

Prezenta invenție se referă la rezistența plantelor la acțiuni distructive, provocate de nematodul galicol javanez.

Nematozii galicoli javanezi sunt principalii patogeni pentru multe plante, tutun, tomate, pepenii verzi, struguri, alune de pământ și bumbac.

Metodele chimice, măsurile agrotehnice și utilizarea varietăților stabile de plante sunt căile principale de combatere a nematozilor, care în prezent sunt accesibile și foarte des folosite împreună în lupta cu nematodul galicol javanez. Este necesar a ridica eficiența luptei cu nematozii, deoarece căile indicate adeseori nu corespund condițiilor protecției culturilor agricole. Nematocidele sunt dubioase prin acțiunea lor și nu întotdeauna eficiente.

Probleme invenției este creșterea plantelor rezistente la nematodul galicol javanez.

Măsurile agrotehnice de combatere cauzează pierderi latente în pomicultură, manifestate diferit. Gama largă a culturilor gazde pentru nematozii galicoli javanezi limitează eficacitatea economică a culturilor ce nu sunt gazde. Speciile efective și stabile adeseori sunt inaccesibile, și acele specii, pe care pomicultorii le pot folosi, uneori se perfecționează pe baza speciilor sensibile la densități joase ale nematozilor galicoli javanezi. Pe lângă aceasta, rezistența se poate pierde la temperaturi înalte ale solului în condiții tropicale și subtropicale. Când nematodul galicol javanez invadează rădăcina plantei, el migrează înăuntrul celulei până la atingerea meristemului radicular. În acest caz secrețiile glandelor bucale se injectează printr-o sondă ascuțită a nematodului în celulele din regiunea meristemului.

Aceasta conduce la dezvoltarea normală a celulelor date, care trebuie să se rupă, și ca urmare, va avea loc diviziunea nucleelor fără diviziunea celulelor. Pe această cale are loc formarea celulelor plurinucleare, cunoscute ca "celule gigantice". La formarea acestor celule gigantice contribuie lărgirea celulelor înconjurătoare, cunoscute sub denumirea de celule hipertrofice, asupra cărora nematozii nu influențează la penetrarea directă prin sondă. Aceste celule gigantice și celulele hipertrofice înconjurătoare formează împreună locusuri de nutriție a nematozilor galicoli javanezi. Nodozitatea care se formează pe rădăcina infectată, constă din aceleași celule gigantice și celule hipertrofice însoțitoare, care sunt rezultatul pluriinfecției cu nematozi. Mecanismul formării celulelor gigantice sunt asemănătoare la toate varietățile de plante înalt sensibile.

După inducerea celulelor gigantice nematodul galicol javanez pierde capacitatea de mișcare pe măsură ce are loc alimentarea cu nematodul pe celula uriașă, și nematodul devine legat împiedicând alimentația, dezvoltarea și înmulțirea pe locusul de nutriție.

În cererea internațională de brevet WO 92/04453 se descrie metoda de combatere a nematozilor de chist radiculari. În articolul cu denumirea "Gene Expression in Nematode-Infected Plant Roots", autor Gurr et al. (1991), se descrie un procedeu referitor la nematozii de chist ai cartofului, care prevede obținerea ADN complementar (cADN) din ARN informațional (ARN), din sincițiul plantei infectate cu nematodul de chist radicular.

Obiectul prezentei invenții este procedeu de producere a plantelor rezistente la nematodul galicol javanez, în care în planta infectată de nematodul galicol javanez se identifică gena, expresată numai în celulele locusului de nutriție a vătămătorului, se izolează promotorul genei indicate și se fuzionează cu secvența codificatoare a moleculei ostile infestării pentru a obține gena himeră, cu care se modifică o altă plantă, totodată celulele locusului nutritiv reprezintă celulele gigantice și/sau celulele hipertrofice asociate, iar molecula codificată de gena himeră este ostilă pentru unul sau mai multe obiecte selectate din: 1) celulele gigantice ale umflăturii radiculare, 2) celulele hipertrofice ale umflăturii radiculare și 3) nematozii galicoli javanezi.

Conform procedurii propus molecula indicată reprezintă:

1. o moleculă efectivă pentru a cauza necroza celulelor gigantice și/sau celulelor hipertrofice;
2. o moleculă efectivă pentru a cauza necroza nematodului galicol javanez;
3. o moleculă a fermentului activ în dereglarea metabolismului celulei vegetale;
4. ARN antisens al genei ce codifică un ferment critic pentru metabolismul celulei vegetale.

Plantă rezistentă la nematodul galicol javanez, care este rezultatul realizării procedurii propus, este o plantă din grupa, ce include culturile legumicole, plantele de bob furajare și alimentare, plantele fructifere, plantele nucifere și plantele fibroase, care reprezintă tutun, tomate, morcov, bumbac sau o mladiță a plantei indicate.

Conform invenției, gena himeră conține o secvență care codifică molecula ostilă pentru unul sau mai multe obiecte selectate din: 1) celulele gigantice ale umflăturii radiculare, 2) celulele hipertrofice ale umflăturii radiculare și 3) nematozii galicoli javanezi, totodată gena dată include, pe lângă aceasta, o secvență promotoare, ce cauzează expresia secvenței codificatoare menționate în celulele gigantice ale umflăturii radiculare și/sau în celulele hipertrofice ale umflăturii radiculare, și această secvență de promotor derivă de la o genă care este expresată în celulele gigantice și/sau celulele hipertrofice ale plantei infestate de nematodul galicol javanez.

Deoarece mecanismul de producere a celulelor gigantice este același la toate varietățile de plante înalt sensibile, procedeu prezentei invenții de fapt e utilizabil pentru toate varietățile de acest fel, care se pot transforma în conformitate cu etapa transformățională a procedurii prezentei invenții.

Procedeu propus este utilizabil pentru varietățile vegetale *Meloidogyne*, inclusiv, dar nelimitându-se la *M.incognita*, *M.javanica*, *M.arenaria* și *M.halpa*.

Gena identificată, selectată din planta infectată este preferabil acea genă, expresia căreia are loc nu mai devreme decât însăși nematodul își pierde capacitatea de mișcare.

Este necesară garantarea faptului că a fost selectat o astfel de genă, care să se exprime doar în celulele gigantice și/sau în celulele hipertrofice care le însoțesc, deoarece dacă gena se manifestă pe un alt locus, produsul expresiei genei himere elaborate pe un alt locus poate avea o influență negativă asupra plantei, care se transformă.

Avantajul prezentei invenții este acela că plantei i se poate atribui rezistență la nematodul galicol javanez fără necesitatea elaborării produsului antinematodic infecțios.

Rezultatul invenției constă în obținerea plantelor rezistente la nematodul galicol javanez pe baza transformării lor cu gena himeră.

Procedeeul preferabil de realizare a prezentei invenții se descrie în continuare.

CREȘTEREA ȘI CONTAMINAREA PLANTELOR DE TUTUN

Semințele plantei de tutun C319 se supun germinării pe compost Fison F1 în condițiile ce urmează. Puterea luminii de la 4500 până la 5000 Lux, perioadele de iluminare de 16 h, care alternau cu perioade de întuneric de 8 h, temperatura de la 20°C până la 25°C. Peste 3 săptămâni răsadul se spăla ușor cu apă de apeduct pentru înlăturarea solului și se transferau în săculețe (câte două plante în săculeț, Northrup-King) unde se creșteau în decurs de o săptămână la 25°C sub influența luminii cu puterea de 55000 Lux, cu perioade de iluminare de 16 h, care alternau cu perioade de 8 h de întuneric. Rădăcinile se scoteau de pe fundul săculețului și se susțineau pe margini cu hârtie din sticlofibre Whatman CF/A. Apoi nematozii de trei zile (*M. javanica*) se aplicau pe capetele acestor rădăcini sub formă de 10 km alicvot (50 nematozi) și se aplica deasupra capetelor rădăcinilor a doua foaie de hârtie CF/A pentru încapsularea completă a capătului radicular. Peste 24 h după contaminare hârtia CF/A se înlătura pentru confirmarea contaminării (lăsând din urmă rădăcina sănătoasă și țesutul capătului radicular) și imediat se înghețau în azot lichid. De la 80 de plante inoculate se putea colecta de la 0,5 până la 1g țesut radicular contaminat.

VOPSIREA CU SCOPUL VIZUALIZĂRII NEMATOZILOR ÎN RĂDĂCINILE CONTAMINATE

Pentru determinarea calității contaminării se determină numărul nematozilor pe capătul radicular. Rădăcinile se strângeau peste trei zile după contaminarea plantelor și se cufundau pentru 90 s în lactofenol, care conține 0,1% albastru de bumbac, la temperatura de 95°C. După 5 min de spălare în apă rădăcinile se plasau în lactofenol la temperatura camerei pentru 3-4 zile pentru limpezire. Nematologii vopsiți se vizualizau cu ajutorul microscopului optic.

ELIMINAREA ARN DIN ȚESUTUL RADICULAR SĂNĂTOS ȘI CONTAMINAT

Țesutul radicular se mărunțe în praf fin cu ajutorul pistilului și piuliței cu răcire concomitentă (în azot lichid).

Apoi alicvot cu volumul de aproximativ 100 mg se treceau în eprubete Eppendorf răcite în mod analogic și se introduceau 300 ml soluție-tampon fierbinte de fenol de extracție (50% fenol, 50% tampon de extracție: 0,1M clorură de litiu, 0,1 M tampon Tris-HCl, pH=8,0 (temperatura camerei), 10 mM EDTA, 1% dodecilsulfat de sodiu și se realiza termostatarea în decurs de 5 min la 80°C. Apoi se introducea un volum egal de cloroform și omogenizatului se supunea microcentrifugării în decurs de 15 min la 4°C. Faza apoasă apoi se extrăgea cu 600 ml fenol/cloroform și se supunea microcentrifugării, cum este arătat mai sus. Apoi faza apoasă iarăși se înlătura și apoi ARN se precipita cu un volum egal de clorură de litiu la 4°C în decursul nopții. Precipitatul se comprima prin microcentrifugarea în decurs de 15 min la temperatura camerei și se spală în etanol de 70%. Precipitatul comprimat apoi se liofiliza din nou, se suspensiona în DEPC, tratat cu apă și se analiza cu ajutorul spectrofotometrului. Calitatea ARN se determina prin intermediul gelelectroforezei de denaturare (această metodă este adoptată de Shirzadegan et al., 1991).

CLONARE SUBSTRACTIVĂ cADN specifici infecțios

Poli (A)⁺ ARN (mARN) se elimina din 200 mg probe ARN (sumar) de la țesutul radicular C319 sănătos și contaminat folosind dT Dinastere oligomagnetice conform instrucțiunilor producătorului. Sinteza primului fir cADN se realizează nemijlocit *in situ* pe fracțiile poli (A)⁺ legate de Dinastere de la țesutul sănătos. Acesta este AND-transfer. Sinteza primei și celei de-a doua catene se realiza *in situ* pe fracțiile poli (A)⁺ legate de Dinastere de la țesutul contaminat. Acesta este ADN-țintă. Toate reacțiile cADN se realizau folosind complexul sintezei cADN Pharmacia și conform instrucțiunilor producătorului. Trei oligonucleotide SUB21 (5'CTCTTGCTTGAATTCGGACTA3'), SUB25 (TAGTCCGAATTCGAAGCAAGAGCACAA3') (Consecutivitatea de la Duguid și Dinauer, 1990) și LTD15 (5'GACAGAAGCGGATCCd(T)₁₅3') (O'Reilly et al., 1999) se supun acțiunii chinazei cu polinucleotidochinaza T4 conform Maniatis et al., 1992. Apoi SUB21 și SUB25 se hibridizau, formând lincher, care apoi se amesteca cu ADN-țintă cu ligaza T4 ADN conform King și Blakesley (1986). După aceasta sferile purtătoare de țintă se spalau intens cu TE și al doilea fir cADN se elua la 95°C în 5xSSC.

ADN legat cu AND de transfer, care e legat cu Dinastere, se înlătura prin încălzire de 5 h. ADN-țintă, care nu se hibridiza se separa de ADN-țintă legat de sfere, care se hibridiza la temperatura camerei conform instrucțiunilor producătorului, apoi ADN-țintă, care se hibridiza în mod analog se separa de AND de transfer legat de sfere la 95°C. ADN-țintă eluată la temperatura camerei apoi din nou se adăuga la ADN-transfer și hibridizarea se repeta. Acest proces se repeta până atunci, până când cantitatea de AND-țintă, care se hibridizează cu AND de transfer mai mult nu depășea acea cantitate, care nu se hibridizează. Concentrația ADN se stabilea folosind aparatul de cufundare de măsurat ADN, conform instrucțiunilor producătorului.

Alicvotul fracției finale, eluate la temperatura camerei se foloseau pentru amplificarea PCR (Eckert et al., 1990) în scopul generării spiralei duble cADN, care servește pentru clonare în vectorul-plasmidă.

Amplificarea ADN-țintă se obținea folosind *primerii* SUB21 și LTD15 și ciclizatorul termic, conform condițiilor, descrise Frohman et al., 1988. Produsele PCR apoi se cântăreau în Smal vector pBluescript fiert conform King et Blakesley (1986).

SELECTAREA BIBLIOTECHII SUBSTRUCTIVE PRIN ANALIZĂ REVERSIBILĂ Northern

Recombinatele se identificau cu colonia PCR (Gussoe și Clackson, 1989). Inserările intensificate se supuneau *blotării* Southern în trei reproduceri pe membrane Pall Biodyne, conform descrierii producătorului membranelor.

Hibridizarea prealabilă și hibridizarea se efectuau la aceeași temperatură, care constituie 42°C și cu folosirea aceleiași tampon, care reprezintă 5xSSPE, 0,05% BLOTTO, 50% formamidă. Ele se hibridizau aparte cu probele cADN (vezi mai jos) de la țesutul sănătos și de la cel contaminat și cu proba, care constă din AND-țintă intensificat de la substract final. Clonurile care arătau semnalul hibridizării cu proba contaminată cAND (exclusiv) sau care arătau semnalul hibridizării cu proba substractivă, dar cu probele cAND, se selectau pentru testările ulterioare.

GENERAREA PROBEI cADN

Cu scopul obținerii activității relative înalte a probelor pentru tăierea diferențiată, se producea sinteza rece a ADN pe numărul total de ARN și apoi produsele sintezei se supuneau marcării prin metoda oligomarcării. Probele de ARN totale în cantitate de 10 mg de la țesutul sănătos și contaminat se tratau la început cu 2,5 unități DNazei 1 la 37°C în decurs de 15 min. DNaza apoi se denatura la 95°C în decurs de 10 min până la sinteza cADN (conform procedurii standard Pharmacia). Apoi ARN se înlătura în prezența 0,4M hidroxidului de sodiu în decurs de 10 min la temperatura camerei și ADN se purifica, trecându-se prin coloana cu *Sefacril* rotindu-se la 400HR. Randamentul cADN și concentrația lui se determinau, utilizând dispozitivul de scufundare (Invitrogen). Produsele cADN se supuneau apoi marcării, precum se realizează procedura oligomarcării standard Pharmacia (concentrația 35 ng/probă).

BLOTAREA Northern

Pentru determinarea profilului expresiei cADNazei, selectate pe calea testării reversibile Northern în diverse țesuturi ale plantei, în calitate de probe se utilizau clonurile în Northern atât ale numărului total de ARN, cât și ale poli (A)⁺ ARN de la rădăcinile, tulpinile, frunzele și florile sănătoase și de la cele contaminate. Numărul total de *bloturi* ARN includea 25 mg ADN în rând, în timp ce poli (A)⁺ *bloturile* includ de la 0,5 până la 1 mg ARN în rând. ARN se supuneau electroforezei pe geluri de formaldehidă și se *blotau* în membrana Pall Biodyne B, după cum este descris de Fourny et al., 1988. Probele se supuneau marcării și se hibridizau cu *bloturi*, după cum se descrie mai sus.

BLOTAREA Southern

Pentru determinarea faptului dacă cADNazele sunt de origine vegetală sau nematodică se pregăteau ADN C319 și *M. javanica*, după cum descrie Gawel și Jarret (1991). Se pregăteau *bloturile* Southern, care includeau 10 mg ADN fiert cu EcoRI și HindIII, în rând. *Bloturile* se hibridizau cu probele oligomarcate, după cum se descrie mai sus.

HIBRIDIZAREA in situ

Pentru determinarea expresiei locale a cADNazei, care provoacă interes, în locusul nutritiv se realiza hibridizarea *in situ*. Țesuturile de la rădăcinile sănătoase și contaminate se cufundau în parafină, se selectau și se hibridizau cu probe, după cum descrie Jackson (1991).

ELIMINAREA VERIGILOR 5'-TERMINALE ALE mARNazei

Verigile 5'-terminale ale ARNazei, care prezintă interes, se determinau până la eliminarea consecutivităților lor promoare. Aceasta se realizează folosind 5'RACE, cum descrie Frohmah et al., 1988.

ELIMINAREA ZONELOR PROMOTOARE

Zonele promoare ale genelor, care prezintă interes, se eliminau prin metoda, care poartă denumirea de PCR vectorial-legate. 100 ng de mostre scindate de endonuclează de restricție C319 a ADN genomic se uneau în decurs de 4 h la temperatura camerei (King și Blakesley, 1986) cu 100 ng mostre pBluescript (scindate cu fermentul restricției, care produce verigi compatibile). De obicei se foloseau fermenții *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *BG1II*, *XhoI*, *ClaI*, *SalI*, *KpnI*, *PstI* și *SstI*. Apoi PCR se performează în legături utilizând *primerul* vectorial, astfel ca - 40 *primerul* secvențial și *primerul* complementar al verigii la capătul 5'-terminal mARN. Produsele PCR apoi se clonau și se formau secvențe. În caz de necesitate, această procedură se repeta cu un *primer* nou complementar al verigii la capătul 5'-terminal al fragmentului promotor, care asigură eliminarea consecutivităților promotorilor.

CONSTRUIREA GENELOR HIMERE ÎN VECTORI BINARI VEGETALI TRANSFORMAȚIONALI

Promotorii eliminați se uneau la capătul 5' la secvența, care reprezintă secvența uneia din clasele 1-5, după cum se descrie mai detaliat mai sus, drept exemplu servind antisensul genei înseși (clasa 4) sau al genei *barnase* (Hartley et al., 1972) (clasa 1 și/sau 3). Ei sunt vectori binari construiți (Bevan, 1984).

REPRODUCEREA PLANTEI TRANSGENE

Plantele transgene, de exemplu tutunul, pot fi obținute prin metoda discului folicular standard, supus acțiunii *Agrobacterium*, după cum descrie Horsch et al., 1985, grație cărui fapt planta este stabilă față de nematodul galicol javanez. Semințele sau mlădițele plantei, care este produsul corespunzător prezentei invenției, se pot păstra pentru utilizarea ulterioară.

Pentru specialiștii în acest domeniu este clar că, în cazul unor clase de plante, poate fi de dorit sau necesară transformarea plantei într-un mod diferit de cel cu utilizarea *Agrobacterium*.

În afară de aceasta la contaminarea plantei cu nematodul galicol javanez plantele conform invenției deja nu se mai supun acțiunilor negative ale acestor contaminări și capacitatea reproductivă a nematozilor galicoli javanezi se reduce la minim, așa că populația acestora în sol pe teritorii cultivate cu plantele conform invenției se micșorează până la valoarea economic neînsemnată.

Rezistența la nematodul galicol javanez poate fi atribuită conform prezentei invenției tuturor varietăților de plante monocotiledonate, bicotiledonate erbacee și lemnece sensibile la nematodul galicol javanez.