(19) **KG** (11) **324** (13) **C2**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)[7] **C12N 15/82; A01H 1/02, 5/00; A01N 63/02**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(21) 960425.1
(22) 28.06.1996
(31) 9205474.1
(32) 13.03.1992
(33) GB
(86) PCT/GB 93/00514 (11.03.1993)
(46) 01.03.2001, Бюл. №2
(71)(73) Эдванст Текнолоджис (Кембридж) Лимитед (GB)
(72) Эткинсон Хауард Джон, Боулс Дайэнна Джой, Гэрр Сэра Джейн, Мэкфэрсон Майкэл Джон (GB)
(56) WO 92/04453, 1992

(54) **Способ продуцирования устойчивых к яванской галловой нематоде растений, устойчивое к яванской галловой нематоде растение и химерный ген**

(57) Изобретение относится к сопротивляемости растений разрушающим воздействиям, вызываемым заражением яванской галловой нематодой, в частности, к способу продуцирования устойчивых к яванской галловой нематоде растений, к устойчивому к яванской галловой нематоде растению и к химерному гену. Описание раскрывает способ продуцирования устойчивых к яванской галловой нематоде растений, в котором в растении, зараженном яванской галловой нематодой, идентифицируется ген, который выражается в гигантских клетках и/или сопутствующих гипертрофических клетках корневых утолщений растения, берется промотор указанного гена и сливается с кодирующей последовательностью, что создает химерный ген, который кодирует молекулу, неблагоприятную для одной или более чем одной клетки (или нематоды) из числа следующих; гигантские клетки корневого утолщения, гипертрофические клетки корневого утолщения и галловые яванские нематоды, и далее растение трансформируется указанным химерным геном. 3 с. и 10 з.п. ф-лы.

Изобретение касается сопротивляемости растений разрушающим воздействиям, вызываемым заражением яванской галловой нематодой.

Яванские галловые нематоды (Meloidogyne spp) являются основными болезнетворными бактериями для многих полезных растений, например, для овощных культур, пищевых бобовых культур, табака, томатов, арбуза обыкновенного, винограда, земляного ореха и хлопка.

Химическая борьба, агротехнические приемы и использование устойчивых разновидностей растений являются основными способами в борьбе с нематодами, которые в настоящее время доступны и очень часто применяются совместно друг с другом для борьбы с яванской галловой нематодой. Существует необходимость в повышении эффективности борьбы с нематодами,

поскольку указанные способы очень часто не отвечают требованиям защиты сельскохозяйственных культур. Нематоды вредны для окружающей среды по своему воздействию и борьба с ними не всегда эффективна. Агротехнические приемы борьбы приводят к скрытым потерям у садоводов, проявляемым различным образом. Широкий диапазон хозяев яванских галловых нематод ограничивает доступность не являющихся хозяином культур и экономическом отношении. Эффективные устойчивые сорта часто недоступны и те сорта, которые садовод может использовать, иногда усовершенствуют за счет чувствительных сортов при низких плотностях яванских галловых нематод. Кроме того, сопротивляемость может быть потеряна при высоких температурах почвы и тропических и субтропических условиях. Когда яванская галловая нематода вторгается в корень растения, она мигрирует внутрь клеток до тех пор, пока не достигает корневой меристемы. В таком случае секреции глоточных желез впрыскиваются через заостренный зонд нематоды в клетки в области меристемы. Это приводит к ненормальному развитию данных клеток, которые должны разрываться, результате чего будет происходить деление ядер без деления клеток. Таким путем происходит образование многоядерных клеток, известных как "гигантски клетки". Образованию этих гигантских клеток сопутствует расширение окружающих клеток, известных под названием гипертрофических клеток, на которые нематоды не воздействуют при непосредственной пенетрации через зонд. Эти гигантские клетки и окружающие их гипертрофические клетки совместно друг с другом образуют питающий сайт яванских галловых нематод. Наблюдаемый узелок, образующийся на зараженном корне, состоит из таких гигантских клеток и сопутствующих им гипертрофических клеток, которые являются результатом множественности заражения нематодами. Механизмы образования гигантских клеток одинаковы у всех высокочувствительных разновидностей растений.

После инидуцирования гигантских клеток яванская галловая нематода теряет двигательную способность по мере того, как происходит питание нематодой на гигантской клетке, и нематода становится связанной, препятствуя питанию, развитию и воспроизведению на питающем сайте.

В Международной патентной заявке WO 92/04453, 1992, описывается способ борьбы с корневыми кистевыми нематодами. В статье под названием "Cene Expression in Nematode-Infected Plant Roots", авторов Curr et al., (1991) описывается способ, имеющий отношение к картофельным кистовым нематодам, получения комплементарной ДНК (кДНК) из информационной РНК (мРНК), которая находится в синцитиуме растения, которое было заражено корневой кистовой нематодой.

Задачей изобретения является способ продуцирования стойких к яванской галловой нематоде растений, где в растении, зараженном яванской галловой нематодой, идентифицируется ген, который выражен в гигантских клетках и/или сопутствующих им гипертрофических клетках корневых наростов растений, выбирается промотор указанного гена и слипается с кодирующей последовательностью, давая химерный ген, который кодирует молекулу, неблагоприятную для одной или нескольких клеток (нематод) из числа следующих: гигантские клетки корневых утолщений, гипертрофические клетки корневых утолщений и яванские галловые нематоды, и затем растение трансформируется указанным химерным геном.

Растения, которым может сообщаться стойкость к яванской галловой нематоде, согласно изобретению, включают: овощные культуры, бобовые растения, табак, съедобные фруктовые и ореховые растения и хлопок. Что касается овощных культур, то изобретение может быть применимо для моркови, томатов.

Поскольку механизм продуцирования гигантских клеток одинаков у всех высокочувствительных видов растений, то способ данного изобретения фактически применим для всех таких видов, которые могут трансформироваться в соответствии с трансформационным этапом по способу изобретения.

Способ данного изобретения применим для растительных видов Meloidogyne, включая, но, не ограничиваясь растительными видами M. incognita, M.javanica, M.arenaria и M.hapla.

Идентифицированный ген, выбранный из зараженного растения, является предпочтительно таким геном, экспрессия которого происходит не ранее того, как нематода теряет свою двигательную способность.

Последовательности (в химерном гене), которые должны быть выражены под контролем указанного промотора, включают одну или более чем одну из числа следующих:

1. Кодирующая последовательность молекулы, которая вызывает некроз гигантских клеток и/или гипертрофических клеток.

2. Кодирующая последовательность молекулы, которая вызывает некроз яванской галловой нематоды.

3. Кодирующая последовательность любого из ряда ферментов, которые обладают активностью, отрицательно влияющей на метаболизм.

4. Антисенс специфическому гену питающего сайта.

5. Антисенс кодирующей последовательности фермента, являющегося критическим для клеточного метаболизма растения.

Необходима гарантия того, чтобы был выбран такой ген, который выражается лишь в гигантских клетках и/или сопутствующих им гипертрофических клетках, поскольку если ген выражается на другом сайге, то продукт экспрессии химерного гена, продуцированный на другом сайте, может оказывать отрицательное воздействие на трансформированное растение.

Рост и инфекционное заражение табачных растений.

Семена табачного растения C319 проращивали на компосте Fisons F1 при нижеследующих условиях. Сила света от 4500 до 5000 Люкс, 16-часовые периоды светового освещения, чередующиеся с 8-часовыми периодами темноты, температура от 20 до 25°C. Через три недели саженцы слегка промывали водопроводной водой для удаления почвы, и растения переносили в мешочки (по два растения на мешочек, Northrup-King) и выращивали еще в течение недели при 25°C при воздействии света силой 5500 Люкс с 16-часовыми периодами освещения чередующимися с 8-часовыми периодами темноты. Корни вынимали со дна мешочка и поддерживали их по краям бумагой из стекловолокна Whatman GF/A. Затем нематоды трехдневного возраста (M.javanica) подавали к концам этих корней в виде 10 мкл аликвот (50 нематод) и сверху накладывали на концы корней второй лист бумаги GF/A для полной инкапсуляции корневого конца. Через 24 ч после инфекционного заражения бумагу GF/A удаляли для гарантии синхронного инфекционного заражения. Через три дня после заражения корни отсекали (оставляя сзади здоровый корень и ткань корневого конца) и тотчас замораживали в жидком азоте. С 80 инокулированных растений можно было собрать от 0.5 до 1 г инфекционно зараженной корневой ткани.

Окрашивание с целью визуализации нематод в зараженных корнях.

Для определения качества инфекционного заражения определяли число нематод (инфицирующих) на корневой конец. Корни собирали через три дня после заражения растений и погружали на 90 с в лактофенол, содержащий 0.1 % Хлопковый синий при температуре 95°C. После пятиминутной промывки в воде корни помещали в лактофенол при комнатной температуре сроком на 3-4 дня для осветления. Окрашенные нематоды визуализировались с помощью оптического микроскопа.

Выделение РНК из здоровой и инфекционно зараженной корневой ткани.

Корневую ткань измельчали в тонкий порошок с помощью ступки и пестика с одновременным охлаждением (жидким азотом). Затем аликвоты объемом, примерно, 100 мг переносили аналогичным образом в охлажденные пробирки Эппендорфа и вводили 300 мкл горячего фенольного экстракционного буфера (50 % фенола, 50 % экстракционного буфера: 0.1 М хлорида лития, 0.1 М трис-HCl, pH=8.0 (комн. темп.), 10 мМ ЭДТУ, 1 % додецилсульфата натрия), и осуществляли термостатирование в течение 5 мин при 80°C. Затем вводили равный объем хлороформа, и гомогенат подвергался микроцентрифугированию в течение 15 мин при 4°C. Водную фазу затем экстрагировали 600 мкл фенола/хлороформа и подвергали микроцентрифугированию, как указано выше. После этого, водную фазу снова удаляли, и затем РНК осаждали равным объемом хлорида лития, при 4°C в течение ночи. Осадок уплотняли микроцентрифугированием в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали в 70 %-ном этаноле. Уплотненный осадок затем лиофилизировали, повторно суспендировали в DEPC, обработанном водой, и анализировали с помощью спектрофотометра. Качество РНК определяли посредством денатурирующего гель-электрофореза (данный метод принят Shirzadegan et al., 1991).

Субтрактивное клонирование инфекционно специфических кДНКаз.

Поли(А) $^{+}$РНК (мРНК) выделяли из 200 мкг образцов РНК (суммарно) от здоровой и зараженной C319 корневой ткани с использованием магнитных олиго dT Динасфер согласно инструкции изготовителя. Синтез первой нити ДНК осуществлялся непосредственно в зоне процесса на связанной Динасферами фракции поли(А)$^{+}$ от здоровой ткани. Это драйверная ДНК. Синтез первой и второй нити осуществляли в месте основного процесса на связанной Динасферами фракции поли(А)$^{+}$ от инфекционно зараженной ткани. Это мишеневая ДНК. Все реакции кДНК осуществлялись с использованием комплекта синтеза кДНК Pharmacia и согласно

инструкции изготовителя. Три олигонуклеотида, SUB21 (5'CTCTTGCTTGAATTCGGACTA3', SUB25 (5TAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACA3') (последовательность от Duguid и Dinauer, 1990 г.) и LDT15 (5'GACACAAGCGGATCCd$(T)_{15}$3') (O'Reilly et al., 1991 г.) киназировались полинуклеотидокиназой Т4 согласно Maniatis и др., 1992 г. Затем SUB21 и SUB25 гибридизировались, образуя линкер, который затем сшивался с мишеневой ДНК лигазой Т4 ДНК согласно King и Blakesley (1986 г.). После этого несущие мишень сферы интенсивно промывались с ТЕ, и вторую нить кДНК элюировали при 95°С в 5xSSC.

РНК, связанная с драйверной ДНК, которая связана Динасферами удалялась путем нагревания и элюированная мишеневая ДНК гибридизировалась с драйверной ДНК при 55°С в 5xSSC в течение пяти часов. Негибридизирующаяся мишеневая ДНК отделялась от связанной сферами гибридизирующейся мишеневой ДНК при комнатной температуре согласно инструкции изготовителя, после чего гибридизирующаяся мишеневая ДНК аналогичным образом отделялась от связанной сферами драйверной ДНК при 95°С. Элюированная при комнатной температуре мишеневая ДНК затем снова добавлялась к драйверной ДНК, и гибридизация повторялась. Этот процесс повторялся до тех пор, пока количество мишеневой ДНК, гибридизирующей с драйверной ДНК, уже больше не превышало то количество, которое не гибридизируется. Концентрации ДНК устанавливались с использованием погружного измерителя ДНК согласно инструкции пользователя.

Аликвоты конечной, элюированной при комнатной температуре, фракции использовались для усиления PCR (Eckert et al., 1990 г.) для генерации двухниточной кДНК, служащей для клонирования в плазмидный вектор. Усиление мишеневой ДНК достигалось с использованием праймеров SUB21 и LDT15, и Термического циклизатора, согласно условиям, описанным Frohman et al., 1988 г. Продукты PCR затем вшивались в выварenный Smal вектор pBluescript согласно King и Blakesley (1986 г).

Отбор субтрактивной библиотеки путем обратимого анализа Northern.

Рекомбинанты идентифицировались колонией PCR. (Gussow и Clackson, 1989 г.). Усиленные вставки подвергались блотированию Southern в трех воспроизведениях на мембранах Pall Biodyne, как описано изготовителем мембран. Предварительную гибридизацию и гибридизацию осуществляли при одинаковой температуре, составляющей 42°С, и с использованием одинакового буфера, представляющего собой 5xSSPE, 0.05 % BLOTTO, 50 % формамида. Они гибридизировались по отдельности с пробами кДНК (см. ниже) от здоровой и от зараженной ткани и с пробой, состоящей из усиленной мишеневой ДНК от конечного субтракта. Клоны, показывающие сигнал гибридизации с зараженной пробой кДНК (исключительно) или показывающие сигнал гибридизации с субтрактивной пробой, но не с пробами кДНК, отбирались для дальнейшего анализа.

Генерация пробы кДНК

Для получения высокой удельной активности проб для дифференциального отсева, проводили "холодный" синтез кДНК на общей РНК, и затем продукты синтеза подвергали мечению методом олигомечения. Образцы общей РНК в количестве 10 мкг от здоровой и зараженной ткани сначала обрабатывали 2.5 ед. ДНКазы 1 при 37°С в течение 15 мин. ДНКаза затем денатурировалась при 95°С в течение 10 мин до синтеза кДНК (согласно стандартной процедуре Pharmacia). Затем РНК удаляли в присутствии 0.4 М гидрата окиси натрия в течение 10 мин при комнатной температуре, и ДНК очищали, пропуская через колонку со спряденным Сефакрилом 400HR. Выход кДНК и его концентрацию определяли, используя погруженные устройства (Инвитроген). Продукты ДНК затем подвергали мечению, как осуществляется процедура стандартного, олигомечения Pharmacia (концентрация 35 нг/проба).

Блотирование Northern

Для определения профиля экспрессии кДНКазы, выбранной путем обратимого анализа Northern в различных тканях растения, в качестве проб использовались клоны в анализах Northern как общей, так и поли (А) $^{+}$РНК от здоровых и от зараженных корней, стеблей, листьев и цветов. Общие блоты РНК включали 25 мкг ДНК на развод, в то время как поли $(A)^{+}$ блоты включают от 0.5 до 1 мкг РНК на развод. РНК подвергались электрофорезу на формальдегидных гелях и блотировались в мембрану Pall Biodyne B, как описано Fourney et al. (1988 г.). Пробы подвергались мечению и гибридизировались с блотами, как описано выше.

Блотирование Southern

Для определения того, являются ли кДНКазы растительного или нематодного происхождения, приготавливали С319 и M.javanica ДНК, как описано Gawel и Jarret (1991 г.).

Приготавливали блоты Southern, включающие 10 мкг ДНК, вываренной с EcoRI и HindIII, на развод. Блоты гибридизировались с олигомеченными пробами, как описано выше.

Гибридизация in situ.

Для определения локальности экспрессии вызывающей интерес ДНКазы в питающем сайте, осуществляли гибридизацию in situ. Ткани от зараженных и здоровых корней погружали в парафин, секционировали и гибридизировали с пробами, как описано Jackson (1991 г.).

Выделение 5'-концевых звеньев мРНКазы.

5'-концевые звенья РНКазы, представляющей интерес, определяли до выделения их промоторных последовательностей. Это осуществляли с использованием 5' RACE, как описано Frohman et al., 1988 г.

Выделение промоторных зон.

Промоторные зоны генов, представляющих интерес, выделяли способом, носящим название Векторно-сшитые PCR. Сто нанограммов образцов вываренной с эндонуклеазой рестрикции C319 геномной ДНК сшивались в течение четырех часов при комнатной температуре (King и Blakesley, 1986 г.) с 100 нг образцов pBluescript (вываренных с ферментом рестрикции, продуцирующим сопоставимое корневое звено). Обычно использовались ферменты EcoRI, BamHI, HindIII, BG1II, XhoI, ClaI, SaiI, KpnI, PstI и SstI. Затем был получен PCR на сшивках с использованием векторного праймера, такого как 40. Секвенсирующий праймер, и праймера, комплементарного 5'-концевому звену мРНК. Продукты PCR затем клонировались и секвенсировались. Если необходимо, данная процедура повторялась с новым праймером комплементарным 5'-концевому звену промоторного фрагмента, который гарантирует, чтобы были выделены контрольные последовательности промоторов.

Построение химерных генов в бинарных растительных трансформационных векторах.

Выделенные промоторы пришивались 5' к последовательности, представляющей собой последовательность одного из классов 1-5, как подробно изложено выше, примером является античувствительность самого гена (класса 4) или гена барназы (Hartley et al., 1972 г.) (класс 1 и/или 3). Они являются построенными бинарными векторами (Bevan, 1984 г.).

Продуцирование трансгенного растения

Трансгенные растения, например табак, могут быть продуцированы методом стандартного листового диска, подвергнутого воздействию Agrobacterium, как описано Horsch et al. (1985 г.), в силу чего растение устойчиво к яванской галловой нематоде. Семена или побеги растения, являющиеся продуктом, отвечающим данному изобретению, могут заразиться для будущего использования.

Как должно быть ясно специалистам в данной области, в случае некоторых классов растений, может быть желательным или необходимым трансформация растения способом иным, чем метод с применением Agrobacterium.

Кроме того, как должно быть ясно специалистам в данной области, при заражении растений яванской галловой нематодой продукт данного изобретения -растения уже больше не поддаются указанным вредным воздействиям такого заражения и репродуцирующая способность яванских галловых нематод ухудшается, так что популяция таких яванских галловых нематод в почве в месте нахождения растения снижается до экономически незначительного значения. Устойчивость к яванской галловой нематоде может сообщаться согласно данному изобретению всем чувствительным к яванской галловой нематоде однодольным, двудольным, травяным и древесным видам растений.

Формула изобретения

1. Способ продуцирования устойчивых к яванской галловой нематоде растений, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что в растении, зараженном яванской галловой нематодой, идентифицируется ген, который выражается в гигантских клетках и/или сопутствующих гипертрофических клетках корневых утолщений растения, берут промотор указанного гена и сливают с кодирующей последовательностью, что создает химерный ген, который кодирует молекулу, неблагоприятную для одной или более чем одной клетки (или нематоды) из числа следующих: гигантские клетки корневого утолщения, гипертрофические клетки корневого утолщения и галловые яванские нематоды, и трансформируют другое растение указанным химерным геном.

2. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанная молекула представляет собой

молекулу эффективную тем, что вызывает некроз гигантских клеток и/или гипертрофических клеток.

3. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанная молекула представляет собой молекулу эффективную тем, что вызывает некроз яванской галловой нематоды.

4. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанная молекула является молекулой фермента активного тем, что нарушает метаболизм растительной клетки.

5. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанная молекула является античувствительной РНК указанного гена, идентифицированного от указанного зараженного растения.

6. Способ по п. 1, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что указанная молекула является античувствительной РНК гена, кодирующего фермент, критический для метаболизма растительной клетки.

7. Устойчивое к яванской галловой нематоде растение, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что оно получено трансформированием химерным геном, содержащим кодирующую последовательность, которая кодирует молекулу, неблагоприятную для одной или более чем одной клетки (или нематоды) из числа следующих: гигантские клетки корневого утолщения, гипертрофические клетки корневого утолщения и галловые яванские нематоды, причем указанный химерный ген образован слиянием промотора гена, идентифицированного и выраженного в гигантских клетках и/или сопутствующих гипертрофических клетках корневых утолщений растения, зараженного яванской галловой нематодой, с кодирующей последовательностью.

8. Растение по п. 7, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что является растением из группы, включающей овощные культуры, бобы, фруктовые растения, ореховые растения и хлопковые культуры.

9. Растение по п. 7, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что является табачным растением.

10. Растение по п. 8, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что является томатом.

11. Растение по п. 8, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что является морковью.

12. Растение по п. 8, о т л и ч а ю щ е е с я тем, что является хлопком.

13. Химерный ген для проявления устойчивости к заражению яванскими галловыми нематодами, включающий кодирующую последовательность, которая кодирует молекулу, являющуюся неблагоприятной для одной или более чем одной из следующих клеток (нематод): гигантские клетки корневого утолщения, гипертрофические клетки корневого утолщения и яванские галловые нематоды, причем указанный ген включает, кроме того, промоторную последовательность, которая образована от гена, который выражен в гигантских клетках и/или в сопутствующих гипертрофических клетках растения, зараженного галловой нематодой, и указанный промотор вызывает в растении, трансформированном указанным химерным геном, экспрессию указанной кодирующей последовательности в гигантских клетках корневого утолщения и/или гипертрофических клетках корневого утолщения.

Составитель описания Суртаева Э.Р.
Ответственный за выпуск Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03