



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2010 01103

(22) Data de depozit: 12.11.2010

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CERCETĂRI BIOLOGICE
CLUJ, STR.REPUBLICII NR.48,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• UNIVERSITATEA "BABEȘ BOLYAI" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. M. KOGĂLNICEANU
NR.1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• VĂLIMĂREANU SERGIU, STR.
REPUBLICII NR.48, CLUJ-NAPOCA, CJ,
RO;

• HALMAGYI ADELA, STR. REPUBLICII
NR.48, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• LUPAN IULIA, STR. M.KOGĂLNICEANU
NR.1, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• POPESCU OCTAVIAN, STR.
M.KOGĂLNICEANU NR.1, CLUJ-NAPOCA,
CJ, RO

(54) **SALATĂ TRANSFORMATĂ GENETIC CU GENA GNA
PENTRU AGLUTININA DE LA GHIOCEL, REZISTENTĂ LA
INSECTE DĂUNĂTOARE DIN CULTURA APARTINÂND
ORDINELOR ORTHOPTERA ȘI HOMOPTERA**

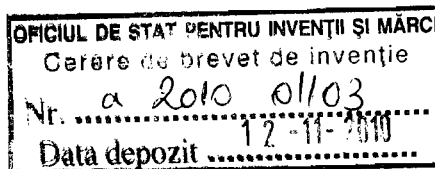
(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la o salată (*Lactuca sativa* var *Capitata*) transformată genetic, prin introducerea și integrarea stabilă în genom a genei *gna* (*Galanthus nivalis agglutinin*) care este responsabilă de sinteza aglutininei de la ghiocel, conferind plantelor transformate rezistență la atacul insectelor dăunătoare din ordinele *Orthoptera* (lăcuste) și *Homoptera* (afide). Speciile vizate sunt *Nilaparvata lugens* Stl, *Myzus persicae* Sulzer și *Lipaphis erysimi*. În protocolul de transformare s-au utilizat discuri foliare de salată și suspensii de bacterii gram negative *Agrobacterium*

tumefaciens, tulpina LBA 4404, incluzând vectorul binar pBI 121, construit astfel încât să includă gena npt II (pentru neomicin fosfotransferaza II) ca genă marker de selecție a plantelor transformate, care a fost pusă sub controlul unui promotor CaMV-35S și al unui terminator Nos (nopalina sinteză). Gena *gna* a fost integrată în vectorul pBI 121 și a fost transferată la plantele de salată.

Revendicări: 1
Figuri: 2





PREZENTARE

Scopul acestui experiment a fost obținerea *in vitro* de plante de salată comestibilă (*Lactuca sativa*) ameliorate genetic, al căror genom include gena *gna* (*Galanthus nivalis* agglutinin) pentru aglutinina de la ghiocel, care conferă plantelor transformate genetic rezistența la insectele dăunătoare din cultură (Rao *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003), din ordinul Homoptera și Orthoptera (lăcuste și afide). Acest experiment a presupus obținerea genei *gna* și integrarea ei în genomul salatei prin intermediul unor vectori de clonare și a bacteriei gram-negative *Agrobacterium tumefaciens*.

În domeniul agriculturii este recunoscută utilizarea aglutininei ca insecticid eficient împotriva unor dăunători din ordinele Homoptera și Orthoptera cum sunt: *Nilaparvata lugens* Stl, *Myzus persicae* Sulzer (Sun *et al.*, 2001) sau *Lipaphis erysimi* (Ahmed *et al.*, 2007). Acest insecticid nu are efect asupra altor insecte sau asupra comunităților de bacterii din sol. Până acum gena *gna* de la ghiocel este singura genă pentru lectină raportată care poate induce o mortalitate semnificativă asupra insectelor din ordinele Homoptera și Orthoptera. Gena *gna* are secvența de nucleotide cunoscută, fiind deja secvențializată și publicată în bazele de date. Gena are 474 pb și codifică o proteină de 157 de aminoacizi. Integrarea stabilă a acestei gene pentru aglutinină în genomul plantelor de salată determină sinteza proteinei GNA, care acționează ca un insecticid asupra dăunătorilor din cultură din categoriile amintite.

Metoda în sine se referă la introducerea genei pentru aglutinina de la ghiocel în plante de salată, prin infectarea discurilor foliare ale plantelor test cu concentrații variabile de *Agrobacterium tumefaciens* (Van Lijsebettens *et al.*, 1991; Holford *et al.*, 1992; Anthony *et al.*, 2000; Komari *et al.*, 2006; Curtis, 2010), care conțin vectorul binar de clonare pBI 121 și regenerarea *in vitro* pe medii de cultură artificiale a plantelor ameliorate genetic.

Constructele insert care includ gena de interes derivă din plasmide Ti („Tumor inducing” –care generează tumori în plante la locul de infecție). Vectorii binari de clonare și expresie au fost introduși în *Agrobacterium* prin electroporare. Ei conțin: gena *gna* de interes economic și o genă *npt II* (Janssen and Gardner, 1989; Vancanneyt *et al.*, 1990), marker de selecție a plantelor transformate care conferă celulelor transformate rezistență la kanamicin-sulfat. Vectorii au fost astfel construiți încât să posede origini de replicare

Stalinski *Halman* *T. Lupan* *Popu*

în *E. coli* și *A. tumefaciens* și câte o genă marker de selecție în aceste două tulpini bacteriene. Toate aceste componente ale vectorilor au fost puse sub controlul unui promotor CaMV-35S și al unui terminator Nos (Curtis *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 1999). Gena *gna* responsabilă de sinteza lectinei de la ghiocel a fost obținută în laborator, prin sinteză inversă, pornindu-se de la informația genetică aflată în molecula de ARN mesager din ARN total, după care ea a fost integrată într-un vector de exprimare și multiplicată în *E. coli*. ADNc obținut a servit la amplificarea genei prin PCR cu două perechi de amorse specifice pentru a fi reclonată ulterior în 2 vectori binari: pROK2 și pBI121.

Cultivarea *in vitro* a acestor plante ameliorate asigură obținerea de material vegetal viguros, liber de virusuri și patogeni și o rată de multiplicare foarte mare (practic nelimitată) a plantelor transformate.

S-au obținut plante de salată modificate genetic prin integrarea stabilă a genei *gna* preluată de la ghiocel. Aceste plante au fost testate în laborator pentru prezența alogenei introduse, prin tehnici moleculare ca: Real-Time PCR, amplificare cu amorse specifice și obținerea ampliconului *gna* de 474 perechi de baze nucleotidice (tehnica PCR), secvenționare genică, purificarea proteinei GNA sintetizată de gena introdusă și SDS PAGE. În fine, menționăm faptul că acest avantaj va putea fi exploatat ulterior în cultura *ex vitro*.

BIBLIOGRAFIE

1. **Ahmed, M.B., M.S. Akhter, M. Hossain, R. Islam, T.A. Choudhury, M.M. Hannan, M.A. Razvy and I. Ahmad** (2007) An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin). Middle-East Journal of Scientific Research 2 (2): 155-160.
2. **Anthony, P., M.R. Davey, K. Azhakanandam, J.B. Power and K.C. Lowe** (2000). Conservation of Plant Genetic Resources *in vitro*, pp. 21-37 In: M.K. Razden (ed). Cryopreservation of plant germplasms: new approaches for enhanced post thaw growth. Oxford and IBH Publishing Co PVT Ltd, New Delhi.
3. **Curtis, I.S., C. He, W.J.R.M. Jordi, E. Davelaar, J.B. Power, A.M.M. De Laat and M.R. Davey** (1999). Promoter deletions are essential for transformation of lettuce by the *T-cyt* gene; the phenotypes of transgenic plants. Annals of Botany 83:559-567.

Stănescu *Malina* *T. Lupu* *Rădu*

4. **Curtis, I. (2010)** Genetic transformation – *Agrobacterium*, p. 199-215 In: Davey, M.R. and P. Anthony (Eds) *Plant Cell Culture. Essential Methods*. Wiley-Blackwell.
5. **Holford, P., R. Hernandez and H.J. Newbury (1992)**. Factors influencing the efficiency of T-DNA transfer during co-cultivation of *Antirrhinum majus* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 11:196-199.
6. **Janssen, B.J. and R.C. Gardner (1989)**. Localised transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with *Agrobacterium*. *Plant Mol. Biol.* 14:61-72.
7. **Komari T, Y. Takakura, J. Ueki, N. Kato, Y. Ishida and Y. Hiei (2006)** *Agrobacterium* Protocols. Vol. 343, pp. 15–41. In: K Wang (ed). *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA.
8. **McCabe, M.S., F. Schepers, A. Van der Arend, U. Mohapatra, A.M.M. De Laat, J.B. Power and M.R. Davey (1999)**. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-bar gene compared with a *CaMV35S*-bar gene. *Theor. Appl. Genet.* 99:587-592.
9. **Rao, K.V., K.S. Rathore, T.K. Hodges, X. Fu, E. Stoger, D. Sudhakar, S. Williams, P. Christou, M. Bharathi, D.P. Bown, K.S. Powell, J. Spence, A.M. Gatehouse and J.A. Gatehouse (1998)**. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown plant hopper *Plant J.* 15: 469-477.
10. **Sun, X.F., K.X. Tang, B.L. Wan, H.X. Qi and X.G. Lu (2001)**. Transgenic rice homozygous lines expressing GNA showed enhanced resistance to rice brown planthopper. *Chin. Sci. Bull.* 46:1108–1113.
11. **Vancanneyt, G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sanchez, L. Willmitzer and D. Rocha-Sosa (1990)**. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250.
12. **Van Lijsebettens, M., R. Vanderhaeghen and M. A. Montagu (1991)**. Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theor. Appl. Genet.* 81:277-284.
13. **Yao, J., Y. Pang, H. Qi, B. Wan, X. Zhao, W. Kong, X. Sun and K. Tang (2003)**. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. *Transgenic Res.* 12(6):715-722.

Stalin Fera

Malena

J. Lopez

Rojas

REVENDICARE

Plante de salată (*Lactuca sativa* var. Capitata) transformate genetic prin integrarea genei *gna* (*Galanthus nivalis* agglutinin) responsabilă de sinteza aglutininei de la ghiocel, care conferă plantelor de salată obținute rezistență la insecte dăunătoare din cultură, aparținând ordinilor Homoptera și Orthoptera (afide, lăcuste).

Stalin Fuciu Malina G. Lupan [Signature]

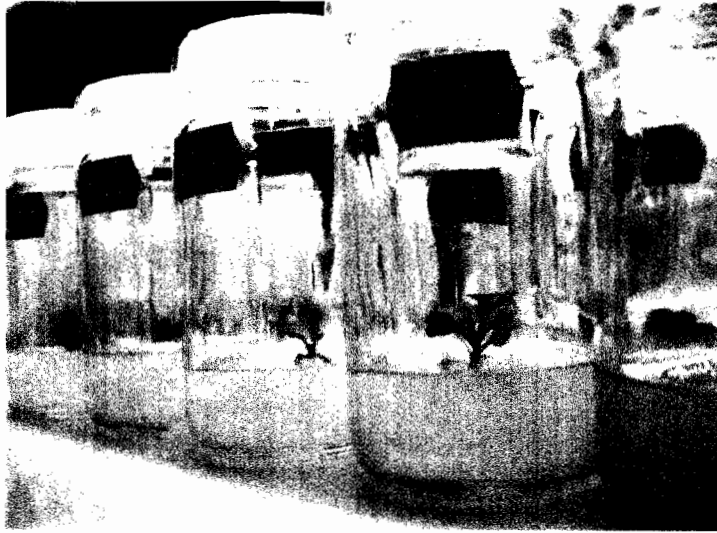
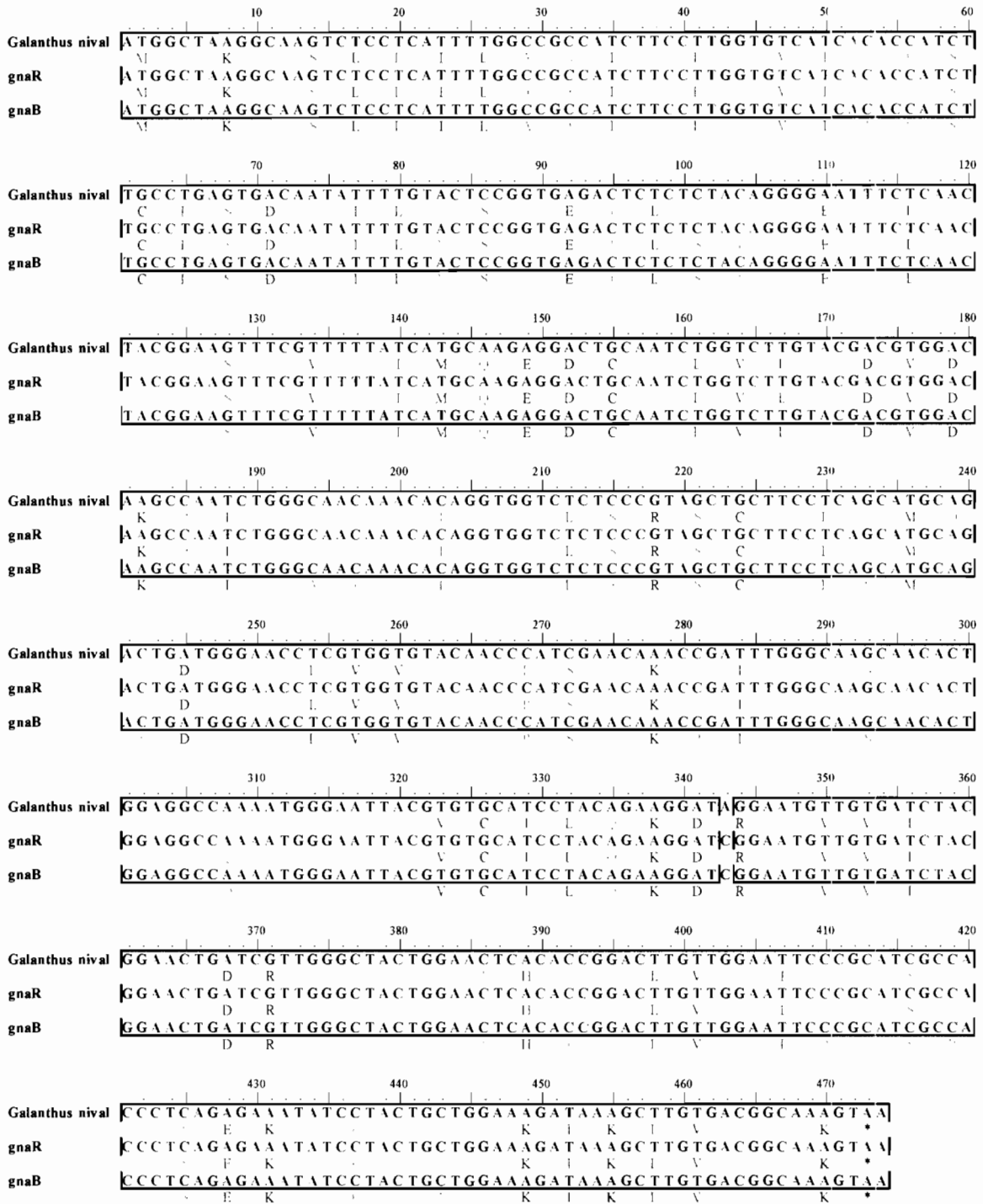


Fig. 1: Salată transgenică (*Lactuca sativa* var. Capitata) pe mediu de înrădăcinare (RI) suplimentat cu kanamicină (la două săptămâni de la inoculare).



Fig. 2: Salată transgenică (*Lactuca sativa* var. Capitata) pe mediu de înrădăcinare (RI) cu kanamicină (la cinci săptămâni de la inoculare). Sistemul radicular este dezvoltat integral și plantele pot fi acclimatizate *ex vitro*.

Stalin Istraru Malina I. Luparu Popescu



Alinierea secvențelor celor două variante ale genei *gna* amplificate și clonate. Prima secvență este gena *gna* existentă în bazele de date, *gnaR* este gena care a fost clonată în vectorul pROK2 și *gnaB* este gena care a fost clonată în vectorul pBI121.

Stănișor *Mălina* *S. Lupuș* *Rojan*