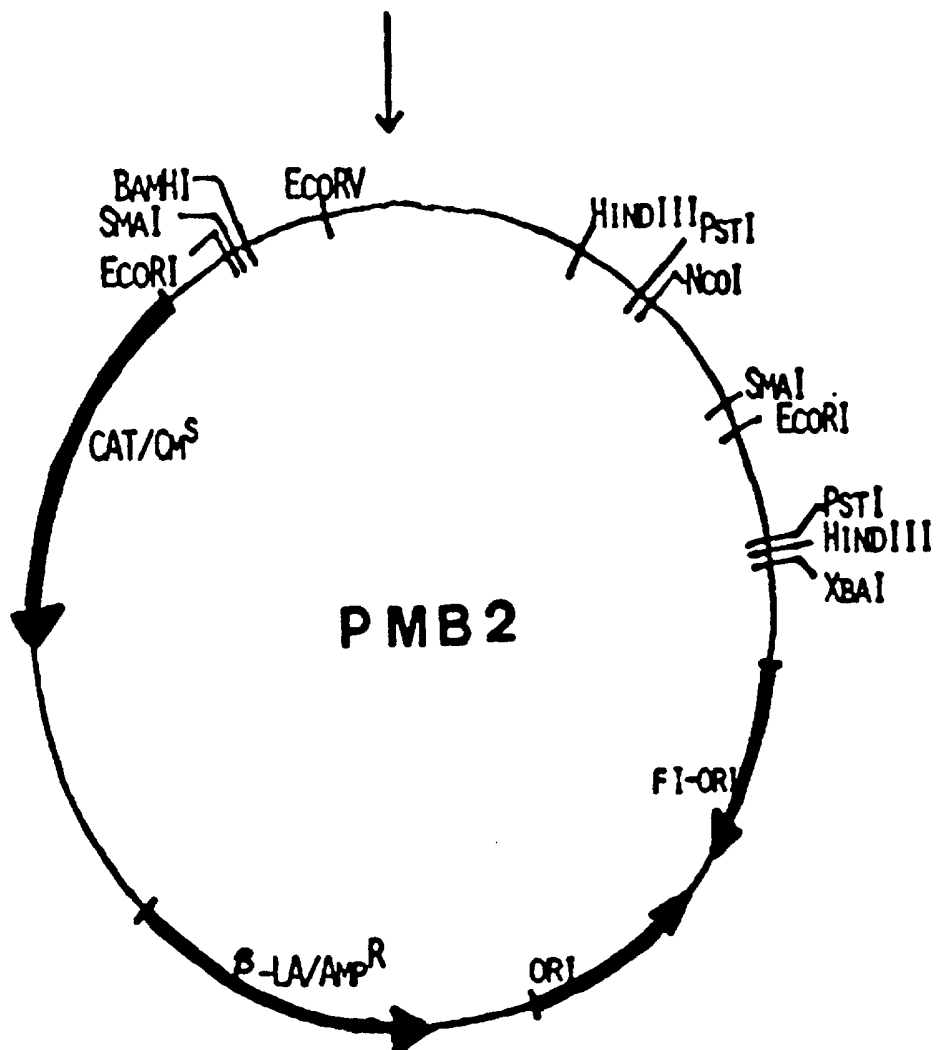
3C. ábra

360 370 380 390 400 410 420
GCCAGAGCCA ACATGAGCCAT GAGTCAGACT TGAGCCCTAGT AACTTAGAAA ACATGATTAG CACCAGAAATA
430 440 450 460 470 480 490
GAATTAACTT GGAAGATGGT GCATTATTGT ACTATAGTCC CTATTCTTAA GTTGTGGATC AATAATAAAG
500 510 520 530 540 550 560
CTCCATTGTC CTAAATTTC ACCGAGTTA AATTATCACG TTAATAATA GTACCCCCCC CCCCCCCCCCCC

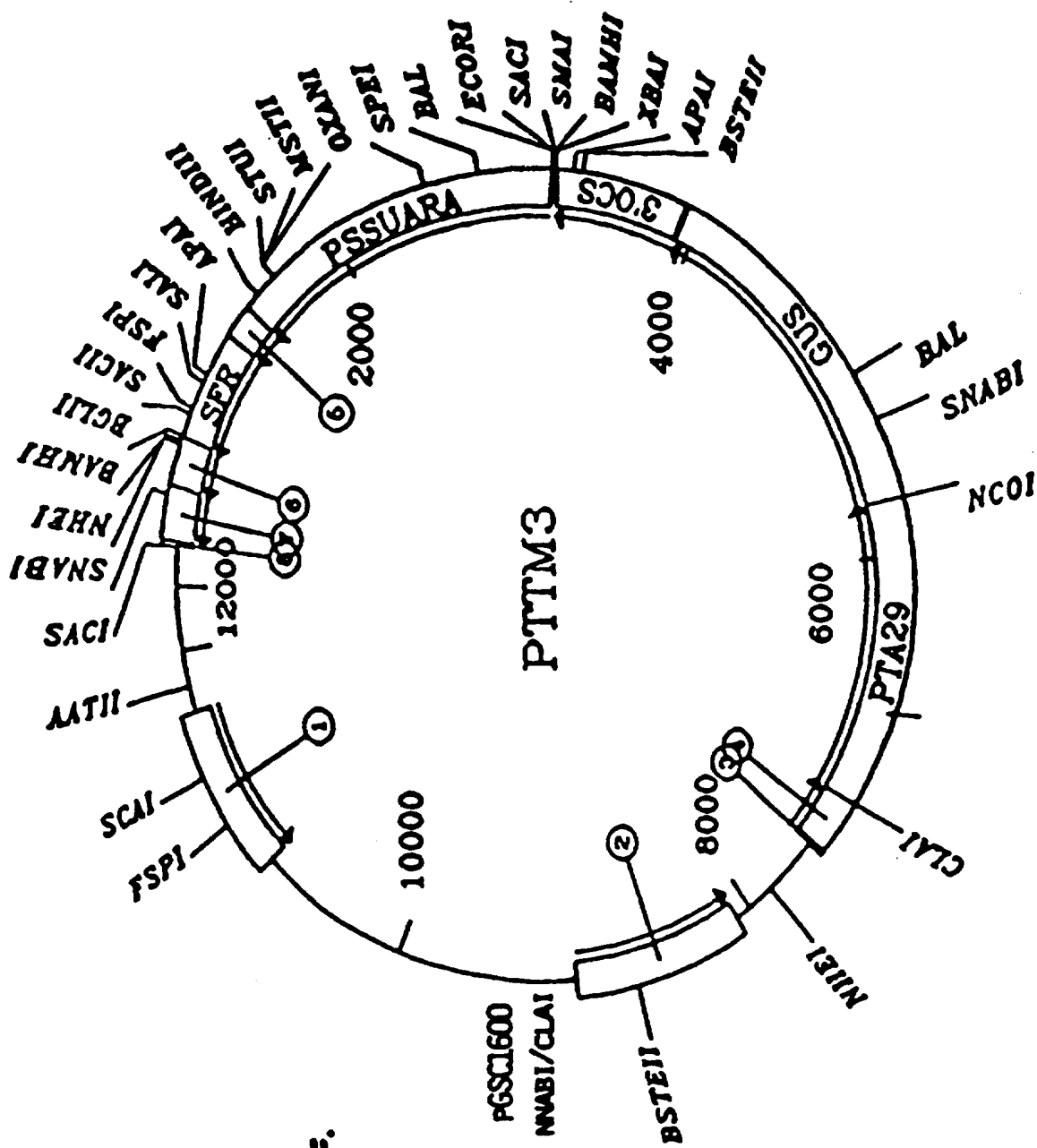
3C. ábra (folytatás)



4A. ábra

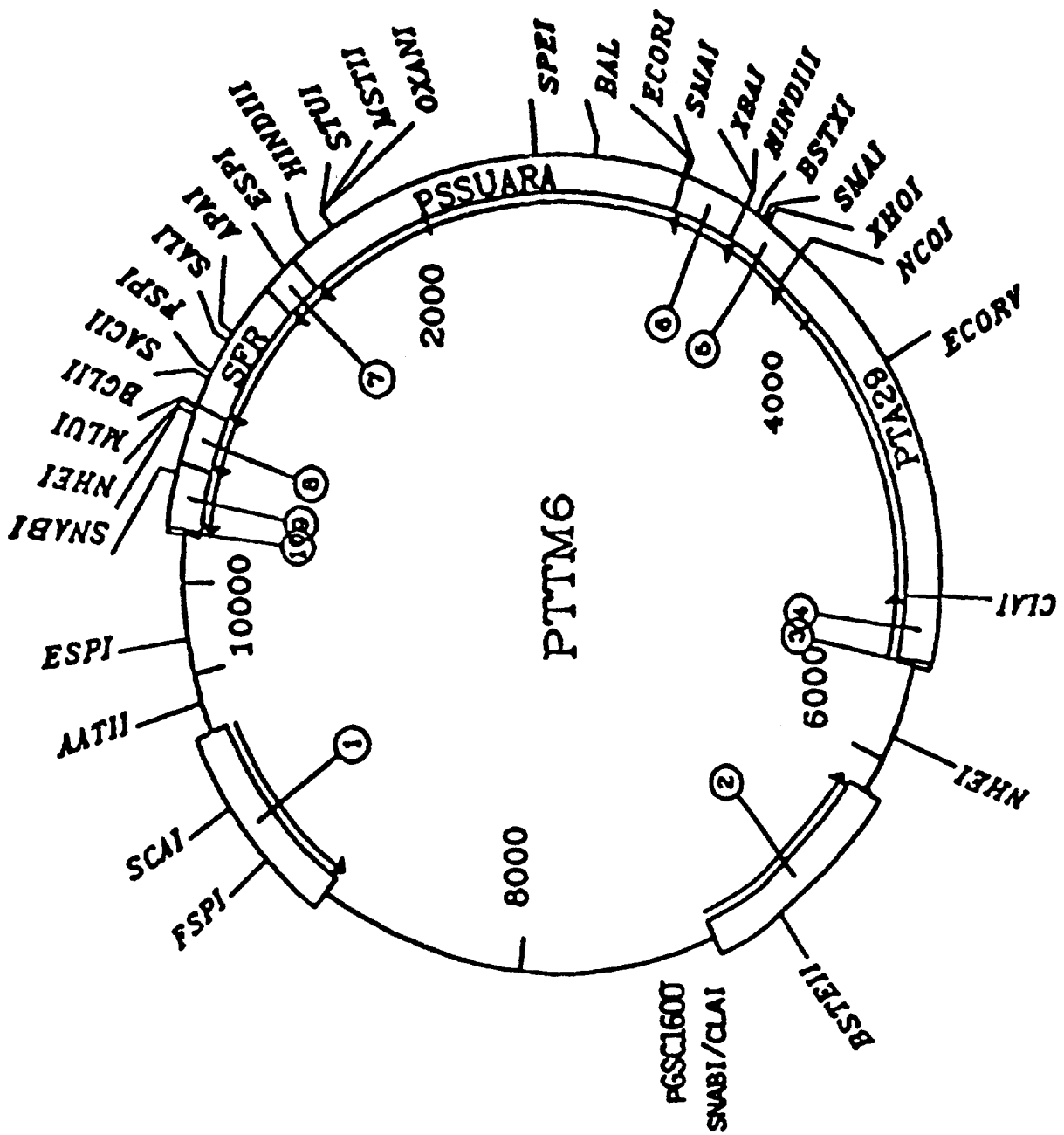


4A. ábra (folytatás)



- 1 BÉTA-LAKTAMÁZ
- 2 SM-SP-AD.-TRANSZ.F.
- 3 LB.
- 4 T-DNS
- 5 TP
- 6 3' NEG T7
- 7 T-DNS
- 8 R.B.
- 10 PTA29S3/PTB3

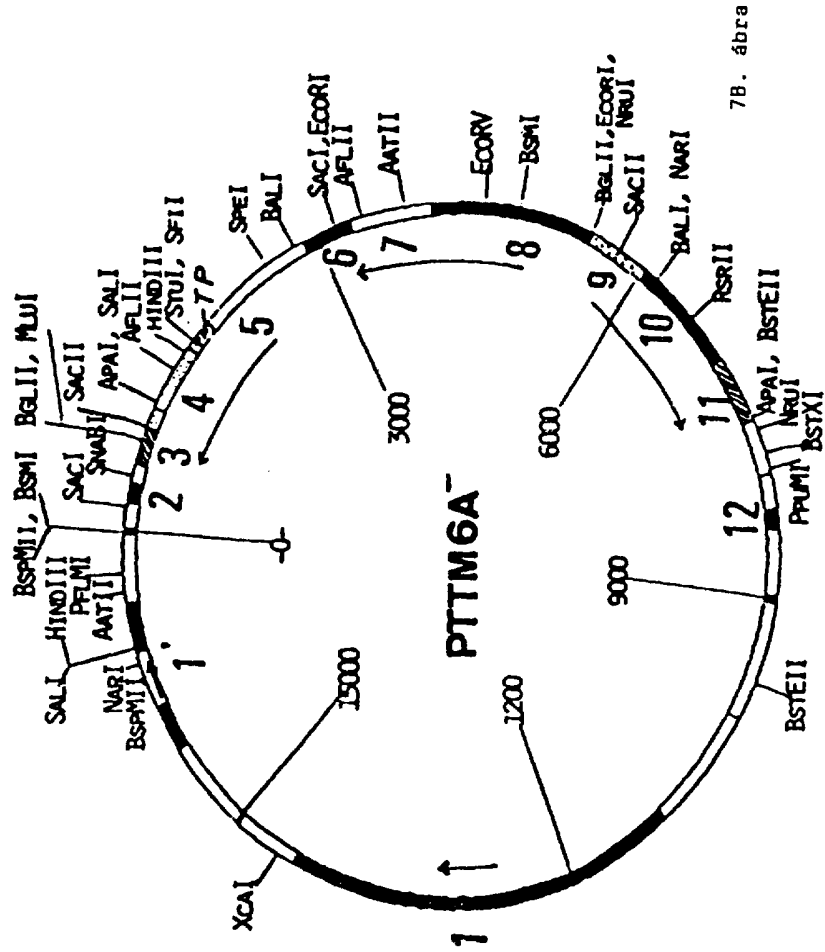
5. ábra



- 1 BÉTA-LAKTAMÁZ
 2 SM-SP-AD. TRANSZF.
 3 LB
 4 T-DNS
 5 RNS SZETI.
 6 3'VEG NOS
 7 TP
 8 3'VÉG-T7
 9 T-DNS
 10 RB

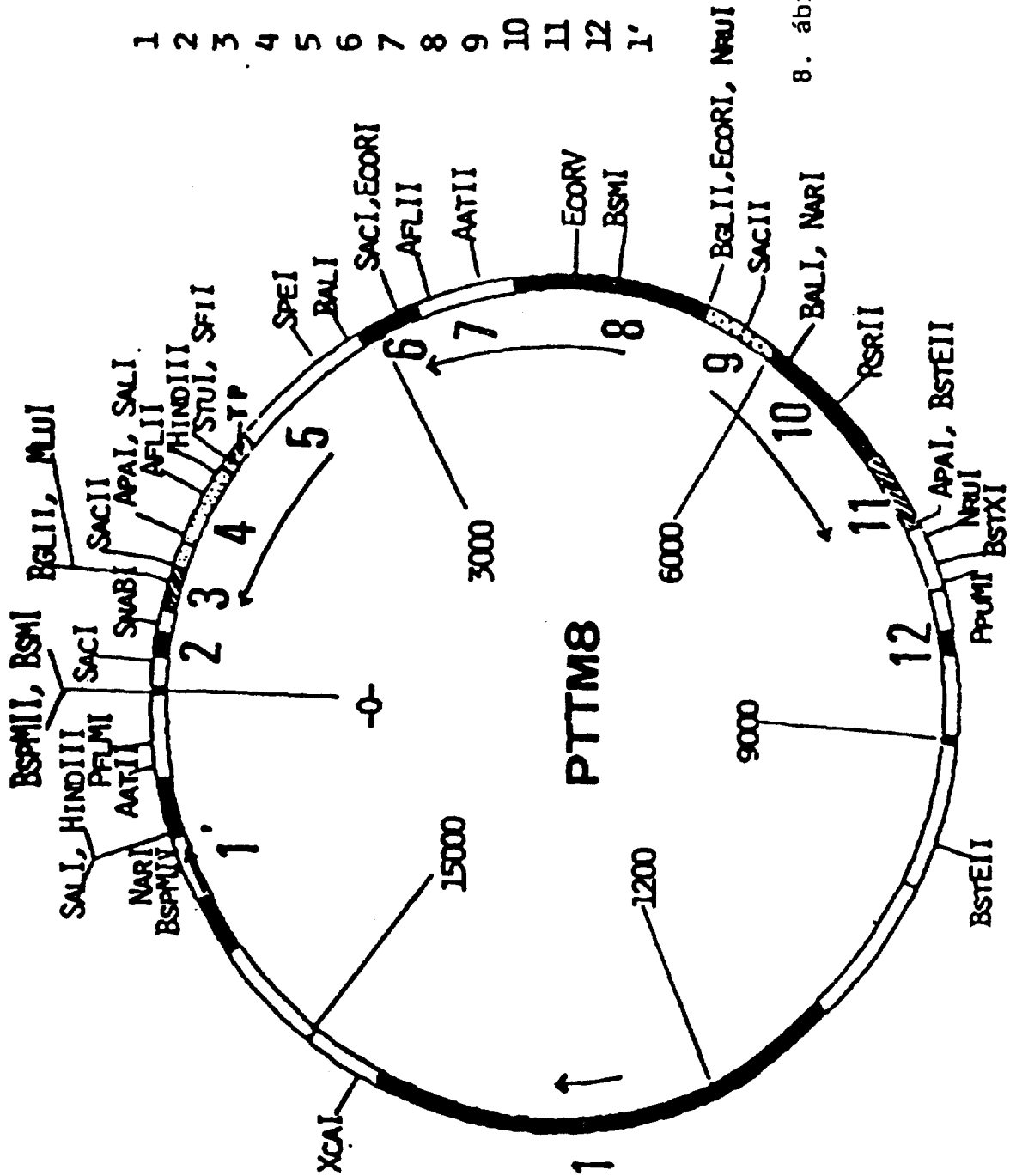
7A. ábra

- 1 : PVS1 ORI
- 2 : JOBB HATÁR
- 3 : 3'VÉG-T7
- 4 : SFR
- 5 : PSSUARA
- 6 : 3'VÉG-NOS
- 7 : R/NAZETI
- 8 : PTA29
- 9 : NOS PROMOTOR
- 10 : NPT11
- 11 : 3'VÉG-OC3
- 12 : BAL HATÁR
- 1' : β -LACTAMÁZ
 BEÉPÍTÉSSEL

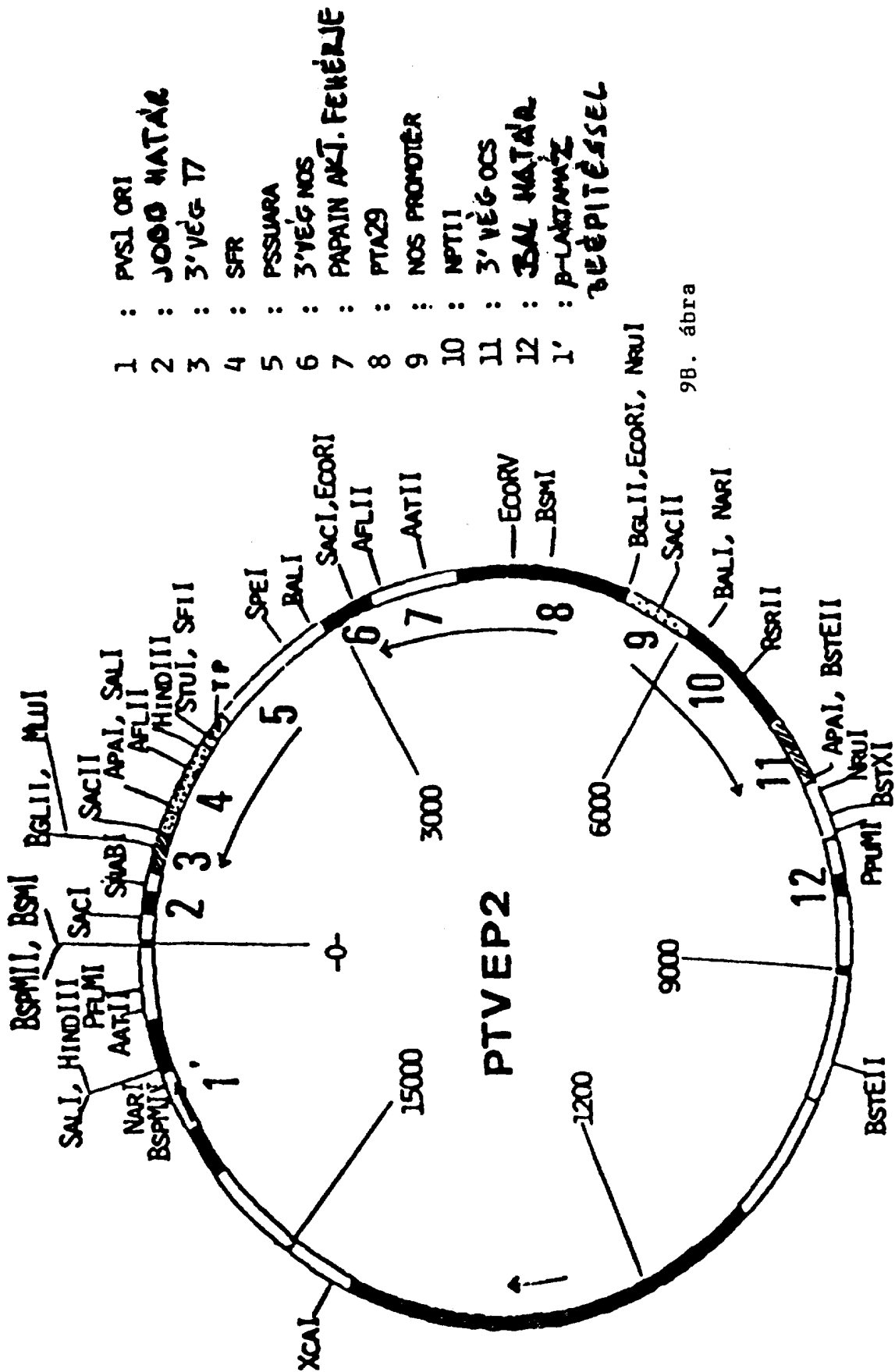


7B. ábra

- 1 : PVS1 ORI
- 2 : **JOBB HATÁR**
- 3 : 3' VÉG T7
- 4 : SFR
- 5 : PSSUARA
- 6 : 3' VÉG NOS
- 7 : BARNÁZ.
- 8 : PTA29
- 9 : NOS PROMOTER
- 10 : NPTII
- 11 : 3' VÉG OCS
- 12 : **BAL HATÁR**
- 1' : B-LAKTAMÁZ **BEÉPÍTÉSSEL**

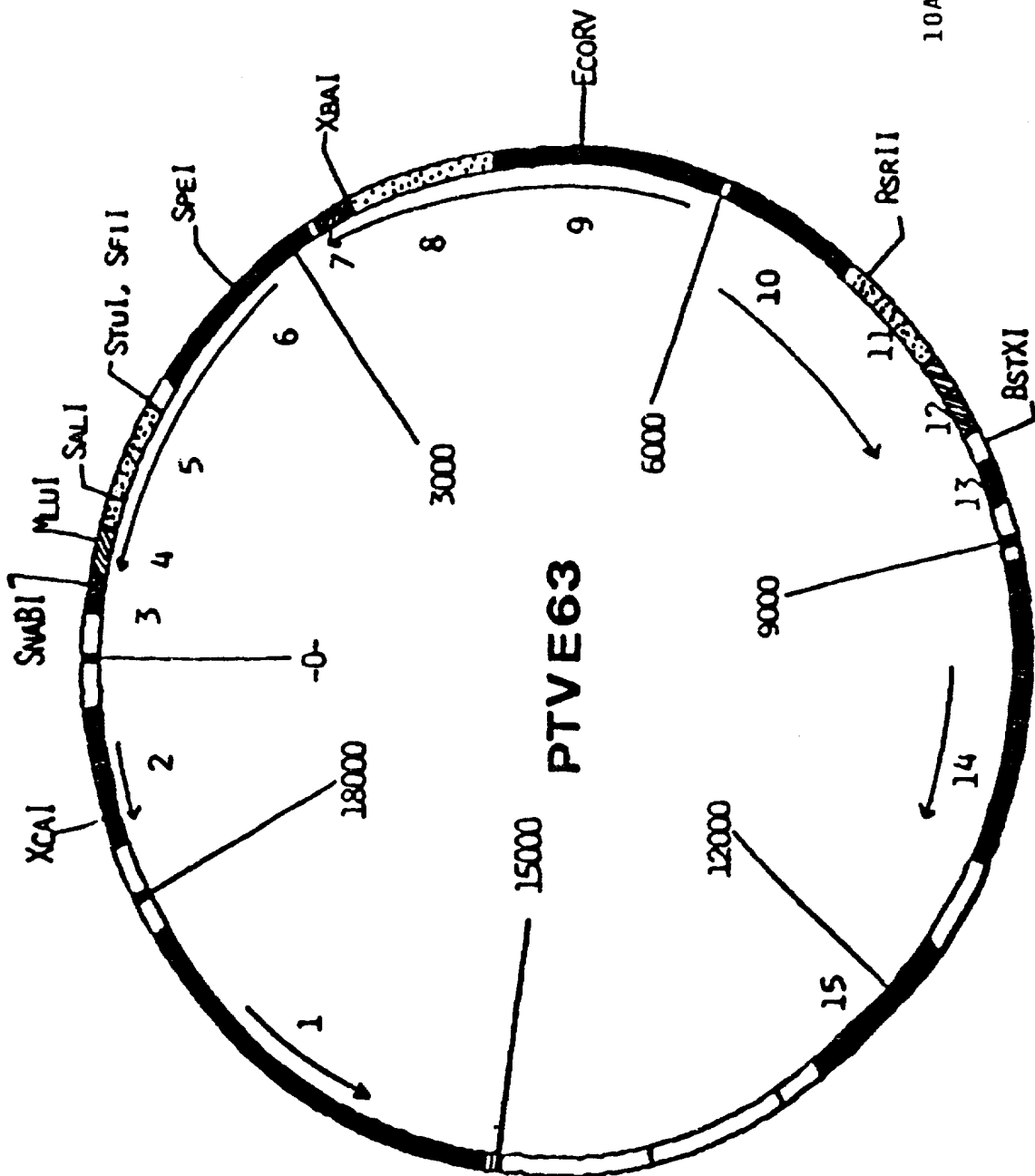


8. ábra

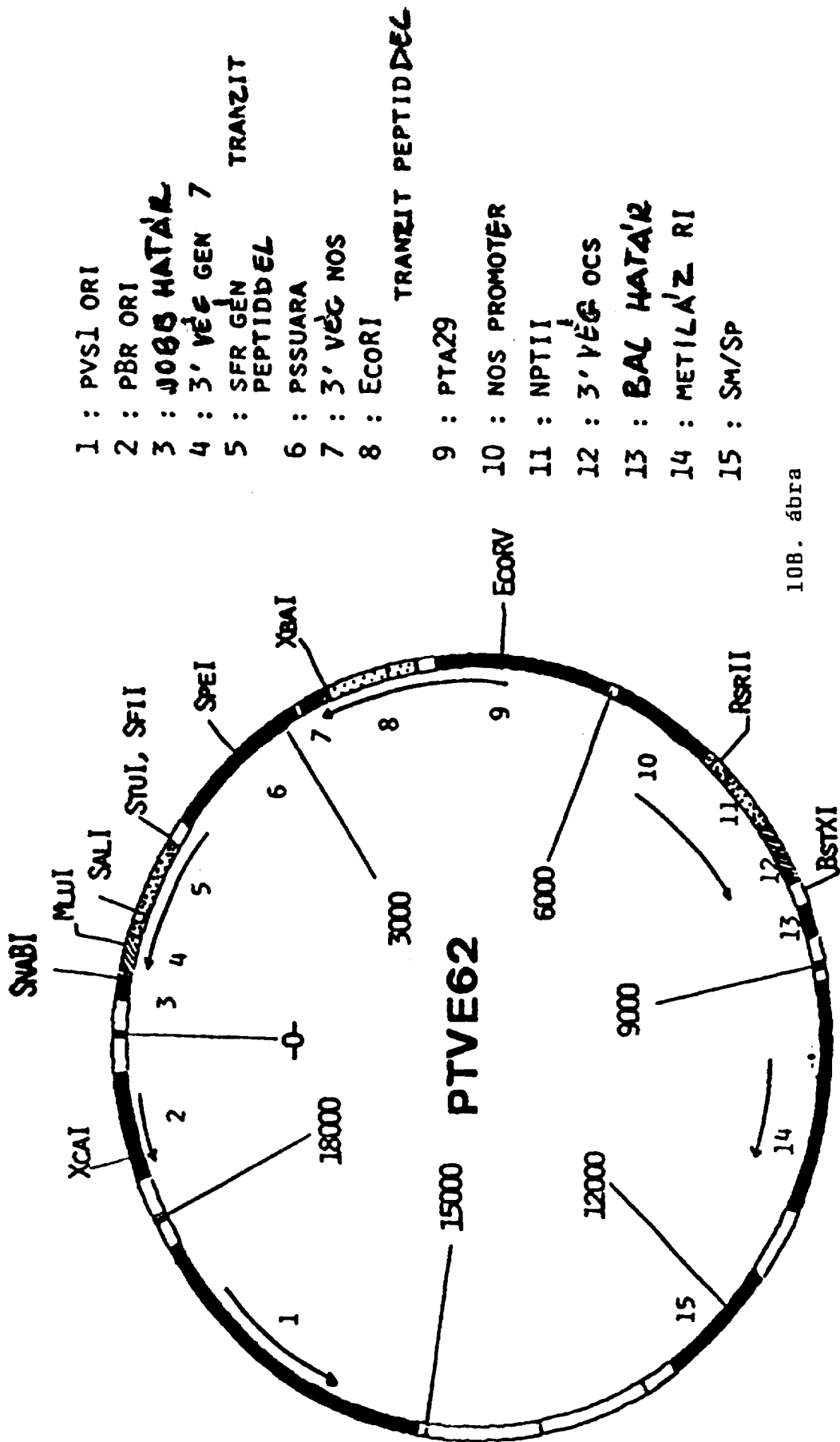


9B. ábra

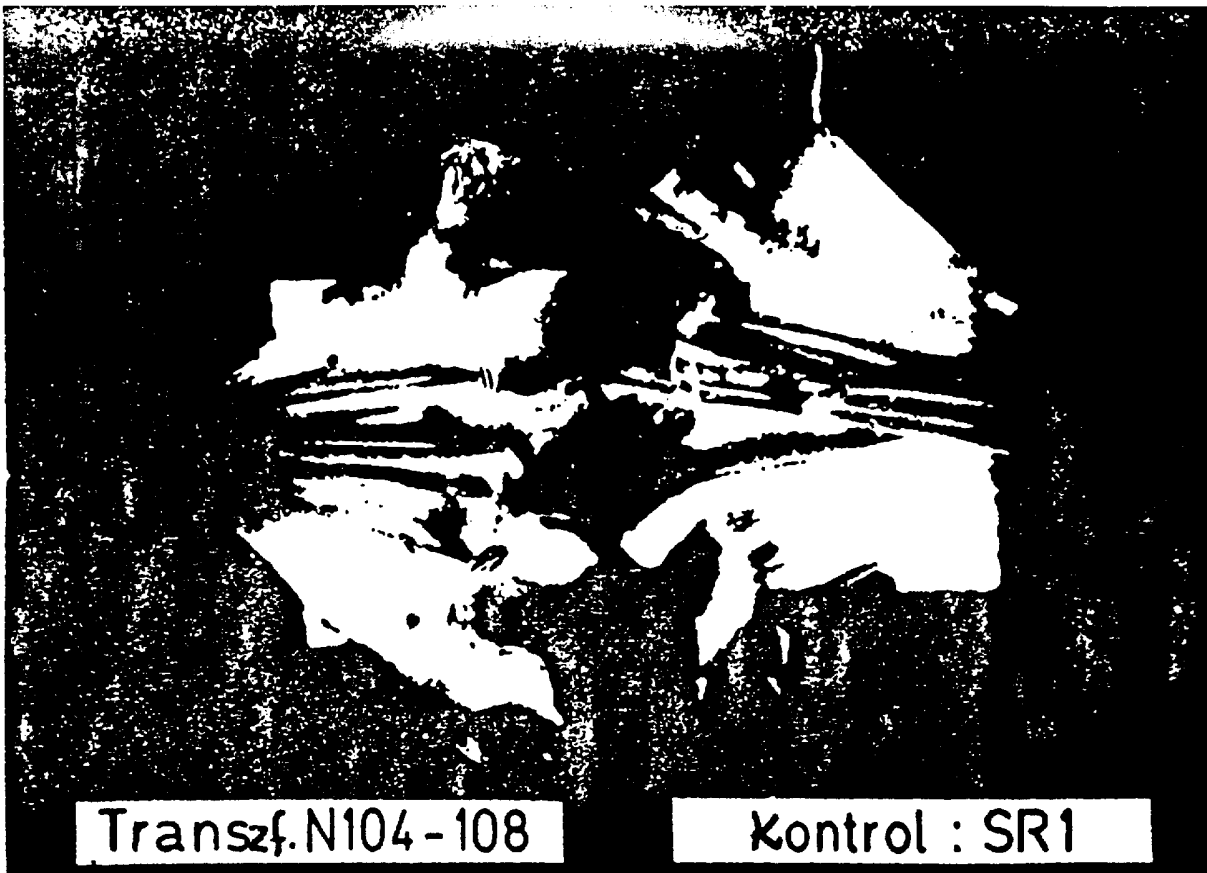
- 1 : PVSÍ ORI
- 2 : PBR ORI
- 3 : **JOBB HATÁR**
- 4 : 3' VÉGÉN 7
- 5 : SFR GEN PEPTIDDEL
- 6 : PSSUARA
- 7 : 3' VÉG NOS
- 8 : ECORI
- 9 : PTA29
- 10 : NOS PROMOTÉR
- 11 : NPTII
- 12 : 3' VÉG OCS
- 13 : **BAL HATÁR**
- 14 : METILÁZ RI
- 15 : SM/SP



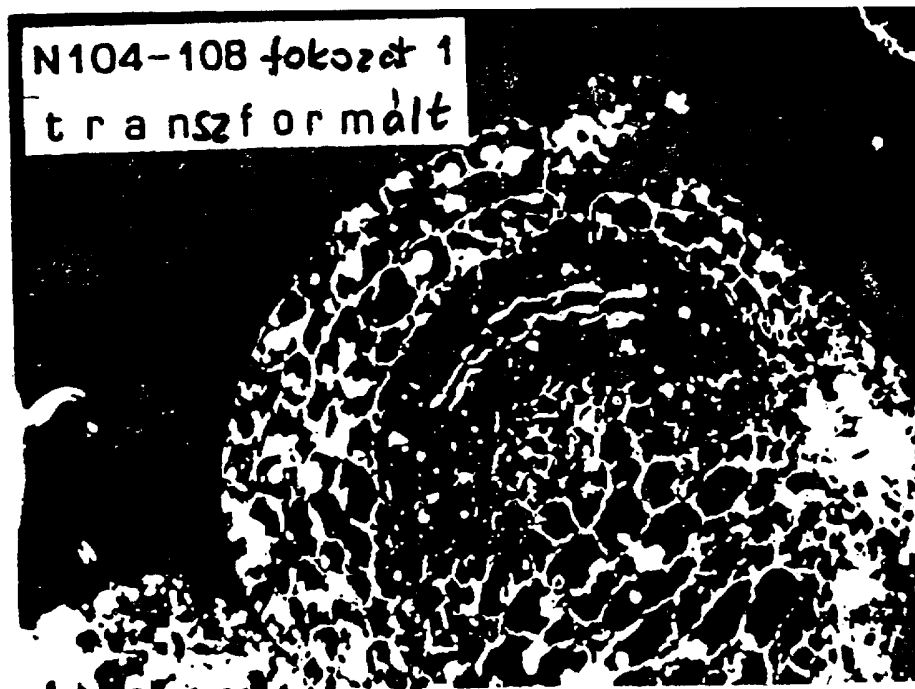
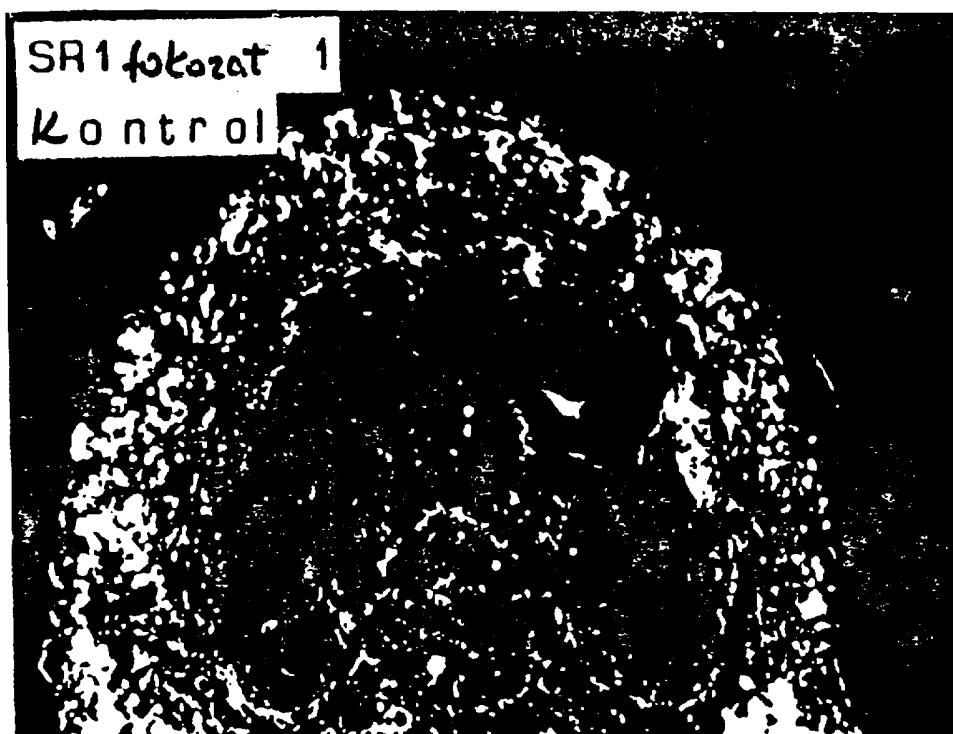
10A. ábra



10B. ábra



11. ábra



12. ábra