DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

# PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(19) DD (11) 280 787 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

5(51) C 12 N 15/29

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (21) | AP C 12 N / 293 412 4 | (22) | 04.08.86 | (44) | 18.07.90 |
| (31) | 762245 | (32) | 05.08.85 | (33) | US |


(71) siehe (73)
(72) Nasrallah, June B.; Nasrallah, Mikhail E.; Goldberg, Michael L., US
(73) Cornell Research Foundation, Inc. Ithaca, N. Y. 14850, US
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

## (54) Ein cDNA-Klon, welcher für ein S-locusspezifisches Glycoprotein codiert

(55) DNA-Basensequenzen; Herstellung; Verwendung; rekombinanter DNA; Transfervektor; transformierter Mikroorganismus; Hybridsamenproduktion; Beseitigung der Selbstunverträglichkeit bei Pflanzen

(57) Es werden Verfahren zur Herstellung einer DNA-Basensequenz und ihre Verwendung beschrieben. Es wird auch ein Verfahren für die Herstellung eines rekombinanten DNA-Transfervektors beschrieben. Weiterhin werden beschrieben: ein Verfahren für die Herstellung eines Mikroorganismus, der durch irgendeinen der oben erwähnten DNA-Transfervektoren transformiert ist; ein Verfahren für die Herstellung eines chimären Gens und ein Verfahren für die Verwendung dieses Gens unter Bildung von Fusionsproteinen; ein Verfahren für die Herstellung eines Fusionsproteins, ein Verfahren für die Herstellung eines Fusionsproteins, welches mit Antiserum zu S-locusspezifischem Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen reagieren kann, und Verfahren für die Verwendung dieser Fusionsproteine als Antigene. Es wird weiterhin ein Verfahren für die Klonierung einer cDNA-Sequenz beschrieben. Die klonierte DNA und die Fusionsproteine sind industriell nützlich für die Hybridsamenproduktion und um die Selbstunverträglichkeit bei Pflanzen zu beseitigen.

ISSN 0433-6461

14 Seiten

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Basensequenz, **dadurch gekennzeichnet,** daß
   A) eine im wesentlichen reine DNA-Basensequenz, die für ein S-locusspezifisches Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen codiert, oder irgendein Fragment dieser DNA-Basensequenz, welches für die DNA-Basensequenz einzigartig ist, oder irgendein funktionelles Äquivalent der DNA-Basensequenz oder eines seiner Fragmente isoliert wird, oder
   B) Eine im wesentlichen reine DNA-Basensequenz, die der cDNA-Basensequenz entspricht, welche der mRNA entspricht, die für ein S-locusspezifisches Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen codiert, oder die einem irgendeinem funktionellen Äquivalent der eDNA-Basensequenz oder des Fragmentsäquivalents ist, isoliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 A), **dadurch gekennzeichnet,** daß die isolierte DNA-Basensequenz zu der folgenden nichtcodierenden DNA-Basensequenz komplementär ist:

5'- GGA TCC GTC GTC TTG ATT CTA TTT TGT CCT GCC TTT TCG
50
ATC AAC ACT TTG TCG TCT ACA GAA TCT CTT AGA ATC TCA AGC
100
AAC AGA ACA CTT GTA TCT CCA GGT AAT AAC TTC GAA CTC GGC
150
TTC TTC CGA ACC AAC TCA AGT TCT CGT TGG TAT CTC GGG ATA
200
TGG TAC AAG AAA TTG CTC GAC AGA ACC TAT GTA TGG GTT GCC
AAC AGA GAT AAC CCA CTC TCC AAT GCC ATT GGA ACC CTC AAA
250
ATC TGA GGC AAT AAT CTT GTC CTC CTT GGT CAC ACC AAT AAA
TCT GTT TGG TCG ACG AAT CTT ACT AGA GGA AAT GAG AGA CTT
350
CGG TGG TGG CAG ACG TTC TCT CTA ATC GGA ACT TCG TGA
400
TGCGAGACTCCAGTAACAACGACGCAAGTCAATACTTGTGGCAAAGTTTCGATTA
450
CCTACGGATACTTTGCTTCCAGAGATGAAACTGGGTTACGACCTCAAAACAGGGT
500
TGAAGAGGTTCCTTACATCATGGAGAAGTTCAGATGATCCATCAAGCGGGGATTT
550
CTCGTACAAGCTCGAAACCCGAAGCCTTCCTGAGTTTTATCTATGGCATGGGATC
600
TTTCCAATGCATCGGAGTGGTCCATGGAATGGAGTCCGATTTAGTGGCAACCAGA
650 700
GGACCAAAAGCTGAGTTACATGGTGTACAATTTCACAGAGAATAGTGAAGAGGTC
750
GCTTATACATTCCGAATGACCAACAACAGCATCTACTCGAGATTGACACTAAGTT
800
CCGAAGGTATTTTCAGCGACTTACGTGGAATCCGTCAATAGGGATATGGACAGGT
850
CTGGTCTTCTCCAGTGGACCCCCAGTGCGATACATACATAATGTGCGGGCCTTAC
900
GCTTACTGTGGCGTGAACACATCACCTGTTTGTAACTGTATCCAAGGGTTCAATC
950
CCCGGAATATACAGCAGTGGGATCAGAGAGTCTGGGCAGGTGGGTGTATAAGGAG
GACGCGGCTTAGCTGCAGTGGAGATGGTTTTACAGGATGAAGAACATGAAGCTGC
1050
CAGAAACTACGATGGCGATTGTCGACCGCAGTATTGGTGTGAAAGAATGTGAGAAGA
1100
GGTGCCTTAGCGATTGTAATTGTACTGCTTTTGCAAATGCAAATGCGGATATCCG

1150
GAATGGTGGGACGGGTTGTGTGATTTGGACCGGACGGCTTGACGATATGCGGAAT
1200 1250
TACGTTGCTCACGGTCAAGATCTTTATGTCAGATTGGCTGTTGCTGACCTTGTTT
AGCTCTTTCTCTTAAAATAAAGCACGGATCC-3'

oder zu irgendeinem Fragment der nichtcodierenden DNA-Basensequenz, welches für die nichtcodierende DNA-Basensequenz einzigartig ist, komplementär ist oder zu irgendeinem funktionellen Äquivalent der nichtcodierenden DNA-Basensequenz oder zu dem Fragment komplementär ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1B, **dadurch gekennzeichnet,** daß die DNA-Basensequenz die folgende Sequenz aufweist:

5'- GGA TCC GTC GTC TTG ATT CTA TTT TGT CCT GCC TTT TCG ATC
50
AAC ACT TTG TCG TCT ACA GGA TCT CTT AGA ATC TCA AGC AAC
100
AGA ACA CCT GTA TCT CCA GGT AAT AAC TTC GAA CTC GGC TTC
150
TTC CGA ACC ACC TCA AGT TCT CGT TGG TAT CTC GGG ATA TGG
200
TAC AAG AAA TTG CTC GAC AGA ACC TAT GTA TGG GCC GTT AAC
250
AGA GAT AAC CCA CTC TCC AAT GCC ATT GGA ACC CTC AAA ATC
TCA GGC AAT AAT CTT GTC CTC CTT GGT CAC ACC AAT AAA TCT
GTT TGG TCG ACG AAT CTT ACT AGA GGA AAT GAG AGA CTT CGG
350
TGG TGG TGG CAG ACG TTC TCT CTA ATC GAA ACT TCG TGA
400
TGCGAGACTCCAGTAACAACGACGCAAGTCAATACTTGTGGCAAAGTTTCGATTA
450
CCTACGGATACTTTGCTTCCAGAGATGAAACTGGGTTACGACCTCAAAACAGGGT
500
TGAACAGGTTCCTTACATCATGGAGAAGTTCAGATGATCCATCAAGCGGGGATTT
550
CTCGTACAAGCTCGAAACCCGAAGCCTTCCTGAGTTTTATCTATGGCATGGGAAT
600
CTTTCCAATGCATCGGAGTGGTCCATGGAATGGAGTCCGATTTAGTGGCAACCAG
650 700
AGGACCAAAAGCTGAGTTACATGGTGTACAATTTCACAGAGAATAGTGAAGAGGT
750
CGCTTATACATTCCGAATGACCAACAACAGCATCTACTCGAGATTGACACTAAGT
800
TCCGAAGGTATTTTCAGCGACTTACCTGGAATCCGTCAATAGGGATATGGACAGG
850
TTCTGGTCTTCTCCAGTGGACCCCCAGTGCGATACATACATAATGTGCGGGCCTT
900
ACGCTTACTGTGGCGTGAACACATCACCTGTTGTAACTGTATCCAAGGGTTCAAT
950
CCCCGGAATATACAGCAGTGGGATCAGAGAGTCTGGGCAGGTGGGTGTATAAGGA
GGACGCGGCTTAAGCTGCAGTGGAGATGGTTTTACAAGGATGAAGAACATGAAGC
1050
TGCCAGAAACTACGATGGCGATTGTCGACCGCAGTATTGGTGTGAAAGAATGTGA
1100
GAAGAGGTGCCTTAGCGATTGTAATTGTACTGCTTTTGCAAATGCAAATGCGGAT
1150
ATCCGGAATGGTGGGACGGGTTGTGTGATTTGGACCGGACGGCTTGACGATATGC

GGAATTACGTTGCTCACGGTCAAGATCTTTATGTCAGATTGGCTGTTGCTGACCTT
1250
GTTTAGCTCTTTCTCTTAAAATAAAGCACGGATCC-3'

oder irgendein Fragment der DNA-Basensequenz, welches für die DNA-Basensequenz einzigartig ist, oder irgendein funktionelles Äquivalent der DNA-Basensequenz oder des Fragments.

4. Verfahren nach Anspruch 1B, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz wie folgt ist:

5'- GGA TCC GTC TTG ATT CTA TTT TGT CCT GCC TTT TCG ATC
50
AAC ACT TTG TCG TCT ACA GAA TCT CTT AGA ATC TCA AGC AAC
100
AGA ACA CTT GTA TCT CCA GGT AAT AAC TTC GAA CTC GGC TTC
150
TTC CGA ACC AAC TCA AGT TCT CGT TGG TAT CTC GGG ATA TGG
200
TAC AAG AAA TTG CTC GAC AGA ACC TAT GTA TGG GTT GCC ACC
250
AGA GAT AAC CCA CTC TCC AAT GCC ATT GGA ACC CTC AAA ATC
TCA GGC AAT AAT CTT GTC CTC CTT GGT CAC ACC AAT AAA TCT
GTT TGG TCG ACG AAT CTT ACT AGA GGA AAT GAG AGA CTT CGG
350
TGG TGG CAG ACG TTC TCT CTA ATC GAA ACT TCG TGA TGCGAGA
400
CTCCAGTAACAACGACGCAAGTCAATACTTGTCCGAAAGTTTCGATTACCTACGG
450
ATACTTTGCTTCCAGAGATGAAACTGGGTTACGACCTCAAAACAGGGTTGAACAG
500
GTTCCTTACATCATGGAGAAGTTCAGATGATCCATCAAGCGGGGATTTCTCGTAC
550 600
AAGCTCGAAACCCGAAGCCTTCCTGAGTTTTATCTATGGCATGGGATCTTTCCAA
650
TGCATCGGAGTGGTCCATGGAATGGAGTCCGATTTAGTGGCAACCAGAGGACCAA
700
AAGCTGAGTTACATGGTGTACAATTTCACAGAGAATAGTGAAGAGGTCGCTTATA
750
CATTCCGAATGACCAACAACAGCATCTACTCGAGATTGACACTAAGTTCCGAAG
800
GTATTTTCAGCGACTTACGTGGAATCCGTCAATAGGGATATGGACAGGTTCTGGT
850
CTTCTCCAGTGGACCCCCAGTGCGATAACATACATAATGTGCGGGCCTTACGCTT
900
ACTGTGGCGTGAACACATCACCTGTTTGTAACTGTATCCAAGGGTTCAATCCCCG
950
GAATATACAGCAGTGGGATCAGAGAGTCTGGGCAGGTGGGTGTATAAGGAGGACG
CGGCTTAGCTGCAGTGGAGATGGTTTTACAAGGATGAAGAACATGAAGCTGCCAG
1050
AAACTACGATGGCGATTGTCGACCGCAGTATTGGTGTGAAAGAATGTGAGAAGAG
1100
GTGCCTTAGCGATTGTAATTGTACTGCTTTTGCAAATGCAAATGCGGATATCCGG
1150 1200
AATGGTGGGACGGGTTGTGTGATTTGGACCGGACGGCTTGACGATATGCGGAATT
1250
ACGTTGCTCACGGTCAAGATCTTTATGTCAGATTGGCTGTTGCTGACCTTGTTTA
GCTCTTTCTCTTAAAATAAAGCACGGATCC-3'

oder irgendein Fragment der cDNA-Basensequenz, welches für die cDNA-Basensequenz einzigartig ist, oder irgendein funktionelles Äquivalent der cDNA-Basensequenz oder von dem Fragment aufweist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz des nichtcodierenden DNA-Strangs des ersten Gens oder eines Teils davon unter Bildung eines chimären Gens, enthaltend ein erstes Gen oder ein Teil davon und ein zweites Gen oder ein Teil davon, eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz zur Bildung eines Fusionsproteins, das gegebenenfalls mit Antiserum reagieren kann, wobei das Fusionsprotein (1) ein Glycoprotein, ein einzigartiges Fragment des Glycoproteins oder irgendein funktionelles Äquivalent des Glycoproteins oder ein Glycoproteinfragment, welches aus einem Gen oder einem Teil davon mit der cDNA-Basensequenz als nichtcodierender Strang hergestellt worden ist, und (2) ein anderes Protein oder ein Fragment davon enthält, eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz als Probe zur Identifizierung oder Isolierung einer DNA-Basensequenz eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz als Probe zur Identifizierung oder Isolierung von S-Genen in einem Züchtungsstock bzw. Züchtungsmaterial eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz zur Transformierung von Pflanzenzellen oder Geweben durch Einführung der cDNA-Basensequenz in die Zellen oder die Gewebe eingesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz zur Bildung eines Hybridsamens
    a) durch Transformierung von Pflanzenzellen oder Geweben mit der cDNA-Basensequenz, Regenerierung der gesamten Pflanzen und Bildung eines Hybridsamens aus den regenerierten Pflanzen oder
    b) durch Transformierung von Pflanzenzellen oder Geweben mit der cDNA-Basensequenz, Regenerierung der gesamten Pflanze unter Bildung einer ersten Pflanzenlinie, Zusammenpflanzen der ersten Pflanzenlinie mit einer zweiten Pflanzenlinie und Erzeugung eines Hybridsamens aus den zusammengepflanzten ersten und zweiten Pflanzenlinien, eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz für die Herstellung eines rekombinanten DNA-Transvektors durch Einsetzen einer cDNA-Basensequenz in einen Vektor eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz zur Abtrennung eines genetischen Merkmals in einer Pflanze durch Isolierung einer DNA-Basensequenz aus Pflanzenzellen oder Geweben unter Verwendung der cDNA-Basensequenz als Probe, Änderung der isolierten DNA-Basensequenz durch Modifizierung, Zuführung oder Wegnahme von einer oder mehreren Basen, Transformierung der Pflanzenzellen oder der Gewebe mit der geänderten DNA-Basensequenz und Regenerierung von Pflanzen mit der geänderten DNA-Basensequenz eingesetzt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet,** daß die cDNA-Basensequenz zur Herstellung eines transformierten Mikroorganismus durch Einsetzen eines Transvektors, welcher eine cDNA-Basensequenz enthält, in den Mikroorganismus eingesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch,** daß das S-locusspezifische Glycoprotein die folgende Aminosäure-Sequenz aufweist:

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| NH- | Gly | Ser | Val | Val | Leu | Ile | Leu | Phe | Cys | Pro | Ala | Phe | Ser |
| | | | | 50 | | | | | | | | | |
| Ile | Asn | Thr | Leu | Ser | Ser | Thr | Glu | Ser | Leu | Arg | Ile | Ser | Ser |
| | | | | | 100 | | | | | | | | |
| Asn | Arg | Thr | Leu | Val | Ser | Pro | Gly | Asn | Asn | Phe | Glu | Leu | Gly |
| | | | | | | | | 150 | | | | | |
| Phe | Phe | Arg | Thr | Asn | Ser | Ser | Ser | Arg | Trp | Tyr | Leu | Gly | Ile |
| | | | | | | | | | | | 200 | | |
| Trp | Tyr | Lys | Lys | Leu | Leu | Asp | Arg | Thr | Tyr | Val | Trp | Val | Ala |
| Asn | Arg | Asp | Asn | Pro | Leu | Ser | Asn | Ala | Ile | Gly | Thr | Leu | Lys |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 250 | | | | | | | | | | | | | |
| Ile | Ser | Gly | Asn | Asn | Leu | Val | Leu | Leu | Gly | His | Thr | Asn | Lys |
| Ser | Val | Trp | Ser | Thr | Asn | Leu | Thr | Arg | Gly | Asn | Glu | Arg | Leu |
| | | | | 350 | | | | | | | | | |
| Arg | Trp | Trp | Gln | Thr | Phe | Ser | Leu | Met | Gly | Thr | Ser | –COOH | |

15. Verwendung einer DNA-Basensequenz, die für ein S-locusspezifisches Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen codiert, **dadurch gekennzeichnet,** daß die DNA-Basensequenz
    a) als Codierungsstrang des ersten Gens oder eines Teils davon zur Herstellung eines chimären Gens, welches ein erstes Gen und ein Teil davon und ein zweites Gen oder ein Teil davon enthält, oder
    b) zur Herstellung eines Fusionsproteins, enthaltend (1) ein Glycoprotein, ein einzigartiges Fragment des Glycoproteins oder irgendein funktionelles Äquivalent des Glycoproteins oder ein Glycoproteinfragment, codiert durch einen DNA-Strang mit einer DNA-Basenfrequenz, und ein (2) anderes Protein oder ein Fragment davon, welches gegebenenfalls mit Antiserum reagieren kann, oder
    c) als erste DNA-Basensequenz, als Probe zur Identifizierung oder Isolierung einer zweiten DNA-Basensequenz, oder
    d) als erste DNA-Basensequenz, als Probe zur Identifizierung oder Isolierung von S-Genen im Züchtungsmaterial bzw. Züchtungsstock, oder
    e) zur Transformierung von Pflanzenzellen oder Geweben, wobei man die DNA-Basensequenz in die Zellen oder das Gewebe einführt,
    f) unter Bildung eines Hybridsamens, wobei Pflanzenzellen oder Gewebe mit der DNA-Basensequenz transformiert werden, die Gesamtpflanzen regeneriert werden und aus den regenerierten Pflanzen ein Hybridsamen erzeugt wird oder
    g) unter Bildung eines Hybridsamens, wobei man Pflanzenzellen oder Gewebe mit der DNA-Basensequenz transformiert, die ganzen Pflanzen unter Bildung einer ersten Pflanzenlinie regeneriert, die erste Pflanzenlinie mit einer zweiten Pflanzenlinie zusammenpflanzt und einen Hybridsamen aus den zusammengepflanzten ersten und zweiten Pflanzenlinien erzeugt oder
    h) als erste DNA-Basensequenz zur Entfernung eines genetischen Materials in einer Pflanze durch Isolierung einer zweiten DNA-Basensequenz aus den Pflanzenzellen oder dem Gewebe unter Verwendung der ersten DNA-Basensequenz als Probe, Änderung der isolierten DNA-Basensequenz durch Modifizierung, Zufügen oder Entfernen von einer oder mehreren Basen, Transformierung der Pflanzenzellen oder Gewebe mit der geänderten DNA-Basensequenz und Regenerierung der Pflanzen mit der geänderten DNA-Basensequenz, eingesetzt wird.
16. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß die DNA-Basensequenz zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Transvektors durch Einsetzen einer DNA-Basensequenz in einen Vektor eingesetzt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß die DNA-Basensequenz für die Herstellung eines transformierten Mikroorganismus durch Einsetzen eines Transvektors in den Mikroorganismus, welcher eine DNA-Basensequenz enthält, eingesetzt wird.
18 Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet,** daß die DNA-Basensequenz als nichtcodierender DNA-Strang des ersten Gens oder eines Teils davon für das S-locusspezifische Glycoprotein oder ein Teil davon aus einer selbstunverträglichen Pflanze zur Herstellung eines chimären Gens eingesetzt wird.

Hierzu 3 Seiten Zeichnungen

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft allgemein ein neues Verfahren zur Herstellung eines klonierten DNA-Fragments und Verfahren für die Verwendung des Fragments. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung eines klonierten DNA-Fragments mit einer Basensequenz, die für ein S-locusspezifisches Glycoprotein von einer selbstunverträglichen Pflanze codiert, und Verfahren für die Verwendung der geklonten DNA. Die geklonte DNA ist idustriell für die Hybridsamenproduktion und zur Beseitigung der Selbstunverträglichkeit in Pflanzen nützlich. Die klonierte DNA ist ebenfalls industriell als Probe nützlich, um S-Gene in Züchtungsmaterialien bzw. Samenmaterial zu identifizieren und um stabile S-Allele mit starken Promotern zu identifizieren.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

In über 3000 Spezies, die die diversen angispermen Familien repräsentieren, ist die Selbstbefruchtung durch einen Mechanismus, welcher als „Selbstunverträglichkeit" (self-incompatibility) bezeichnet wird, blockiert (East, E.M. **Proc. Am. Phil. Soc. 82** 449–518 [1940]). Nach der Selbstbestäubung ruft die Zwischenwirkung zwischen dem Stigma oder Griffel und dem Pollen eine definierte morphologische Antwort hervor und verhindert das normale Pollenschlauchwachstum. Die Befruchtung wird verhindert, da diese Pollenschläuche nicht in der Lage sind, in die volle Länge des Stigma und Griffels zu penetrieren. Die spezifische Eigenschaft dieser Zwischenwirkung wird durch eine oder mehrere genetische loci bestimmt und erfordert die Identität von Allelen, die von den männlichen und weiblichen Elternteilen getragen werden.
Die Unverträglichkeitssysteme wurden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Die gametophytischen Systeme, in denen der Phenotyp eines Pollenkorns durch den haploiden Pollengenotyp bestimmt wird und die sporophytischen Systeme, in denen der Pollenphenotyp durch den Genotyp der diploiden Elternteilpflanze bestimmt wird. Bei der sporophytischen Art der Unverträglichkeit, für die ein Beispiel die crucifere **Brassica** ist, ist die Selbstunverträglichkeitsreaktion an der Stigmaoberfläche lokalisiert und tritt innerhalb von Minuten nach dem Anfangskontakt zwischen dem Pollen und den papillaren Zellen an der Außenoberfläche des Stigmas auf. In diesem Genus ist die Selbstunverträglichkeit unter der Kontrolle eines einzigen genetischen Locus, des S-Locus, welcher stark polymorph ist, so daß 50 oder mehr Allele in natürlichen Populationen identifiziert wurden (Thompson, K.F. et al., **Heredity 21**: 345–362 [1966]; Ockendon, D.J., **Heredity 33**: 159–171 [1974]).
Vielleicht wird die experimentell am besten nachweisbare Route hinsichtlich der molekularen Analyse der genetischen Kontrolle der Unverträglichkeit durch den Nachweis von Antigenen nahegelegt, die für die verschiedenen S-Locus-Allele in Stigmahomogenaten von unterschiedlichen **Brassica**-Stämmen spezifisch sind (Nasrallah, M.E. et al., **Heredity 22**, 519–527 [1967]). Es wurde gezeigt, daß diese Antigene Glycoproteinen entsprechen, die in verschiedene elektrophoretische Systeme aufgespalten werden können (Nasrallah, M.E. et al., **Heredity, 25**, 23–27 [1970]; Nasrallah, M.E. et al., **Genet. Rs. 20**, 151–160 [1972]; Nishio, T. et al., **Heredity 38**, 391–396 [1977]; Nasrallah, M.E. et al., **Experientia 40**, 279–281 [1984]). Verschiedene Beweisreihen zeigen, daß diese Glycoproteine eine wichtige Rolle bei der Unverträglichkeit spielen können: (1) Die Mobilitäten dieser Moleküle variieren in Stigmaextrakten, die sich von **Brassica**-Stämmen ableiten, mit unterschiedlichen S-Locus-Allelen. (2) Diese Moleküle wurden exklusiv in dem Stigma und spezifisch in den Oberflächen-Papillarzellen des Stigmas gefunden, die Stelle des ursprünglichen Kontaktes zwischen dem Pollen und dem Stigma. (3) Eine erhöhte Rate der Synthese dieser S-locusspezifischen Glycoproteine („SLSGs") in dem entwickelten Stigma steht gut in Übereinstimmung mit dem Beginn der Unverträglichkeitsreaktion in dem Stigma (Nasrallah, J.B. et al., **Experientia 40**, 279–281 [1984]). (4) Die wichtigste Eigenschaft, die Erbeigenschaften der verschiedenen Formen von SLSG, stehen mit der Segregation der S-Allelen in den $F_1$- und $F_2$-Generationen in perfekter Korrelation, was anzeigt, daß das für diesen Polymorphismus verantwortliche Gen genetisch extrem eng an den S-Locus gebunden sein muß (Nasrallah, M.E. **Genet. Rs. 20**, 151–160 [1972]; Hinata, K. et al., **Heredity 41**, 93–100 [1978]).
Die Isolierung eines cDNA-Klons, welcher an S-locusspezifisches Glycoprotein codiert, ist von großem Interesse, da ein solcher Klon die Identifizierung der Selbstunverträglichkeitsgene beim Züchten eines Stocks bzw. beim Züchten von Pflanzenmaterial, die Identifizierung stabiler S-Allelen mit starken Promotern, wie auch die Einführung von Selbstunverträglichkeitsgenen in die geeigneten Pflanzenstämme durch Transformation, erlauben würde. Zusätzlich können transformierte Stämme, welche S-Allele tragen, mit Stämmen, die unterschiedliche S-Allele tragen, intergepflanzt werden, so daß der Samen, der geerntet wird, vollständig hybrid ist. Es besteht ein Bedarf nach solchen Hybridarten, da höhere Ausbeuten bzw. Ernten erzeugt werden. Soiche Stämme sind ebenfalls besser für die Einführung von Resistenz gegen Krankheit geeignet, und sie besitzen eine bessere Anpassungsfähigkeit für extreme Umgebungswachstumsbedingungen. Beispielsweise besitzen bei ornamentalen Nutzpflanzen selbstverträgliche Arten eine längere Haltbarkeitsdauer und blühen während einer längeren Saison.

**Ziel der Erfindung**

Ziel der Erfindung ist es, die Hybridsamenproduktion zu erleichtern durch einen wirksamen Transfer von stabilen S-Allelen in aufzuziehendes bzw. zu züchtendes Material.
Erfindungsgemäß soll weiterhin die Selbstunverträglichkeit von Fruchtbäumen beseitigt werden, wodurch höhere Ernten und bessere Früchte erhalten werden. Dies gilt insbesondere für Bäume in Obstgärten, wo oft nur ein Fruchtbaum vorhanden ist.
Erfindungsgemäß soll das Auftreten von Selbstunverträglichkeits-Inzuchtlinien durch Handbefruchtung vermieden werden können.
Erfindungsgemäß soll die interspezifische Hybridisierung zwischen selbstverträglichen und selbstunverträglichen Spezies aktiviert werden, wodurch ein größerer Genpool für die Pflanzenverbesserung erhalten wird.

**Darlegung des Wesens der Erfindung**

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Möglichkeit zur Verfügung zu stellen, mit der die Hybridsamenproduktion verbessert wird, die Unverträglichkeit in Pflanzen beseitigt wird, wodurch höhere Ernten erzeugt werden und die interspezifische Hybridisierung zwischen selbstunverträglichen und selbstverträglichen Spezies aktiviert wird.
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer DNA-Basensequenz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine im wesentlichen reine DNA-Basensequenz, die für ein S-locusspezifisches Glycoprotein codiert, aus einer selbstunverträglichen Pflanze oder irgendein Fragment einer DNA-Basensequenz, das für die DNA-Basensequenz einzigartig ist, oder irgendein funktionelles Äquivalent der DNA-Basensequenz oder ein Fragment der DNA-Basensequenz isoliert wird.
Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren für die Herstellung einer DNA-Basensequenz, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine im wesentlichen reine DNA-Basensequenz, die einer cDNA-Sequenz entspricht, welche einer mRNA-Sequenz entspricht, welche für ein S-locusspezifisches Glycoprotein codiert, aus einer selbstunverträglichen Pflanze isoliert wird. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren für die Verwendung dieser DNA-Basensequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren für die Herstellung eines rekombinanten DNA-Transfervektors, der eine DNA-Basensequenz enthält, welche für ein S-locusspezifisches Glycoprotein aus einer selbstunverträglichen Pflanze codiert oder welche eine cDNA-Basensequenz enthält, die der mRNA-Sequenz entspricht, und für ein S-locusspezifisches Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen codiert. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Mikroorganismus, der durch irgendwelche der oben erwähnten DNA-Transfervektoren transformiert ist, ein Verfahren für die Herstellung eines chimären Gens, welches ein Gen oder ein Teil davon für ein S-locusspezifisches Glycoprotein und ein anderes Gen oder ein Teil davon enthält, und ein Verfahren für die Verwendung dieses Gens zur Herstellung von Fusionsproteinen. Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren für die Herstellung eines Fusionsproteins, welches ein S-locusspezifisches Glycoprotein oder ein Teil davon aus selbstunverträglichen Pflanzen und ein anderes Protein oder ein Teil davon enthält; ein Verfahren für die Herstellung eines Fusionsproteins, welches mit dem Antiserum für das S-locusspezifische Glycoprotein aus selbstunverträglichen Pflanzen reagieren kann, und Verfahren für die Verwendung dieser Fusionsproteine als Antigene.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Klonierung einer cDNA-Sequenz, welche für mindestens einen Teil des S-locusspezifischen Glycoproteins codiert, aus der selbstunverträglichen Pflanzenfamilie **Brassica**.

Figur 1 ist eine Restriktionskarte bzw. -bank und zeigt die DNA-Sequenzstrategie von **Brassica** cDNA-Insert auf pBOS5. Die Restriktionskarte wird durch gelelektrophoretische Analyse von einfachen und doppelten Enzymdigesten von pBOS5 konstruiert. Die dicke Linie zeigt den Codierungsbereich für das S-locusspezifische Glycoprotein, und die dünne Linie zeigt den 3'-Nichtcodierungsbereich der cDNA-Sequenz. Pfeile unterhalb der Karte zeigen die Richtung und das Ausmaß der Sequenzen, die in M13-Vektoren subkloniert sind und von jeder Restriktionsstelle abgelesen werden.

Figur 2 ist ein Nucleotid und leitet sich von der Aminosäure-Sequenz des cDNA-Inserts von pBOS5 ab. Die Restriktionsstellen, die in der Figur 1 aufgeführt sind, sind gezeigt. Der Kasten umrahmt die Polyadenylierungssignal-Sequenz 5'-AATAA-3'.

In Figur 3 wird die Subklonierung von pBOS5 cDNA-Insert in pWR590-Reihen der Expressionsvektoren beschrieben, wobei

(A) die Zeugung der pBOS5 L- und S-Fragmente durch Bam H1-Xho I-Digestion bedeutet. Die Pfeile zeigen die entstehende Richtung der Transkription in dem Chimärenplasmid;

(B) ist die Karte von pWR590. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription. **Lacz'** bedeutet ein verkürztes **lacz**-Gen, welches für etwa 590 Aminosäuren codiert. Die expandierte Region, die auf das **lacz'**-Gen folgt, enthält die Polylinker-Sequenz; und

(C) ist die Nucleotid-Sequenz der Expressionsvektoren an den Fusionsverbindungen und die erwarteten Translationsprodukte. „nucs" bedeutet Nucleotide, „aas" bedeutet Aminosäuren.

**Verfahren zur Herstellung des Klons**

Die Strategie für die Isolation von SLSG-codierenden DNA-Sequenzen wurde aufgrund der Entdeckung vorausgesagt, daß in einigen selbstunverträglichen Stämmen, wie **Brassica**-Stämmen, 1 bis 5% der Proteinsynthese in dem selbstunverträglichen Keimstigma der Synthese dieses Makromoleküls gewidmet sind (Nasrallah, J.B. et al., **Experientia 40**, 279–281 [1984]). Es erscheint daher wahrscheinlich, daß ein hoher Anteil der Klone in der cDNA-Bank, die mit polyA+ RNA aus dem reifen unverträglichen Stigma konstruiert sind, SLSG-Sequenzen enthalten. Es wurde bereits in der Vergangenheit beobachtet, daß SLSG-Moleküle in dem Stigma, jedoch nicht im Blatt oder im Samengewebe, auftreten (Nasrallah, J.B. et al., **Experientia 40**, 279–281 [1934]). Die Anmelderin hat daher die Hypothese aufgestellt, daß SLSG cDNA-Klone in der Fraktion der Klone in einer solchen Bank angereichert sein würden, welche stark die radioaktive cDNA, welche der reifen Stigma-mRNA entspricht, hybridisieren, jedoch nicht in markierter Blatt- oder samenspezifischer cDNA.

Eine erfindungsgemäße cDNA-Bank kann gebaut werden bzw. aufgestellt werden, indem man cDNA aus polyA+ RNA von unverträglichen Stigmas zu dem Zeitpunkt herstellt, wenn die Maximalsynthese von SLSG auftritt, indem man mit oligo(dT)$_{12-18}$ entsprechend dem zuvor beschriebenen Verfahren primiert bzw. eine Primerreaktion durchführt (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]).

Als Pflanzenquellen für die Erhaltung unverträglicher Stigmas können natürliche Populationen und Pflanzen, die aus Züchtungsprogrammen in Universitäten, Versuchsstationen und Samenherstellungsfirmen erhalten werden, verwendet werden. Beispiele geeigneter Pflanzen von natürlichen Populationen umfassen **Lycopersicon peruvianum** und **solanum**. Beispiele für geeignete Pflanzen aus Züchtungsprogrammen umfassen Gemüsenutzpflanzen, wie Kartoffeln, Tomaten, Kohlnutzpflanzen, Beetenutzpflanzen, Ornamentnutzpflanzen, wie Petunia, Nicotiana, Getreidenutzpflanzen und Gräser, wie Roggen, Steinobst, wie Kirschen, Pflaumen und Äpfel, Futternutzpflanzen, wie Klee, Khaki bzw. Kohl und Senf, Ölsamen, wie Traubensamen, insbesondere **Brassica napus**. Besonders bevorzugt sind selbstunverträgliche **Brassica oleracea**-Pflanzen, welche für verschiedene S-Allele, wie $S_6$, $S_{13}$ und $S_{14}$ und 47 anderer bis heute bekannter Allele homozygot sind (Thompson, K.F. et al., **Heredity, 21**: 345–362 [1966]; Ockendon, D.J., **Heredity, 33**, 159–171 [1974]).

Damit eine Homozygotie von **Brassica oleracea** erhalten wird, können reife Pollen auf unreife und damit selbstverträgliche Stigmas der gleichen Pflanze angewendet werden.

Beispiele von geeigneten S-Homozygoten umfassen alle stabilen S-Homozygoten unter den fünfzig bekannten. Bevorzugte Homozygoten sind die $S_6$- und $S_{14}$-Homozygoten von **Brassica oleracea**.

PolyA+ RNA kann nach per se bekannten Verfahren, wie durch oligo(dT)-Chromatographie isoliert werden (Aviv, H. et al., **Proc. Natl Acad. Sci. USA 69**, 1408 [1972]).

Die aus polyA+ RNA aus unverträglichen Stigmas hergestellte cDNA wird mit $S_1$-Nuclease behandelt und anschließend mit dem Klenow-Fragment von **E. coli** DNA-Polymerase zur Erzeugung von cDNA mit glatten Enden repariert (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]). Die cDNA mit glatten Enden kann an Restriktions-Endonucleaselinker ligiert werden und zur Vervollständigung mit der Restriktions-Endonuclease digeriert werden (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]). Fragmente von cDNA größer als 500 Basenpaaren („bp") können nach an sich bekannten Verfahren einschließlich der Elektrophorese an Agarosegel isoliert und in die geeignete Restriktionsstelle eines Plasmids kloniert werden. Die Plasmide werden dann zur Transformierung von Zellen nach an sich bekannten Verfahren, wie dem Verfahren von Hanahan, D., **J. Mol. Biol. 166**, 557–580 (1983) verwendet.

Geeignete Restriktions-Endonucleaselinker umfassen irgendwelche Linker, welche Restriktionsstellen enthalten, die den einzigartigen Restriktionsstellen in dem Plasmid entsprechen.

Beispiele umfassen Eco $R_1$-Linker, Hin D-Linder und Bam H1-Linker, und besonders bevorzugte Restriktions-Endonucleaselinker für **Brassica oleracea** sind Bam H1-Linker.

Geeignete Plasmide umfassen irgendwelche Plasmide, welche die einzigen Restriktionsstellen für den Einsatz fremder DNA enthalten. Beispiele sind pBR322 und pKC7. Das Plasmid pBR322 ist bevorzugt.
Geeignete Mikroorganismen-Wirtszellen umfassen irgendwelche Zellen, welche die Vervielfältigung der Recombinantplasmide unterstützen. Beispiele sind **E. coli** HB 101-, JM 101- und SF8-Stämme. **E. coli** SF8 ist bevorzugt.
Stigma- und Samen-cDNA-Proben können nach an sich bekannten Verfahren, wie nach der Random-Primer-Umkehrtranskription von polyA+ RNA (Taylor, J.M. et al., **Biochim. Biophys., Acta 442**, 324 [1976]) erhalten werden. Stigma-Proben werden aus polyA+ RNA hergestellt, welche durch Reinigung von selbstunverträglichem Stigma erhalten wurden, und Samenproben werden aus polyA+ RNA hergestellt, welche durch Reinigung aus etiolierten Sämlingen erhalten wurden.
Recombinant-Klone können nach irgendwelchen bekannten Verfahren gescreened werden einschließlich des Colony-Hybridisierungsverfahrens von Grunstein & Hogness (Grunstein, M. et al., **Proc. Natl Acad. Sci. USA 72**, 3961 [1975]).
Nachdem einmal die cDNA-Bank konstruiert worden ist, können unabhängige Klone randomartig aus der Bank herausgegriffen werden, und die DNA dieser Kolonien kann nach an sich bekannten Verfahren charakterisiert werden, wie durch Übertragung auf jedes von zwei Nitrocellulosefiltern und Hybridisierung mit den geeigneten Proben. Bei **Brassica** können Kolonien, die mit von Stigma abgeleiteten cDNA-Proben stark hybridisieren, jedoch nicht mit Samen-cDNA-Proben reagieren, für die weitere Verwendung ausgewählt werden.
Ein solches Plasmid, welches Stigma abgeleitete DNA-Homologe zu der von **Brassica oleracea** enthält, ist pBOS5 mit der ATCC-Hinterlegungsnummer 40191.
Nachdem die Kolonien einmal ausgewählt wurden, kann Plasmid DNA aus jeder der Kolonien hergestellt werden, und Zersetzungen (digests) mit der geeigneten Restriktions-Endonuclease können durchgeführt werden, so daß die cDNA-Inserts von dem Plasmidvektor durch Gelelektrophorese abgetrennt werden können.
Die Amplifikation und Isolierung von Plasmid DNAs kann unter Verwendung von Standardverfahren (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning a Laboratory** [1982]) durchgeführt werden. Die Inserts können von dem Plasmid durch Digestion mit geeigneter Restriktions-Endonuclease und anschließender Agarose-Gelelektrophorese und Elektroelution abgetrennt werden (McDonald, M.W. et al., **J. Mol. Biol. 110**, [1977]).
Die Cross-Hybridisierungsversuche können mit diesen Digests (Abbaumaterialien) durchgeführt werden, um festzustellen, ob die DNAs aus den Plasmiden homolog zu der DNA der ursprünglichen Pflanzenquelle sind.
Es werden so die Plasmide, welche homologe DNA enthalten, bestimmt.

**Bestimmung der Nucleotid-Sequenz von dem cDNA-Insert (Einsatz) in pBOS5**

Zur Bestimmung der Nucleotid-Sequenz des cDNA-Inserts können Fragmente des Plasmid-Inserts, welche durch Restriktions-Endonuclease erzeugt wurden, in geeignete Vektoren subkloniert werden, und die entstehenden einsträngigen DNAs können der Sequenzanalyse nach an sich bekannten Verfahren, wie nach dem Sanger-Verfahren (1979) unterworfen werden (Sanger, F. et al., **J. Molec. Biol., 143** 161–178 [1980]).
Geeignete Vektoren für die Subklonierung sind leicht verfügbar und dem Fachmann geläufig. Besonders bevorzugte Vektoren für den pBOS5-Insert sind M13-Vektoren mp10 und mp11 (Messing, J. et al., **Gene 19**, 269–2766 [1982]).
Die Restriktionsbank und die DNA-Sequentierungsstrategie von **Brassica** cDNA-Insert von pBOS5 ist in Figur 1 dargestellt.
Die Restriktionsbank wurde durch gelelektrophoretische Analyse verschiedener einsträngiger und doppelsträngiger Enzym-Digests von pBOS5 konstruiert. Die dicke Linie stellt den Coddierungsbereich, und die dünne Linie stellt den 3'-Nichtcodierungsbereich von der cDNA-Sequenz dar. Pfeile unterhalb der Karte zeigen die Richtung und das Ausmaß der Sequenzen, welche in M13-Vektoren subkloniert sind und von jeder Restriktionsstelle abgelesen werden.
Die Ergebnisse der Nucleotid-Sequenzbestimmung an einem pBOS5 BamH1-Einsatz, subkloniert in M13mp10 und M13mp11, sind in Figur 2 dargestellt. Obgleich fünf der sechs möglichen Leseraster durch mehrfache Nonsense-Codons innerhalb des gesamten 1283-Basenpaar- („bp") Einsatzes blockiert sind, translatiert das verbleibende Leseraster in ein Polypeptid mit einer Länge von 123 Aminosäuren, wie es in Figur 2 dargestellt wird. Die Nucleotid-Sequenz AATAAA, welche als Signal für die Polyadenylierung von mRNA angenommen wird (Proudfoodt, N.J. et al., **Nature 263**, 211–214 [1976]), ist stromabwärts von dem SLSG-Codierungsbereich 11 bis 16 bp vom Ende des cDNA-Einsatzes lokalisiert, von dem man annimmt, daß er von dem 3'-Ende von mRNA stammt. Die cDNA-Sequenz enthält keinen poly(A)-Schwanz, welcher normalerweise 11 bis 30 bp von dem Polyadenylierungssignal entfernt ist. Eine Erklärung für die Abwesenheit des poly(A)-Trakts ist die, daß die BamH1-Sequenzen, die beide Seiten des cDNA-Einsatzes flankieren, nicht der BamH1-Linker-Sequenz, die bei der Konstruktion von cDNA alleine verwendet wird, ähnelt. Man nimmt an, obgleich dies hypothetisch ist, daß eine BamH1-Erkennungsstelle in der vollen Länge der cDNA-Sequenz zwischen dem Polyadenylierungssignal und dem poly(A)-Schwanz des Messengers lokalisiert ist, so daß diese BamH1-Stelle in den pBR322-Vektor anstelle des Endes, das durch die Linker-Sequenz geliefert wird, eingesetzt werden kann.

**Konstruktion der Expressionsplasmide**

Geeignete Expressionsvektoren sind Vektoren, welche Sequenzen der DNA enthalten, die für die Transkription ihrer mRNAs in **E. coli** erforderlich sind. Beispiele sind gt11, puc8, puc9, pWR590, pWR590-1, pWR590-2. Bevorzugte Vektoren für den pBOS5-Insert sind die drei Expressionsvektoren pWR590, pWR590-1 und pWR590-2, welche kürzlich beschrieben wurden (Guo, L.H. et al., **Gene 29**, 251–254 [1984]). In diesen Vektoren kann fremde DNA in den Poly-Linkerbereich eingesetzt werden, so daß diese exogenen Sequenzen durch **E. coli**-Zellen in ein Fusionsprotein translatiert werden können, von denen die ersten 590 Aminosäuren durch ein abgestumpftes **E. coli**-β-Galactosidasegen geliefert werden (Guo, L.H. et al., **Gene 29**, 251–254 [1984] und Figur 5a). Unter Verwendung aller drei Vektoren kann ein Fragment fremder DNA an das β-Galactosidasegen in allen drei möglichen Translations-Leserastern gebunden werden.
Der angenommene Codierungsbereich von dem cDNA-Insert aus **Brassica oleracea** ist vollständig innerhalb eines Fragments aus DNA (Fragment L in Figur 3B) enthalten, welches durch Recognitionsstellen für die Enzyme BamH1 (an den Stellen 1–6) und XhoI (Nucleotide 740–745) abgegrenzt ist. Wie in Figur 3C erläutert wird, kann das Fragment L aus pBOS5 theoretisch für ein Fusionsprotein, welches Determinanten, die für ein langes offenes Leseraster codieren, das durch DNA-Sequenzdaten vorgesehen wird, codieren, nur wenn es in den Vektor pWR590-1 eingesetzt ist. Wenn es in irgendeinem der verbleibenden zwei Vektoren, pWR590 und pWR590-2, eingesetzt wird, wäre das Fragment L nicht in dem korrekten Leseraster, bezogen auf das β-Galactosidasegen, und würde die Synthese eines Fusionsproteins, das im wesentlichen durch **Brassica** DNA spezifiziert wird, nicht dirigieren.

Es können so sechs Expressionsplasmide konstruiert werden, wie beispielsweise die sechs Expressionsplasmide, die aus den L- und S-Strängen von **Brassica** konstruiert werden. Die entstehenden sechs konstruierten Stränge können individuell in geeignete Zellen durch Transformation eingearbeitet werden, und die Plasmide in verschiedenen Kolonien, die aus jeder der Transformation hervorgehen, können durch Digestion mit geeigneten Restriktions-Endonucleasen geprüft werden.
Geeignete Zellen für die Transformation des Expressionsplasmids umfassen irgendwelche Stämme, welche seine Vervielfältigung bzw. Vermehrung und Translation erlauben. Beispiele sind **E.coli**-Stämme HB 101, JM 101 und SF8. Besonders bevorzugt ist **E.coli** SF8.
Eine Kolonie aus jedem Versuch, welche das erwartete Muster von Fragmenten ergibt, wurde ausgewählt. Aus **Brassica** besteht das erwartete Muster aus zwei Fragmenten, wovon eines in seiner Größe entweder dem Fragment L oder dem Fragment S entspricht und das andere Fragment identisch mit der Länge zu dem Vektor ist.
Extrakte können aus Kulturen der ausgewählten Transformanten hergestellt werden, und nach geeigneten Verfahren, wie gemäß einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese, fraktioniert werden. Die auf diese Art analysierten Proteine können elektrophoretisch auf Nitrocellulosefilter übertragen werden und mit Antikörpern gegenüber SLGS nach an sich bekannten Verfahren analysiert werden. Das Plasmid, welches das Fragment L gebunden an den Vektor enthält, der die Synthese von SLGS-verwandten Polypeptiden dirigiert, kann durch positive Reaktion mit SLSG-Antiserum oder nach einem anderen geeigneten Verfahren identifiziert werden. Für **Brassica** sollte die Größe der prominenten Bande so sein, wie man sie für ein Fusionsprotein erwartet, welches aus den Aminosäuren des Expressionsplasmids und dem Poly-Linkerbereich und den 123 Aminosäuren, die durch **Brassica** cDNA-Klon codiert werden, besteht.
Wie bereits erwähnt, besitzt die vorliegende Erfindung zahlreiche Anwendungen. Eine davon besteht darin, S-Gene in Samenmaterial, beispielsweise gemäß der Southern-blot-Analyse, genomischer DNA zu identifizieren. Eine andere Anwendung besteht in der Identifizierung stabiler S-Allele mit starken Promotern, beispielsweise durch isoelektrische Fokussierung oder Transformation. Zusätzlich können transformierte Stämme, welche die S-Allele tragen, in Stämme, die unterschiedliche S-Allele tragen, eingepflanzt werden, so daß der Samen, welcher geerntet wird, ein vollständiges Hybrid ist. Weitere Anwendungen umfassen: eine Erleichterung der Hybridsamenproduktion durch einen wirksameren Transfer stabiler S-Allele in Samenmaterialien, beispielsweise durch Transformation, das Brechen bzw. Aufhören der Selbstunverträglichkeit in Frucht- bzw. Obstbäumen, beispielsweise die In-vitro-Mutagenese von S-Genen, oder durch chemische und immunochemische Blockierung der selbstunverträglichen Inbred-Linien, beispielsweise durch Transformation oder In-vitro-Mutagenese.

**Ausführungsbeispiele**

Die folgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung.

**Ausführungsbeispiel 1**
**Herstellung eines Klons, welcher Brassica oleracea cDNA enthält**
**Brassica oleracea** selbstunverträgliche Pflanzen, welche für die $S_6$-, $S_{13}$- und $S_{14}$-Allele, die in der State University New York, Cortland, gehalten wurden, homozygot sind, wurden für das folgende Experiment verwendet.
Homozygotie wurde erhalten, indem man reife Pollen auf unreife und somit selbstverträgliche Stigmas der gleichen Pflanze anwendete.
**Brassica oleracea** cDNA wurde aus polyA+ RNA aus Stigmas einen Tag vor der Anthese hergestellt, indem man mit oligo$(dT)_{12-18}$ entsprechend dem zuvor beschriebenen Verfahren eine Primer-Reaktion durchführte (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning a Laboratory Manual** [1982]).
Nach der Behandlung mit $S_1$-Nuclease (Bethesda Research Laboratories, BRL) und der darauffolgenden Reparatur mit dem Klenow-Fragment von **E.coli** DNA-Polymerase I (BRL) (Maniatis, T. et al., **Molecular Coling: A Laboratory Manual** [1982]) wurde die cDNA mit glatten Enden an BamH1-Linker (BRL) nach an sich bekannten Verfahren ligiert und zur Vervollständigung mit Bam H1 nach an sich bekannten Verfahren digeriert (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]). cDNA-Spezies, die größer sind als 500bp, wurden durch Elektrophorese an einem 1%igen niedrigschmelzenden Agarose-Gel in 0,089molarer Tris-Base, 0,089molarer Borsäure, 0,002 molarer Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatriumsalz) isoliert und in die Bam H1-Stelle von Plasmid pBR322 nach an sich bekannten Verfahren (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]) kloniert. Die Transformation von **E.coli**-SF8-Zellen, die im Handel erhältlich sind, erfolgt nach dem Verfahren von Hanahan, D., **J. Mol. Biol. 166**, 557–580 [1982]).
Ungefähr 2000 unabhängige Klone wurden randomartig aus der cDNA-Bank herausgenommen, und die DNA dieser Kolonien wurde dann auf jedes von zwei Nitrócellulosefiltern transferiert und mit Stigma-cDNA- und Samen-cDNA-Proben hybridisiert.
Die Stigma- und Samen-cDNA-Proben wurden durch Random-Primer-Umkehrtranskription von polyA+ RNA hergestellt (Taylor, J.M. et al., **Biochim. Biophys. Acta 442**, 324 [1976]). Die Stigmaproben wurden aus polyA+ RNA durch Reinigung von **Brassica** selbstunverträglichen Stigmas hergestellt. Samenproben wurden aus polyA+ RNA durch Reinigung von **Brassica** etiolierten Sämlingen hergestellt.
Die recombinanten Klone werden nach dem Kolonie-Hybridisierungsverfahren von Grunstein & Hogness (Grunstein, M. et al., **Proc. Natl Acad. Sci. USA 72**, [1975]) gescreened.
Es wurde gefunden, daß acht Kolonien stark mit der sich von Stigma ableitenden cDNA-Probe hybridisieren, jedoch nicht mit der sich von Samen ableitenden cDNA-Probe reagieren.
Plasmid DNA wurde aus jeder der acht Kolonien nach an sich bekannten Verfahren hergestellt (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]).
Das Plasmid DNA wurde mit Restriktions-Endonuclease Bam H1 digeriert (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]).
Die cDNA-Inserts wurden aus dem Plasmidvektor durch Agarose-Gelelektrophorese und Elektroelution hergestellt (McDonald, M.W. et al., **J. Mol. biol. 110**, [1977]) und wurden mit $^{32}P$ gemäß der Nick-Translation (Rigby, P.W.J. et al., **J. Mol. Biol. 113**, 237–251 [1977]) markiert.

Cross-Hybridisierungsversuche zwischen den verschiedenen isolierten Plasmiden wurden dann nach an sich bekannten Verfahren durchgeführt (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]).
Die Cross-Hybridisierungsversuche zeigen, daß alle acht Recombinant-Plasmide zueinander homolog sind. Das Plasmid, welches den größten cDNA-Einsatz enthält, wird als pBOS5 bezeichnet und besitzt die ATCC-Hinterlegungsnummer 40191.

**Ausführungsbeispiel 2**
**Determination der Nucleotid-Sequenz von Brassica cDNA-Insert in pBOS5**
Durch Restriktions-Endonuclease gebildete Fragmente von pBOS5-Insert wurden in M13-Vektoren mp10 und mp11 subkloniert (Messing, J. et al., **Gene 19**, 269–2766 [1982]), vergleiche Figur 1.
Die DNA-Sequentierung erfolgte mit der entstehenden einsträngigen DNA nach dem Dideoxynucleotid-Kettenterminationsverfahren (Sanger, F. at al., **J. Mol. Biol. 143**, 161–178 [1980]) unter Verwendung von synthetischem 17-mer als Primer (New England Biolabs). Der 17-mer-Primer besitzt die folgende Sequenz:

5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'.

Die Ergebnisse der Nucleotid-Sequenzdetermination längs einer projizierten Aminosäure-Sequenz sind in Figur 2 dargestellt.

**Ausführungsbeispiel 3**
**Herstellung von Fusionsproteinen**
Die Plasmide pWR590, pWR590-1 sind eine Familie von Expressionsvektoren, die dazu geschaffen wurden, daß sie in jeder der drei möglichen Translationsraster Gene verdeutlichen (Guo, L.H. et al., **Gene 29**, 251–254 [1984]). Zur Konstruktion von Expressionsplasmiden von der **Brassica** cDNA-Sequenz werden die 745 bp (L) und die 538 pB (S) Bam H1-Xho I-Fragmente von pBOS5 aus einem 1%igen niedrigschmelzenden Agarose-Gel der gleichen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, isoliert und mit Bam H1- und Sal I-Digests von pWR590, pWR590-1 und pWR590-2 nach an sich bekannten Verfahren ligiert (Maniatis, T. et al., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** [1982]). Die entscheidenden sechs Plasmidkonstruktionen, die als pWR590-L, pWR590-1L, pWR590-2L, pWR590-S, pWR590-1S und pWR590-2S bezeichnet wurden, werden zur Transformierung von **E. coli** SF8-Zellen verwendet.
Transformierte **E. coli** SF8-Stämme werden über Nacht in Anwesenheit von 1 mM IpTG gezüchtet. Die Extrakte werden durch Beschallung in 7M Guanidinhydrochlorid (Guo, L.H. et al., **Gene 29**, 251–254 [1984]) hergestellt, und aliquote Äquivalente zu 500 µl der Kultur werden der Elektrophorese an 10%igen SDS-Acrylamidgelen (Laemnli, U.K., **Nature 227**, 680–685 [1970]) unterworfen. Die abgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf Nitrocellulosemembranen entsprechend Towbin, H. et al., **Proc. Natl Acad. Sci. USA 76**, 4350–4354 (1979) transferiert.
Die Immunomarkierung der Nitrocellulose-Flecken erfolgt wie von Symington, J., „Two-dimensional Electrophoresis of Proteins", Academic Press (1983) beschrieben. Das Antiserum der ersten Stufe wird in einem Neuseeland-Weißen-Kaninchen durch mehrfache intradermale Injektionen von $S_6$-spezifischem Glycoprotein, gereinigt durch präparative isoelektrische Fokussierung, in granulierten Schichten gezüchtet. Die Probe der zweiten Stufe ist ein peroxidasekonjugiertes Protein A.

**Ausführungsbeispiel 4**
Genomische DNAs, isoliert aus verschiedenen **Brassica**-Spezies, beispielsweise **Brassica oleracea, Brassica campestris, Brassica napus, Brassica juncea, Brassica nigra** und **Brassica carinata**, und von anderen Arten der gleichen Familie von Cruciferae (ebenfalls bekannt als Brassicaceae), wie **Raphanus, Lepidium** und **Histera**, werden der Southern-Analyse (Southern, E. J. **Mol. Biol., 98**, 503–517 [1975] unterworfen. Die Nitrocellulose-Flecken der Restriktions-Digests von diesen DNAs werden mit $^{32}$P-markiertem pBOS5 analysiert. In allen Fällen werden Sequenzbindungen, die zu pBOS5 hybridisieren und daher homolog zu pBOS5 sind, nachgewiesen.

FIGURE 1

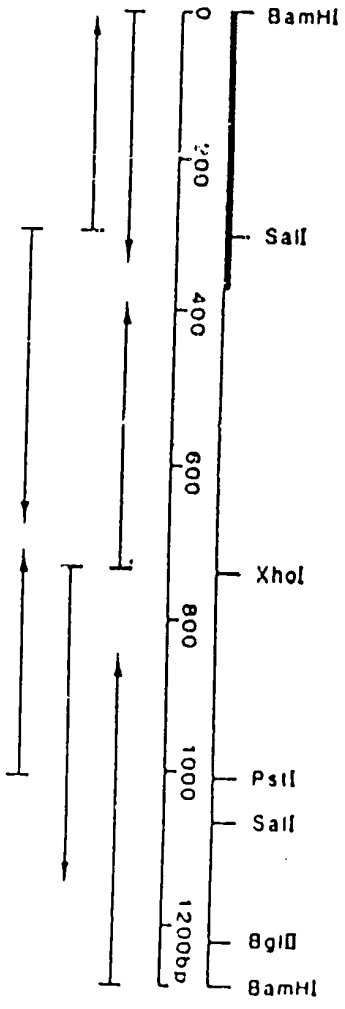

0
200
400
600
800
1000
1200bp
BamHI
SalI
XhoI
PstI
SalI
BglII
BamHI

FIGURE 2

```
     BamHI                                                          50
5'- GGA TCC GTC GTC TTG ATT CTA TTT TGT CCT GCC TTT TCG ATC AAC ACT TTG TCG TCT
    Gly Ser Val Val Leu Ile Leu Phe Cys Pro Ala Phe Ser Ile Asn Thr Leu Ser Ser

                                                  100
ACA GAA TCT CTT AGA ATC TCA AGC AAC AGA ACA CTT GTA TCT CCA GGT AAT AAC TTC GAA
Thr Glu Ser Leu Arg Ile Ser Ser Asn Arg Thr Leu Val Ser Pro Gly Asn Asn Phe Glu

                                          150
CTC GGC TTC TTC CGA ACC AAC TCA AGT TCT CGT TGG TAT CTC GGG ATA TGG TAC AAG AAA
Leu Gly Phe Phe Arg Thr Asn Ser Ser Ser Arg Trp Tyr Leu Gly Ile Trp Tyr Lys Lys

                              200
TTG CTC GAC AGA ACC TAT GTA TGG GTT GCC AAC AGA GAT AAC CCA CTC TCC AAT GCC ATT
Leu Leu Asp Arg Thr Tyr Val Trp Val Ala Asn Arg Asp Asn Pro Leu Ser Asn Ala Ile

                  250
GGA ACC CTC AAA ATC TCA GGC AAT AAT CTT GTC CTC CTT GGT CAC ACC AAT AAA TCT GTT
Gly Thr Leu Lys Ile Ser Gly Asn Asn Leu Val Leu Leu Gly His Thr Asn Lys Ser Val

   SalI                                                         350
TGG TCG ACG AAT CTT ACT AGA GGA AAT GAG AGA CTT CCG GTG GTG GCA GAG CTT CTC TCT
Trp Ser Thr Asn Leu Thr Arg Gly Asn Glu Arg Leu Pro Val Val Ala Glu Leu Leu Ser

                                              400
AAT GGA AAC TTC GTGATGCGAGACTCCAGTAACAACGACGCAAGTGAATACTTGTGGCAAAGTTTCGATTACCCTACGGATACTTTGCT
Asn Gly Asn Phe

 450                                          500
TCCAGAGATGAAACTGGGTTACGACCTCAAAACAGGGTTGAACAGGTTCCTTACATCATGGAGAAGTTCAGATGA''CCATCAAGCGGGGATTTCTCGT

    550                                       600
ACAAGCTCGAAACCCGAAGCCTTCCTGAGTTTTATCTATGGCATGGGATCTTTCCAATGCATCGGAGTGGTCCATGGAATGGAGTCCGATTTAGTGGC

       650                                    700
TACCAGAGGACCAAAAGCTGAGTTACATGGTGTACAATTTCACAGAGAATAGTGAAGAGGTCGCTTATACATTCCGAATGACCAACAACAGCATCTA

XhoI  750                                     800
CTCGAGATTGACACTAAGTTCCGAAGGGTATTTTCAGCGACTTACGTGGAATCCGTCAATAGGGATATGGAACAGGTTCTGGTCTTCTCCAGTGGACCCC

          850                                 900
CAGTGCGATACATACATAATGTGCGGGCCTTACGCTTACTGTGGCGTGAACACATCACCTGTTTGTAACTGTATCCAAGGGTTCAATCCCCGGAATAT

          950                                 PstI
ACAGCAGTGGGATCAGAGAGTCTGGGCAGGTGGGTGTATAAGGAGGACGCGGCTTAGCTGCAGTGGAGATGGTTTTACAAGGATGAAGAACATGAAGC

              1050      SalI                      1100
TGCCAGAAACTACGATGGCGATTGTCGACCGCAGTATTGGTGTGAAAGAATGTGAGAAGAGGTGCCTTAGCGATTGTAATTGTACTGCTTTTGCAAAT

                        1150                              1200
GCAAATGCGGATATCCGGAATGGTGGGACGGGTTGTGTGATTTGGACCGGACGGCTTGACGATATGCGGAATTACGTTGCTCACGGTCAAGATCTTTATGTCAG

                  1250                  BamHI
ATTGGCTGTTGCTGACCTTGTTTAGCTCTTTCTCTTAAAATAAAGCACGGATCC-3'
```

FIGURE 3A

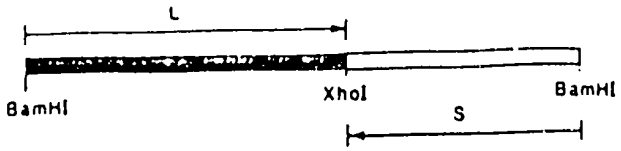



FIGURE 3B

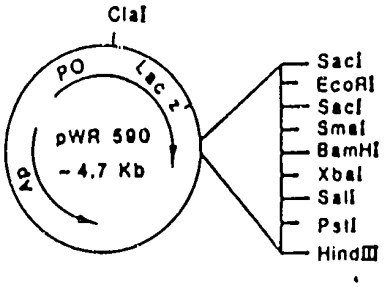



FIGURE 3C

pWR590/L

```
382 383        Sac I                                  Bam HI
CGC AAC CCG CCG AGC TCG AAT TCG AGC TCG CCC CCG GAT CCG TCG TCT TGA
Gly Asn Arg Ala Ser Ser Asn Ser Ser Ser Pro Gly Asp Pro Ser Ser Stop
```

pWR590-1/L

```
382 383        Sac I                                  Bam HI
GGC AAC CCG CGC GAG CTC GAA TTC GAG CTC GCC CGG GGA TCC GTC GTC (15 nucs) TGA
Gly Asn Pro Gly Glu Leu Glu Phe Glu Leu Ala Arg Gly Ser Val Val ( 5 aas)  Stop
```

pWR590-2/L

```
398 399        Sac I                                  Bam HI
GAT CTC CGG CGA GCT CGA ATT CGA GCT CGC CCG GGG ATC CGT CGT CTT (15 nucs) TAG
Asp Arg Gly Arg Ala Arg Ile Arg Ala Arg Pro Gly Ile Arg Arg Leu (10 aas)  Stop
```