РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(19) BG

(11) 62891 B1

6(51) C 12 N 15/00
C 12 N 15/29
C 12 N 15/82
C 12 N 15/83
C 12 N 15/84
C 07 H 21/00
C 07 H 21/02
C 07 H 21/04
A 01 H 1/00
A 01 H 1/02

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21) Регистров № 99033
(22) Заявено на 08.09.94
(24) Начало на действие на патента от: 05.03.93

Приоритетни данни

(31) 847908 (32) 09.03.92 (33) US

(41) Публикувана заявка в бюлетин № 9 на 29.09.95
(45) Отпечатано на 31.10.2000
(46) Публикувано в бюлетин № 10 на 31.10.2000
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентопритежател(и):
WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, PULLMAN, WA (US)

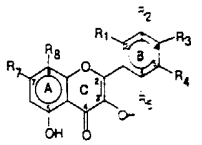
(72) Изобретател(и):
Loverine P. Taylor
Yinyuan Mo, Pullman, WA (US)

(74) Представител по индустриална собственост:
Фани Владимирова Божинова, 1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US93/01898, 05.03.93
(87) № и дата на PCT публикация:
WO93/18142, 16.09.93

(54) МЕТОДИ ЗА РЕГУЛИРАНЕ НА ФЕРТИЛИТЕТА НА РАСТЕНИЯ

(57) Растения, при които флавоноловата активност е намалена, са условно мъжки фертилни (плодовити) /CMF - УМФ), а мъжкият фертилитет може да се спаси или да се възстанови, като се доставят възстановяващи фертилитета флавоноли на местата на цветния прашец в растението. Въпреки че жизненият полен се продуцира от растенията с флавонолова недостатъчност, покълването на прашеца и растежа на тръбата са значително намалени както in vivo, така и in vitro, като се получават самостерилни растения. При поставяне на прашеца в контакт с известно количество възстановяващ фертилитета флавонол, ефективен при засилване кълняемостта на прашеца, могат да бъдат възстановени напълно кълняемостта на прашеца и растежа на тръбата. Полезните за възстановяване на фертилитета флавоноли включват съединения с формула



в която R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7 и R_8 са водород, хидроксилен или алкоксилов радикал, имащи от 1 до 3 въглеродни атома. Предпочитаните флавоноли включват галангин, кемпферол, iso-рамнетин, кверцетин и морин.

10 претенции, 6 фигури

BG 62891 B1

(54) МЕТОДИ ЗА РЕГУЛИРАНЕ ФЕРТИЛИТЕТА НА РАСТЕНИЯТА

Област на техниката

Изобретението се отнася до метод за регулиране на фертилитета при растенията, а по-специално, до създаването на флавоноидна недостатъчност, условно мъжки фертилни растения, чрез блокиране активността на хлавонон-3-хидроксилазата в растенията, и до възстановяването на фертилитета (плодовидостта) при условно мъжки фертилните, с флавоноиден недостиг, растения, чрез осигуряване на възстановяващи фертилитета флавоноли при поленовите сайтове на растенията.

Предшестващо състояние на техниката

Успешното опрашване на висшите растения е важно, не само за продължаването на вида, но също и за осигуряване на големите популации, които са източник на изменчивост и конкуренция, които движат естествения подбор. В постдисперсната фаза от развитието на мъжките гаметофити, полена покълва върху близалцето и избутва тръбичката през пората на покълване в стената на полена. При ангиоспермия, растящата поленова тръбица представлява провод за миграцията на двете спермени клетки през стиларната тъкан до зародишната тръбичка, където те се сливат с яйцеклетката и централните клетки до образуването на зиготата и ендотерма, съответно (E.G. Cutterg 1978, Plant Andtomy, Part 1, Experimentation and Interpretation. E.Arnold. Eds., Addison Wesley, London, ahap. 6). Развитието на полена се осъществява в прашника и при зрялост, всяко семе представлява многоклетъчна спора, съдържаща продукти и от двете – спорофитна генна експресия, произлизаща от вътрешния слой на стената на прашника (tapetum), и хаплоидна генна експресия от вегетативната клетка във всяко семе (J.P.Mascarenhas, 1990, Annu,Rev.Plant Physiol.Plant Mol. Biol. 41:317; J.P.Mascarenhas, 1989, Plant Cell 1:657). Въпреки, че процесът на микроспорогенезата е добре документиран исторически, малко се знае за молекулярните и биохимични фактори, които се включват при постдисперсното поленово функциониране.

Флавоноидите са голям клас нискомолекулни (300) специфични за растенията метаболити, които споделят обща 15 въглеродна скелетна структура. Модификация на основната структура води до внушителен брой съединения, класифицирани по степента на окисление и характера на заместването на различните пръстени. Някои класове са пигменти (например, антоцианини, халкони и специфични флавоноли и флавони), докато други класове са безцветни абсорбиращи ултравиолета съединения. Антоцианините, в частност пеларгонина, цианидина и делфинидина, са отговорни за червения, синия и и виолетовия цвят на растенията. Други пигментирани флавоноиди, халконите, и някои флавоноли, допринасят значително за жълто, слонова кост и кремавото оцветяване на цветята. Поленовите хлавоноиди са идентифицирани в някои видове, където придават отличим жълт цвят на полена и могат да заемат голям процент (2-5%) от сухото тегло (R.Zerback, M.Bokel, H.Geiger, D.Hess, 1989, Phytochemistry 28:897; R.Wierinann and K.Vieth, 1983 Protoplasma 118:230). Съществуват доказателства, че поленовото зърно е специфична среда за биосинтезата на хлавоноидите и/или акумулирането, като няколко растителни вида притежават уникални типове флавоноиди в полените им (O. Ceska and E.D. Stylesq 1984, Phytochemistry 23:1822).

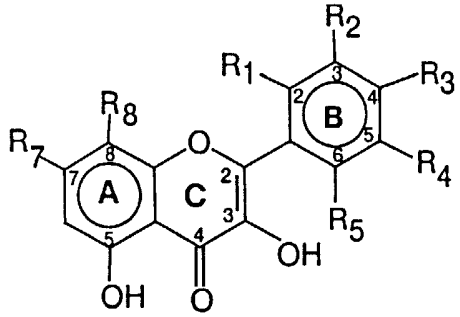
Растения, притежаващи модифицирана флавоноидна пигментация, са описани от преди в литературата. Например, мутант на царевица, продуциращ нефункционален, по-скоро бял, отколкото жълт полен, е бил изолиран и охарактеризиран (Coe E.H., McCormick S. M., and Modena S.A., 1981, "White pollen in maize", J.Hered 72:318-320). Мутантът с бял полен разпространява нормални количества от непигментиран полен, който покълва върху свилата, но не се получават семена след повечето поленизации. Състоянието е спорофитно определено чрез експресията на стабилни рецесивни мутации при двата халкон-синтетазни (CHS) гена на царевицата, C2 and Whp. Наскоро, бе докладвано, че Agrobacterium-медиирано въвеждане на CHS трансген в кръстосана пигментирана петуния, премахва експресията на ендогенния CHS ген(и), в резултат на което цветното венче е изцяло лишено от флавоноидна пигментация (Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R, 1990, "Introfductionof a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-repression of homologous genes in trans", Plant Cell 2:279-278). Тъй като експресията на CHS трансгена е също подтисната в тези растения, терминът ко-супресия се използва за

описването на този феномен (Jorgensen R, 1990, "Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes", Trends Biotech 8:340-344). Интегрираният трансген действа като несвързан доминантен инхибитор на ендогенния CHS ген(и) и води до пълно блокиране при продуцирането на видими флавоноидни пигменти, не само във венчелистчетата, но и в репродуктивните органи.

Блокирането на експресията на CHS гена води не само до недостатъчност на флавоноидната пигментация, но и до нефертилни растения (Coe et al., 1981; Taylor et al., 1992, "Conditinal Male Fertility in Chalcone Synthase Deficient Petunia", J.Hered 83:11-17). Крайно желателно е да се запази фертилитета при растенията с CKS недостатъчност, а също и да се даде възможност да се регулира фертилитета на растенията, чрез контролиране на един ензим, по-тясно свързан с поленовия фертилитет, отколкото CHS.

Техническа същност на изобретението

Вече е открито, че растения, при които флавон-3-хидроксилазната (F3H) активност е намалена, по такъв начин, че да се получи флавонолна недостатъчност, са условно мъжко фертилни (CMF), а този мъжки фертилитет може да бъде спасен или възстановен чрез осигуряване на условия, при които полена на растенията да може да влезе в контакт с възстановяващите фертилитета флавоноли. F3H активност може да бъде намалена чрез блокиране F3H производството в растенията, директно или индиректно, например чрез инактивиране на естествено продуцирания в растенията F3H, или чрез намаляване активността на ензима-предшественик, такъв като халкон синтетазата (CHS) в флавоноловия биосинтетичен път. Въпреки че жизнеспособен полен се продуцира от растения с F3S недостатъчност, покълването на полена и растежа на тръбата са сериозно намалени, както in vivo и in vitro, при което се получават самостерилни растения. Въпреки това, при осигуряване на условия, при които полена на растенията да може да влезе в контакт с възстановяващите вертилитета флавоноли, може да бъде възстановена способността на растенията на пълна поленова кълняемост и растеж на тръбата. Подходящи условия за възстановяване на фертилитета, включват всички условия, при които нужните флавоноли са достъпни за полена на растенията, включително, например, чрез отстраняване F3H понижаващото обстоятелство, възстановяване F3H производството в растенията, и други подобни. Алтернативно, фертилитета на растенията може да бъде запазен или възстановен като се постави в контакт полена на растенията с известно количество възстановяващ фертилитета флавонол, ефективен при засилване на кълняемостта и/или растежа на поленовата тръба. Полезните за възстановяване на фертилитета флавоноли включват съединения с формула



където R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7 и R_8 са водород, хидрокси или алкокси радикал, притежаващ от 1 до 3 атома. Най-предпочитаните флавоноли включват галангин, кемпферол, iso-рамнетин и морин.

Описание на приложените фигури

Описаните аспекти и много от предимствата на настоящото изобретение ще бъдат много по-пълно оценени, по-добре разбрани чрез подробно описание, като се вземе в съчетание с приложените фигури, от които:

Фигура 1 схематично представя спорофитното влияние (диагоналните щрихи) върху развиващите се микроспори в халкон синтетазни (CSH) хетерозиготни растения. Отсъствието на CHS функция в спорофита е означено с бял фон (фигура 1A), а наличието на CHS функция е означено с черен фон (фигура 1B).

Фигура 2A и 2B представляват фотографии на in vitro покълващ полен от кръстосана петуниева линия V26 (фигура 2A) и растение 02425.1 с CSH недостатъчност (фигура 2B), където полена от прясно разпуканите прашници се суспендира в течна среда и се фотографира след прорастване при стайна температура, в продължение на 6 h. Линията на фигура 2A отговаря на 2 μm. Стрелките на фигура 2B сочат поленовите тръби, опитвайки се да покълнат.

Фигура 3 представлява хотографии на

напречно срязани, идентични по развитие прашници от наследствена петуниева линия V26 (лява колона) и от растение 02425.1 с CHS-недостатъчност (дясна колона), които са били изолирани, фиксирани, закрепени, напречно срязани и оцветени с толуидин-блу, както е описано в пример 3. Фигура 3А показва целия срез на прашника непосредствено преди разпукването, когато прашниците с CHS-недостатъчност са кафеникави и повехнали. Линията на фигура 3А е 200 μm. Фигура 3В показва срезове на прашник 48 h преди разпукването, когато трансгенните прашници са закръглени и бели. Фигура 3С показва срезове на прашници, както на фигура 3А при увеличение като на изображенията на фигура 3В. Стълбчето на фигура 3В е 50 μm. Фигура 3D показва зрял полен при разпукване. На фигура 3, Р означава полен, Е – ендотециум, S – стомиум, С – кутикула.

Фигура 4 представлява фотография на възстановяването на поленовото покълване и растежа на тръбата на полен от петуния с CHS-недостатъчност, чрез възстановяващия фертилитета флавонол, кемпферол. полена се взима от прашници с условно мъжки фертилитет, суспендират се в среда за покълване и се прибавя кемпферол (К+, фигура 4С) или DMSO (К-, фигура 4В) до крайна концентрация 1 μm. Репрезентативни участъци от полена са заснети след 4-часово инкубиране. покълването и растежа на тръбата, наблюдавани при запазения с кемпферол CMF полен (фигура 4С) е неотлъчим от дивия тип V26 контрола (С, фигура 4А), който е получил само DMSO. CMF поленът без добавки (фигура 4В) показва изпъкналост при пората на покълване при някои семена, но не се избутват поленови тръби.

Фигура 5 представлява HPLC профил на метанолни екстракти от близалцето на дивия тип V26 (фигура 5А) и CMF близалце (фигура 5В). Абсорбция при 360 nm на 100 μl аликвоти от екстракти, приготвени от 150 g близалца и фракционирани в метанол-вода градиент върху обратно-фазова C_{18} колона. Притурката на фигура 5А е УВ/видимия спектър на пика в 33,17 min и е идентичен, на този получен от автентичен кемпферолов стандарт. HPLC профил и УВ/видим спектър на кисел хидролизиран V26 екстракт от близалца показват, че най-големите пикове във времето на задържане 7.43, 10.10, 13.46 и 16.65 са гликозиди на кемпферола и кверцетина.

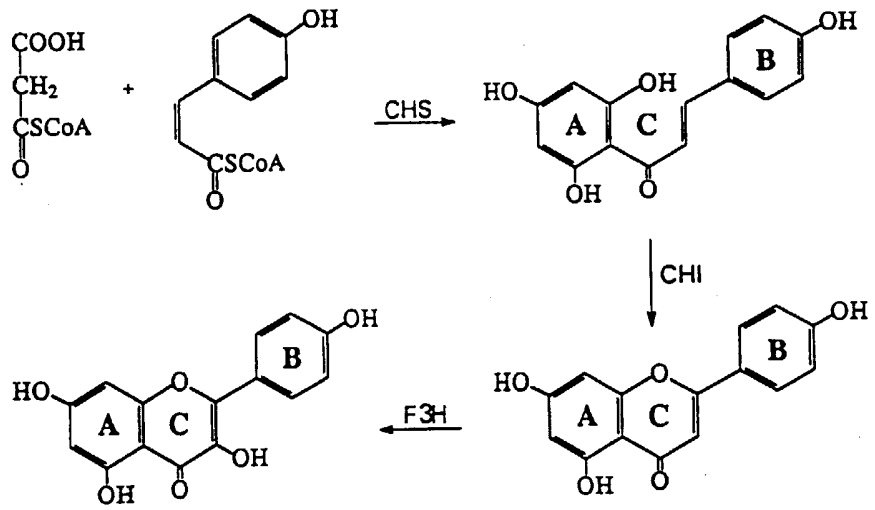
Фигура 6 е графично изображение на честотата на покълване на полена във функция от повишаването на концентрацията на флавонол гликол, при което се добавят кемпферол (отворени кръгове), морин (затворени кръгове), мирицетин (отворени триъгълници) и 3-хидроксифлавон (затворени триъгълници) към средата за покълване (GM) до посочените крайни концентрации, а покълването се изчислява след 4 h инкубиране. Средната честота на покълване, измерена при три отделни експеримента се разпределя по стандартната грешка на средното (SEM). SEM < 1,4 не са видими. Честотата на покълване на контролния полен от див тип V26 е типично 75%, а резултата от незапазен DMSO-третиран CMF полен е между 1-2% поленизация.

Примери на изпълнение на изобретението

Съгласно един от аспектите на настоящото изобретение, фертилитета на растения при флавоноидна недостатъчност, условно мъжко фертилни (CMF) растения се възстановяват чрез осигуряване на условия, при които полена от растенията може да влезе в контакт с възстановяващите фертилитета флавоноли. При един илюстративен вариант, подходящи условия могат да се постигнат като се постави в контакт полена на растението с известно количество възстановяващ фертилитета флавонол, способен да засили покълването и растежа на тръбата на полена на растението. Както се използва тук, под термина флавонидна-недостатъчност, условно мъжко фертилни или CMF растения се подразбира, че се включват растения, при които халкон синтетазната (CHS) или флаванон-3-хидроксилазната (F3H) активност са намалени, било то естествено или трансгенетично, за да се прекъсне естественото производство на флавоноиди в растението. В съответствие с това, условно мъжко фертилни растения с флавоноидна недостатъчност, ще бъдат с типична пигментна недостатъчност, което се изразява в бяло или светло оцветяване, и ще бъдат типично самостерилни. Предвид това, изобретението ще бъде описано в детайли във връзка с CMF петунии или царевица, други CMF растения могат да бъдат използвани по подобен начин при практическото осъществяване на изобретението.

В съответствие с друг аспект на изобретението, фертилитета на растенията може да бъде регулиран чрез блокиране на активността на флаванон-3-хидроксилазата (F3H), за да се получи

CMF растение, което нормално е самостерилно, но чийто фертилитет може да бъде спасен или възстановен като се постави полена на растението в контакт с възстановяващ фертилитета флавонол, както е описано тук. В естествения флавонолов биосинтетичен път, халкон синтетазата (CHS) кондензира три молекули малонил-Co-A и една молекула p-кумароил, за да се образува халкононарингинин, който се превръща в нарингенин спонтанно (в ниска степен) и под действието на халкон-флавонон изомераза (CHI). При следващата стъпка от пътя, F3H катализира прибавянето на хидроксилна група към 3-позиционния въглерод от C пръстена, за да се получи флавонол, който е нужен, за да се възстанови фертилитетната активност, в съответствие с настоящото изобретение. Общият път може да бъде представен както следва:



F3H е ограничаващият нивото ензим при производството на флавоноли, и е бил преди това клониран от Antirrhinum majus (Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J. and Vrijlandt, E., 1991, "Control ofbiosynthesis in flowers of Antirrhinum majus" The Plant J. 1:37-39). Тъй като флавонол агликонови съединения са нужни за мъжкия фертилитет, както е описано тук, всеки начин, който ефективно блокира F3H хидроксилиращата активност може да бъде използван при практическото осъществяване на изобретението. Така например, F3H субстрати могат да бъдат отстранени чрез блокиране производството на предшественици в биосинтетичния път, или експресията на F3H, CHI или CHS може да бъде блокирана чрез намесване в генната експресия. В друг илюстративен вариант, растения с блокирано флавонолово производство могат да бъдат произведени чрез експресия на противоположна РНК в растенията, която хибридизира с mPHK кодираща или нужна за експресията на F3H или на ензим предшественик, като например CHI, при растенията. Например, тапетен клетъчно-специфичен промотор може да бъде слят с F3H гена с антисенс ориентация, и слетият елемент може да бъде въведен в растителни клетки, като от тютюн, петуния, домат или други растителни клетки, като се използват известни техники, като Agrobacterium-медиирана трансформация, бомбардиране с частички, техники на директно въвеждане на ДНК и други подобни (виж например Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R, 1990, "Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-repression of homologous genes in trans", Plant Gell 2:279-289; Mariani, C., De Beuckleer, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B., 1990, "Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene", Nature 347:737-741; and Oeller, P.W., Min-Wong, L., Taylor, L.P., Pike, D.A., and Theologis, A., "Reverrsible inhibition of tomato fruit senescens by antisense RNA, "Science 254:437-439). Промоторът на тапетума може да бъде изолиран чрез диференциално сДНК клониране (Coldberg, R.B., 1988, "Plants: novel developmental processes", Science 240:1469-1467) или чрез използване на хибридизационна проба, генерирана от полимеразна верижна реакционна (PCR) амплификация на геномните последователности (виж Saiki, R.K., 1990, "Amplification of genomi cDNA, in PCR Protocols, M.A. Innin, Felfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J., eds, Academic Press, San Diego, pp. 13-20) хомоложни на преди това публикувани

специфични за тапетума промотори. Алтернативно, F3H гена може да бъде изолиран чрез генериране на хибридизационна проба, като се използват PCR олигонуклеотидни праймери (виж Saiki, R.K., 1990, supra) основавайки се на публикуване последователността на Antirrhinum F3H. Като друга алтернатива, гена, кодиращ за F3H, CHI или CHS в растението може да бъде променен, мутиран, остранен, блокиран или по друг начин да се намали неговото действие, за да се избегне експресия на F3H ензима в растението. Например, гена, кодиращ F3H ензима в растението, може да бъде премахнат от ядрения геном на растението и да бъде заместен с F3H гена, оперативно свързан с един индуцируем промотор, както е описано в EP 0465024, да се позволи контролираното отблокиране на флавоноловата продукция и да се запази фертилитета на растението, чрез индуцирана отвън генна експресия. Освен блокирането на синтезата на F3H in vivo, става ясно, че F3H активността може да бъде блокирана с частици, които директно взаимодействат с F3H, за да инактивират или намалят неговата хидроксилазна активност. В допълнение, производството на флавоноли, може да бъде намалено, чрез блокиране на CHI активността. Все пак тази алтернатива не е много за предпочитане, тъй като превръщането на халкононаринген ина в наринген ин става спонтанно в ниска степен в отсъствие на CHI.

Намаляването на мъжката функция в растения с липса на флавоноли, като резултат от недостатъчност на CHS, CHI или F3H активности, завършва с неголеми аномалии в поленовото развитие, до момента непосредствено преди разпукването, когато морфологията на прашника се отклонява от нормалните цвят, форма и размери. При разпукването, поленът, остава групиран в прашника и при микроскопско наблюдение се забелязва значително количество от семената в камерите, по-повехнали от нормално. Все пак се произвежда жизнеспособен полен и се разпръсква, като кълняемостта на полена и растежа на тръбата са силно намалени, както in vivo, така и in vitro. В добавка на функционалната мъжка стерилност, растенията с флавонолова недостатъчност показват някои аспекти на самонесъвместимост, както се вижда от факта, че полена може да бъде частично запазен от близалцето на растения от дивия тип, но не и от близалцето на растения с флавонолова недостатъчност. въпреки че са налице елементи, както от мъжка стерилност, така и от самонесъвместимост, характерните черти, които показват полен от растения с флавонолова недостатъчност, ясно съставят уникално състояние, което се описва тук като условен мъжки фертилитет CMF.

Растения с липса на CHS (следователно с липса на флавоноиди) изглеждат нормални, с изключение на две качества: 1) липса на флавоноидна пигментация и 2) производство на повреден полен, който е изцяло зависим от пестика (близалце + стълбче), за да функционира.

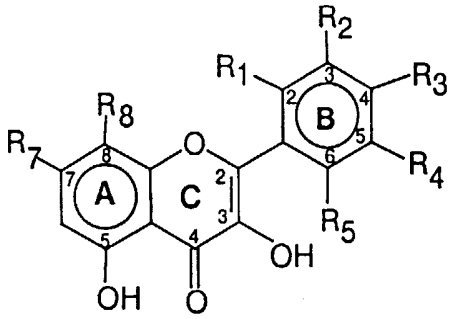
Докато растенията с CHS недостатъчност споделят липсата на флавоноидна пигментация и понижената функция на полена, изпъкват някои разлики между растителните видове. Царевичният бял полен покълва върху свилата и продуцира поленова тръба, чийто растеж се ограничава в стълбчето. Освен това, царевичният мутантен полен покълва in vitro и продуцира тръба приблизително толкова дълга колкото при дивития тип (L.P.Taylor, unpub.obs.). В противовес полен от петуния с флавоноидна недостатъчност не навлиза в близалцето, нито продуцира тръба, както in vivo така и in vitro. Тази разлика между царевица и петуния може да бъде обяснена от гледна точка на физиологичните разлики между триклетъчен (царевица) и двуклетъчен (петуния) полен. Двуклетъчният полен има ниско дихателно ниво след разпръскване, образува втората спермена клетка след разпръскването, може да се задържи на близалцето за няколко часа преди покълването и има ниска степен на първоначален растеж на поленовата тръба. Триклетъчният полен, организационно, има второто митотично делене преди прашниците, притежава високо дихателно ниво след разпръскването, покълва за минути след влизането му в контакт с повърхността на близалцето и има висока степен на първоначален растеж. Тъй като триклетъчният полен е позициониран, така че бързо да прорасне след разпръскването, царевичните поленови тръби на белия полен растат до значителна дължина преди да се активира какъвто и да е механизъм, който би задържал растежа на тръбата.

При цъфтящите растения със смяна на генерациите, диплоидния спорофит произвежда хаплоидни спори, които растат и се делят митотично до получаване на гаметофита. Част от гаметофитния жизнен цикъл се осъществява по времето когато развиващата спора е в тесен контакт със заобикалящата спорофитна тъкан. Това подреждане има потенциал за диплоидно-хаплоидно взаимодействие. При хетерозитоните растения, това взаимодействие включва също така, и хаплоидно-хаплоидна комуникация между двата типа гаметофити, както е показано на

фигура 1. Фактът, че описаната тук мъжка стерилност от флавоноидна недостатъчност при петунията, е генетично доминантна, докато мъжката стерилност при белия полен на царевицата е генетично рецесивен, води до един интересен извод по отношение за това дали гаметофита или спорофита е отговорен за ефекта. При царевицата, мъжката стерилност се експресира само при рецесивни хомозиготни растения за двата CHS гена, c2 и Whp. Хетерозиготни с единично функционално копие на C2 или Whp продуцират 100% жълти, фертилни поленови зърна (Ife et al., 1981). Така, в хетерозигота CHS-положителният спорофит или 50% CHS-положителните гаметофити повлияват експресията на фертилитета в CHS-отрицателните гаметофити. В трансгенетичната петуния, мъжката стерилност е свързана с доминантен белег и полена, произведен от хетерозиготните растения е 100% с мъжка стерилност. При този случай, стерилността се причинява или от инхибиране на CHS-положителните гаметофити чрез CHS подтиснати гаметофити, или чрез CHS недостатъчност, прининяваща мъжка стерилност, която се проявява еднакво при царевицата и петунията, и при двата вида по-скоро спорофита причинява стерилния фенотип, отколкото гаметофита. Така, условния мъжки фертилитет, свързан с CHS недостатъчност при царевицата и петунията има обща физиологична основа.

Производството на условно стерилен полен от растения с флавоноидна недостатъчност може да се използва като основа един опит за in vitro спасяване на полена. Специфичните съединения, нужни за функционирането на полена могат да бъдат идентифицирани като се инкубира трансгенетичния полен в разтвор за покълване, към който са прибавени пречистени флавоноиди или растителни екстракти и като се изследва засилената честота на покълване и растежа на поленовата тръба. По този начин се определи, че голямото семейство флавоноидни съединения, най-общо, не е еднородно ефективно при възстановяването на фертилитета при CMF растения, докато специфичната група от възстановяващи фертилитета флавоноли – агликони, е ефективна за тази цел.

Който и да е флавонол, който е ефективен при спомагането на покълването на полена на CMF растение, може да бъде използван при практическото осъществяване на изобретението. Открито е въпреки това, че повечето членове на сравнително голямото семейство флавоноиди са неефективни за тази цел. В съответствие с това, ключов аспект на изобретението е, че изключително ефективни възстановяващи фертилитета хлавоноли могат да бъдат идентифицирани и използвани при възстановяването фертилитета на растенията при CMF самостерилни условия. При един предпочетен вариант на изобретението, възстановяващия фертилитета флавонол е съединение с формула



характеризираща се с това, че R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7 и R_8 са водород, хидрокси и алкокси радикал, притежаващи от 1 до 3 въглеродни атома. За предпочитане, не повече от два от R_1-R_5 са хидрокси или метокси, а оставащите R_1-R_5 са водороди, а R_7 и R_8 са водород, хидрокси или метокси. Понастоящем, най-предпочетени и най-репрезентативни възстановящи фертилитета флавонолови съединения, съгласно изобретението, включват галангин, кемпферол, iso-рамнетин, кверцетин и морин, които имат обща химическа структура, посочена по-горе със следните заместители:

ТАБЛИЦА 1

флавонол	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_7	R_8
галангин	H	H	H	H	H	OH	H
кемпферол	H	H	OH	H	H	OH	H
iso-рамнетин	H	OCH_3	OH	H	H	OH	H
кварцетин	H	OH	OH	H	H	OH	H
морин	O	H	OH	H	H	OH	H

Други флавоноли използвани при практическото осъществяване на изобретението могат да бъдат точно определени като се използват методите за изследване спасяването на полена in vitro, посочени по-горе.

Казаното може да бъде по-добре илюстрирано със следващите примери, които са представени като илюстративни, а не като ограничителни.

Пример 1. Фертилитет на петунии с халконсинтетазна недостатъчност

Трансгенни и наследствени V26 петунии се поддържат не 16/8 h фотопериод в парник с металохалогенни светлина с интензитет 300-600 $\mu mol^{-2}s^{-1}$. Наследствена V26 е пигментирана линия от Petunia hybrids, която може да продуцира флавоноиди в повечето растителни тъкани, включително полена, прашника и филаментите, и пестика (близалце и стълбче) и е напълно самосъвместима. Анализираният трансгенетичен материал се състои от два независими трансформирани регенерата, 218.38 и 218.41 (Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R, 1990, "Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-repression of homologous genes in trans", Plant Cell 2:279-289) и индивиди от втората генерация обратно кръстосване (BC2) към родителската V26 линия (номера на популациите от 2425 до 2435). Т-ДНК инсъртът в тези трансформанти съдържа, CHS сДНК последователности слети с вирусен промотор свързан към гена на неомицин фосфотрансфераза II, като селекционен маркер (Napoli et al., 1990). Осъществяват се кръстосвания с женски цветове 24 h преди прилагането на полена. Всички трансгенетични цветове, използвани при кръстосването, не показват видими белези от пигмент. Донорите на полен се избират от растения, които имат 2 или 3 разпукани прашника или се изрязват от закръглени, пред разпукване прашници, както е отбелязано. Трансгенетичните петуниеви растения 218.38 и 218.41 продуцират чисто бели цветове след въвеждането на едно допълнително копие от CHS гена. Когато се наблюдава CHS експресия в трансгенетичните венчелистчета, се открива индукция на РНК 50 пъти в сравнение с нетрансформираните V26 родители или соматични ревертанти, в двата – ендогенни и въведени CHS гени. V26 наследствената линия произвежда пурпурни антоцианинови пигменати в листата, ствола, стеблото, стълбчето и филаментите на прашника, и жълти халкони в развиващите се прашници. За сравнение, трансформираните растения нямат отличими флавоноидни пигменти в коя да е от тези тъкани. липсата на видим пигмент е потвърдена чрез HPLC анализ на метанолни екстракти, както е описано в пример 6. Нормално, точно преди разпръскването, прашниците на петунията, пълни със зрял полен, претърпяват изсушаване. При разпукването, когато кутийката на прашника се скъсва надлъжно по дължината на стомиума, дехидратираното състояние на тъканта позволява двата края на мастите на прашника, завити назад един спрямо друг, да разкрият поленовите зърна. Изследване отблизо на непигментираните трансгенетични растения разкрива, че през 48-те h предхождащи разпукването, прашника се свива средно около 40% на дължина и променя цвета си от кремавобял до кафеникав. За сравнение, прашниците на нетрансформираните родителски линии V26 се свиват само около 15% и не претърпяват промяна на цвета, като остават жълти по време на този период. Голямата вариация на честотата на разпукване на прешници е от 0 до 100%, с най-висока честота, свързана с намаляване на относителната влага. Въпреки това, разпукването може да бъде леко забавено в сравнение с V26 родителите, прашниците с флавоноидна недостатъчност се отварят, за да разкрият нормално количество полен, който не изглежда толкова светъл и ронлив като полена на V26 и остава групиран в кутийката на прашника.

Не се получават семена от многобройните опити за самоопрашване на поколението 218.41 с флавоноидна недостнатъчност, като се използва или: 1) полен от свити, кафеникави, разпукани прашници или 2) полен изрязан от бели, закръглени прашници преди разпукване (виж таблица 2. колона 5, "трансгенетично самокръстосване: 0 семена/семенник"). Само кръстосване на V26 родителската линия продуцира средно 225 семена за семенник. Това прави приблизително около 17000 възможни семена в 75-те опита са само кръстосвания на трансгенетични петунии. Всички изброени растения в таблица 2 се тестуват за женски фертилитет чрез опрашване на близалцето с полен от наследствена линия V26. При всички случаи, семенниците се продуцират с нормалния брой семена, което означава, че растения с CHS-недостатъчност са с женски фертилитет. Обратното кръстосване, трансгенетичен полен с флавоноидна недостатъчност върху V26 близалца, дава производство на вариращи количества семена, както е показано на таблица 2.

ТАБЛИЦА 2

ПРОИЗВОДСТВО НА СЕМЕНА ОТ КРЪСТОСВАНЕ НА ТРАНСГЕНЕТИЧЕН ПОЛЕН

Родителски полен [a]	Брой на опрашвания			
	V26 X трансгенетичен полен			Трансгенетично само кръстосване
	0 семена/ семенник	1-150 семена/ семенник	>150 семена/ семенник	0 семена/ семенник
02425	0	2	0	8
02430.5	0	5	3	6
02430.6	2	1	0	6
02430.8	ND	ND	ND	6
02432.2	ND	ND	ND	6
02435.1	0	1	1	6
02435.2	1	4	1	8
02435.3	0	1	1	7
J2425.1*	0	1	0	1
J2428.1	ND	ND	ND	6
J2431.2	2	3	0	6
J2432.3*	3	0	0	7
J2430.5*	3	2	0	2

* Цветовете на други клонки на това растение имат известно пурпурно пигментиране по венчето.

[a] Най-малко 4 цвята на всяко от изброените растения е опрашено с полен от V26 и всички имат пълни със семена семенници.

Среден брой семена/семенник = 225.

От 37 кръстосвания, включващи 10 различни трансгенетични растения като мъжки родители, 11 не произвеждат семенници, 20 произвеждат семенници с по-малко от 150 семена на семенник и 6 произвеждат семенници с повече от 150 семена на семенник. Това прави средно около 60 семена на семенник или 70% намаление на група семена. Тези резултати показват, че докато поленът от растения с флавоноидна недостатъчност е нефункционален върху близалца от дивия тип, състояние, което наричаме тук условен мъжки фертилитет (CMF). Широките вариации в броя на семената, установен на опрашване при тези външни кръстосвания, възможно се дължат на факторите на околната среда и/или на развитието.

Малко вероятно е CMF да се дължи на инсерция на Т-ДНК в гена, нужен за мъжкия фертилитет, тъй като два независими трансформанта, 218.38 и 218.41, и двата показват еднакви белези пълна липса на флавоноидна пигментация и идентичен доминантен мъжки стерилен финотип. Допълнително доказателство за това заключение е известно на наблюденията на Napoli et al., (1990), че трансформираните регенерати, понякога ревертират соматично до напълно пигментирани растения, но запазват трансгена, което означава, че присъствието само на трансгена не изключва ендогенната CHS експресия. По-нататъшни наблюдения и кръстосвания на тези соматични ревертанти, показват, че те са напълно мъжки фертилни. По подобие на белия полен в царевицата, CMF в петунията изглежда се дължи на флавоноидната недостатъчност, като тези причинена от отстраняването на CHS или F3H генната експресия.

Пример 2. Покълване на полена и растеж на тръбата

In vitro покълване се осъществява от прясно събран полен в опростена среда на Brewbakers, както е описана от Mulcahy GB and Mulcahey

DL, 1988, "The effect of supplemented media on the groth in vitro of bi – and frinucleate pollen", Plant Science 55:213-216 по-нататък се посочва като "среда за покълване" или "GM"). Полен от единичен прашник се поставя в микротитърна ямка с 50 µl среда, разклащан на стайна температура в продължение на 6 до 8 h и се снима с Kodack технически панорамен филм.

In vivo, растежа на поленовата тръба се измерва 48 h след опрашването, както е описано от Herrero M. and Dickinson H.G., 1979, "Pollen-pistil incompatility in Petunia hybrids:changes in pistil following compatible and incompatible intraspecific crosses", J Cell Sci 36&1-18. Калосните тапи се визуализират чрез епифлуоресценция, генерирана от възбуждане при 355-425 nm (D куб.) и отстраняване дължина на вълната 460 nm от Leitz Aristoplan. Снимат се образци с Ektachrome T 160 филм и отпечатъци, направени от интернегатив.

Жизнеността на полена се определя по флуорохроматична процедура (FCR) (Heslop-Harrison J. and Heslop-Harrison Y., 1970, "Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate", Stain Technol. 45:115-120) чрез инкубиране на свежо разпукан полен в разтвора на карбоксифлуоресцеин ацетат (1 mM) в среда за покълване. Епифлуоросценцията се визуализира, както е описано по-горе.

Продукция на калос

Поленовите тръби на петунията, нормално навлизат в близалцето около 1 h следа покълването (Herrero and Dickinson, 1980) и растат надолу през стилярната тъкан, за да доставят двете спермени клетки в зародишната торбичка. Калосът представлява полизахариден полимер, свързан с (1K3) гликозидна връзка, и тапи от този материал се наслагват обикновено на равни интервали надолу по растящата поленова тръба. Колосът се визуализира чрез неговата отличителна флуоресцентност след багрене с обезцветено анилиново синьо (Currier 1957; Eschrich and Currier 1964). Разглеждат се покълването и растежа на поленовата тръба при самокръстосване на цветове с CHS недостатъчност от пример 1 и обратно кръстосване на същите растения с полен от V26. Пестиците се събират 48 h след опрашването, багрят се с обезцветено анилиново синьо и се наблюдават на флуоресцентен микроскоп. Наблюдава се равномерно отлагане на калосни парчета по цялата дължина на стълбчето в тълпата от пестици с флавоноидна недостатъчност, опрашени от V26. От друга страна, не се наблюдава калос в пестиците на самоопрашените петунии, въпреки наличието на огромни количества полен върху близалцето.

Морфология на полена и покълване

Прави се микроскопско наблюдение на прясно разпръснат полен от растения с флавоноидна недостатъчност от пример 1, което не разкрива големи аномалии. Поленът от петуния покълва и продуцира тръба, когато се инкубира в обикновена течна среда. Покълналият полен от всяка от BC2 семействата (2425 до 2435) до V26 полена се сравняват in vitro. Показаното на фигура 2 е типично представително. Както е показано на фигура 2, след 6 h растеж, много мутирали поленови зърна са достигнали покълване, както се забелязва от подчертаното изпъкване около една от порите на покълване (стрелки, фигура 2), но най-много 2% от поленовите зърна от растението с флавоноидна недостатъчност продуцират тръба с каквато и да е дължина. От поленовите зърна, които продуцират измерима тръба, дължината е под 20% от дължината на V26 поленовите тръби, при същите условия.

За да се определи дали полена, продуциран и разпръснат от растенията с флавоноидна недостатъчност е жизнеспособен и следователно способен на покълване и прорастване на поленова тръба, се осъществява флуоресцентен анализ (FCR) за жизнеспособността на свежо разпръснат трансгенетичен и V26 полен. Този тест зависи от издигането на флуоресцеин ацетатното съединение в поленовото зърно, с последващо превръщане във флуоресцеин чрез вътреклетъчните ензими. Флуоресцеинът е силно полярен и остава затворен, най-често във вегетативната клетъчна цитоплазма, където се визуализира чрез флуоресцентна микроскопия. Наследствен V26 полен се състои в голяма степен (над 40%) от ненормално малки, FCR отрицателни зърна, при които изцяло липсва какъвто и да е вътрешен белег. Няколко зърна от този тип могат да бъдат видяни на фигура 2A, включително две в центъра на фотографията. Тази популация никога не покълва и наподобява закърняли зърна. От оставащите зърна (60%), почти всички показват положителен FCR тест, което посочва присъствието на интактни плазмени мембрани и активни цитоплазмени естерази. Полена от мутантния прашник задържа по-голямата част от повяхналите, закърняли клетки. От оставащите нормално изглеждащи зърна, повече от 90% са FCR

положителни. Фактът, че повечето от продуцирания от растения с флавоноидна недостатъчност растения полен е жизнеспособен и метаболитно активен, посочва, че някои аспекти на CHS активността са нужни за нормалното покълване на полена и растежа на тръбите.

Пример 3. Микроскопско наблюдение на развитието на прашника

За да се определи дали липсата на CHS активност по време на микроспорогенезата променя клетъчната архитектура на развиващите се поленови зърна или тъканта на прашника, се съпоставя поленовото развитие в растения 02425,1 с V26 и CHS недостатъчност. Прашници от серии според различните етапи на развитие на петуниеви пъпки на дължина от 0,1 до 6 cm, се събират, фиксират в 2% параформалдехид, 1,25% глутаров алдехид в Pipes, pH 7,2, закрепват се в смола на Spurrs, и 1 μm участъци се оцветяват с толуидин блу. Правят се фотомикрографии с Kodack технически панорамен филм. Хистологично, това представлява всички етапи от микроспорогенезата, от най-ранните данни за диференциация на археспорална тъкан до прашници пред разпукване, пълни със зрял полен. Специално внимание се отделя на развитието и последващата дезинтеграция на тапетума, тъй като тази тъкан се счита за източник на поленовите флавоноиди. При всички етапи трансгенетичният прашник и развиващите се микроспори не показват хистологични разлики при сравнение с V26. Взимат се допълнителни участъци от прашници с флавоноидна недостатъчност по време на преминаването от закръглен, бял, към изсушен, кафеникав, и се сравняват със съответните стадии при V26 (фигура 3). Преди разпукването, клетките от ендотелния слой нормално се развиват радиално, сгъстяват се и отлагат материал, за който се смята, че участва в механизма на друго скъсване (Cutter, E.G., 1978, "Plant anatomy: Experimentation and Interpretation. Part 1, "Cells and Tissues. 2nd ed., London: Arnold). Този слой не е непрекъснат, като липсва в пространството заобикалящо стомиума. Отрязъците от повехналите, кафеникави прашници не показват големи аномалии по отношение на ендотелния слой, стомиума, или кутикулата заобикаляща прашника. Все пак, при сравнение с полен от V26 (фигура 3, колона "V26") по-голямо съотношение от повехнали зърна, лишени от вътрешни белези присъстват в локулите на трангенетичните растения, а по-големите зърна се проявяват по-хетерогенни по размер, форма и реакция на оцветяване (фигура 3C и 3D). Хетерогенността, показана на фигури 3C и 3D може да се дължи на факта, че поленът е нормално разпръснат в силно дехидратирано състояние, при което протича бърза рехидратация върху близалцето, полена с флавоноидна недостатъчност може да бъде разпръснат в много по-дехидратирано състояние, отколкото нормалното, и, когато се постави в течна среда за покълване, започва да рехидратира до нормален външен вид.

Пример 4. Флавоноидни екстракти от петуния.

Анализи на екстракти от полен на петуния идентифицират по-голямата част от флавоноидите като 3-O-гликозиди на кверцетина и кемферола, 4,2',4',6'-тетрахидроксихалкон, и дихидро флавонол, таксифолин (Zerback, R., Bokel, M., Geiger, H., and Hess, D., 1989, Phytochemistry 28:897-899; Zerback, R., Dressler, K. and Hess, D., 1989, Plant Science 62:83-91; De Vlaming, P., and Koh, K.F.F., 1976, Phytochemistry 15:348-349). Царевичният полен съдържа най-малко 10 гликозида на кемпферола, кверцетина и изорамнетина (Ceska, O. and Styles, E.D., Phytochemistry 23:1822-1823). Водни извлици от двете, дивия тип и кръстосаната петуниева линия V26 се осъществяват чрез накисване на близалцата с пинсета или обработка на поленова суспенсия на "вортекс" (силно разбъркване) в PEG 4000 среда (W. Jahnen, W. M. Lush, A. E. Clarke, 1989, Plant Cell 1:501), тук и по-нататък белязан като GM, центрофугира се 5 min в микрофюжна епруветка и аликвоти от супернатантата се прилагат директно към CMF поленовата суспенсия в GM в 96-ямково микротитърно блюдо. Осъществяват се метанолови екстракции по същия протокол, с изключение на това, че екстракта се изсушава под вакуум и се ресуспендира в GM преди прибавянето му към поленовата суспенсия. Първоначалните експерименти по запазването извличат степен от 33% покълване като се използват 20 μl (една пета от общия обем) от един воден екстракт, приготвен от 10 близалца от V26. Като контрола се приготвят екстракти по същия начин от близалца и полен от CMF растенията. При изследванията на поленовото покълване, единствено екстрактите от полен и близалца от V26 са способни да възстановят покълването и растежа на тръбата на полена с флавоноидна недостатъчност. Екстрактите от полен и близалца от див тип и CMF се изследват, както следва. Близалцата или полена се екстрахират първо с 50% метанол,

следван от 100% метанол, след което екстрактите се обединяват и концентрират. Продуцират се аглюкони чрез киселинна хидролиза: екстрактите се смесват об/об с 4N HCl, запечатват се в 2 ml ампули и се подлагат на хидролиза във вряща вода в продължение на 40 min. Точно копирани проби се пускат на обратно-фазова C18 колона (Phenomenex Spherisorb 5 ODS 2 250 x 4,6 mm). Разтворител A е 5% оцетна киселина, а разтворител B е съставен от 5% оцетна киселина и 80% ацетонитрил. Всяко пропускане се състои от 6 min изократен градиент (20% B), следвано от 20 min линеен градиент до 95% B и завършва изократно при 95% B в продължение на 14 min. Скоростта на изтичане на разтвора е 0,5 ml/min при стайна температура. Изследва се при 360 nm с Hewlett Packard модел 1040A фотодиоден повърхностен детектор. Открива се кемпферол в екстрактите от близалца от дивия тип при 60 ng близалца, а кверцетин при значително по-ниски стойности. Идентични екстракти от обединени 150 CMF близалца или от 500 CMF прашника не дават пикове, характерни за типичните флавоноидни спектри.

Обработката на екстракти от близалца от див тип със смилащи протеина ензими, затопляне и преминаване през мембрана, разделяща молекулите по размер, която посочва, че активното съединение е малка непротеинова молекула. Молекулното тегло на активното съединение се изчислява като се пропуска екстракта през молекулно сито, задържащо до 3000 D (Centricon-30 filter, Amicon), като по този начин се установява също, че поленовата запазваща активност преминава през филтъра. Водни екстракти от близалца и полен от V26 се обработват с 0,025 единици папаин в продължение на 30 min при 37°C в 100 µl реакционен обем. Ензимната активност се проверява чрез обработване с BSA (говежди серумен албумин) (0,5 mg/ml) при същите условия и чрез разглеждане на смлените продукти чрез SDS-полиакриламидна гел електрофореза (PAGE). Нито протеазата, нито топлинното обработване (100°C за 5 min) не елиминират способността на екстрактите да запазят CMF поленовото покълване и растеж на тръбата.

Колективно, тези резултати показват, че присъстващите в дивия тип полен флавоноиди играят роля при покълването на полена, и че близалцата от дивия тип съдържат подобни съединения, които могат да компенсират липсата на флавоноиди в CMF полена.

Пример 5. Флавонолово спасяване на CMF фертилитета

Биохимичното допълване на полена с флавоноидна недостатъчност от пример 1 се осъществява чрез прибавяне на ниска концентрация (1 µm) кемпферол, флавонолов гликон, към суспенсията от CMF полен в среда за покълване (GM). Както е показано на фигура 4, последователният анализ, осъществен в продължение на 12-часов период на растеж потвърждава, че покълването се инициира едновременно и, че растежът на тръбата се извършва в същата степен и до същото ниво в запазения CMF полен (K+) в сравнение с полена от дивия тип V26, който не получава флавонолова добавка (C). Запазването е почти пълно; поленът с добавка на флавоноид показва 80% честота на покълване в сравнение с V26. CMF поленът, към който е прибавен само DMSO разтворител (K-), не показва значително покълване (1-2%), а поленовите тръби, ако въобще покълнат, никога не надминават диаметъра на две поленови зърна.

За да се потвърди, че екстрактите от близалцата на дивия тип, които са способни да запазят поленовото покълване и растежа на тръбите съдържат кемпферол, нехидролизиран екстракт се фракционира на HPLC и се анализира чрез УВ/видима абсорбционна спектроскопия. В екстрактите от близалца на V26 се установява пик с време на задържане и типичния флавонолов спектър (абсорбционни максимуми около 260 и 360 nm) (фигура 5A и притурка). Събира се предполагаемия пик на кемпферола, изпарява се до сухо, ресуспендира се в DMSO и се прибавя към in vitro GM средата, където предизвиква пълен отговор на покълване и растеж на тръбата от CMF полена. Повторна хроматография на тази активна фракция с автентичен кемпферол за стандарт, потвърждава нейната чистота и идентичност. От този анализ на 150 близалца, съдържанието на кемпферол в близалцата на V26 се изчислява на 60 ng/близалце. Като приемем, че обемът на близалцето е 34 µl (водоизместимост), флавоноловата концентрация в близалцата на V26 е около 6 µm, ниво, което е способно да предизвиква силен отговор на кълняемост. Идентичен анализ на екстракти от събрани заедно 150 CMF близалца или от 500 CMF прашника, не дават пикове в типичните флавоноидни спектри (виж фигура 5B). Екстрактите от полен и прашници от V26 дават хроматограма, подобна на тази, показана на фигура 5A и пика на елуента, с време на задържане и УВ/видим спектър показателни за кемпферол, когато е добавен към CMF в GM напълно стимулирано поленово покълване. Този анализ потвърждава,

че кемпферола присъства в полена и прашниците на дивия тип.

Структурни особености, нужни за активност, запазваща полена.

Екстрактите от полен и близалца от дивия тип на петуния съдържат други съединения в допълнение към кемпферола, които също могат да стимулират покълването на полена и растежа на тръбата (виж фигура 5А). Следните представителни съединения за всички по-големи класове флавоноиди: флавони, флавонони, флавоноли, изофлавоноиди, халкони, антоцианини и катехини, се изследват за запазваща полена активност, както следва. Поленови зърна от петуния се суспендират в ПЕГ 4000 среда за покълване (GM) при гъстота 1-2x10⁴/ml и 100 µl аликвота от суспенсията се накапват в ямки на 96-ямково микротитърно блюдо и се инкубират на стайна температура при разклащане 150 об/min. Което и да е допълнително съединение се добавя директно към GN преди прибавянето на полена. Базовите разтвори на флавоноидите и другите химикали се приготвят директно в диметилсулфооксид (DMSO) и се прибавят към всяка ямка при крайни концентрации, посочени в таблица 3. Концентрацията на DMSO се поддържа постоянна във всеки опит на 1%. Полена се счита за покълнал, когато тръбата е дълга повече от диаметъра на едно поленово зърно. На практика, всички зърна, които покълват продуцират тръба по-дълга от диаметрите на 5 поленови зърна. Петуния V26, както е описана в пример 1, продуцира два типа полен; около 25% от зърната са малки, без вътрешни особености и никога не покълват in vitro. Следователно напълното покълване в V26 се осъществява, когато 75% от цялото количество поленови зърна покълнат. CMF полен от петуния от пример 1 поддържа същото съотношение. В повечето опити за запазване, максималната честота на покълване е 89% от жизнеспособните зърна. След 4 h инкубиране, се преброяват минимум 1000 поленови зърна при всяко изследване. Най-ниската концентрация на изпитваните съединения, нужна, за да се получи отговор на покълване са отбелязани в следващата таблица 3, където NR означава няма отговор. Съединенията, които причиняват <20% покълване при 100 µm са отбелязани с >100 µm. В допълнение на изброените в таблица 3 съединения, са изпробвани и не възбуждат отговор и нефлавоноидите p-кумарова киселина, салицилова киселина, хидрохинон, хлорогенна киселина, дихидроаскорбинова киселина, нафтилфталминова киселина (NPA), 1-нафталиноцетна киселина (NAA), индол-3-оцетна киселина (IAA) и гиберелинова киселина (GA3).

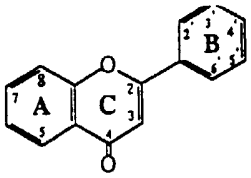
ТАБЛИЦА 3

Съединение	заместен въглерод 3	5	7	2'	3'	4'	5'	Концентрация за отговор (µM)
Флавоноли ($C_2=C_3$)								
галангин	OH	OH	OH					1
кемпферол	OH	OH	OH			OH		1
Iso-рамнетин	OH	OH	OH		OCH_3	OH		1
кварцетин	OH	OH	OH		OH	OH		10
морин	OH	OH	OH	OH		OH		10
мирицетин	OH	OH	OH		OH	OH	OH	100
физетин	OH		OH		OH	OH		100
3-хидроксифлавон	OH							>100
Дихидрофлавоноли (C_2-C_3)								
таксифолин	OH	OH	OH		OH	OH		>100
Флавони ($C_2=C_3$)								
флавон								NR
7-хидроксифлавон			OH					NR
апигенин		OH	OH			OH		NR

(продължение)

лутеолин	OH	OH	OH	OH	NR
Флаванони (C_2-C_3)					
флаванон					NR
нарингенин	OH	OH		OH	NR
ериодиктиол	OH	OH	OH	OH	NR

Както е посочено в таблица 3, R-заместените позиции отговарят на флаваноиди с формула



Както се вижда от таблица 3, агликоновите флавоноли успешно възстановяват максималната честота на покълване и капацитет на растеж на тръбите на CMF полена, но измежду другите класове флавоноиди, единствено тясно свързаните дихидрофлавонол, таксифолин, продуцират слаб отговор (18%) при 100 μm. Допълнително, няколко класа от нефлавоидните съединения се изпробват, включително фенолни киселини, антиоксиданти и регулатори на растежа на растенията, но нито един не е способен да запази покълването на полена. Следователно, способността на запазване на поленовата функция при физиологично показателни концентрации се състои във флавонолите.

От групата на изпробваните флавоноиди, се появяват пет общи структурни характеристики като необходими за максималната кълняемост на полена и растежа на тръбите. Има абсолютни изисквания за една незаместена хидроксилна група при 3-въглеродно положение и за кетогрупа при позиция 4 в С пръстена. Максималният отговор зависи от една незаместена връзка между въглеродите 2 и 3 в С пръстена и от степента замествания с хидроксилна група в А и В пръстените. Най-интересно, флавонолите гликозилирани чрез 3 хидрокси позиция са неактивни, въпреки че са далеч най-многобройната форма флавоноли, открити в растителните тъкани, включително полена и близалцата на петунията. Не се получава покълване на полена при изпитания на кверцетин-3-О-глюкозид и рутин (кверцетин-3-О-рамноглюкозид) при концентрации над 100 μm.

Необходимостта от кетогрупа на позиция 4 в пръстен С произтича от факта, че при катехин, който няма кетогрупа, липсва активност. Сравнението между относителните ефективности на токсифолина (β18% при 100 μm) и кверцетина (β50% при 10 μm) показва, че двойната връзка между въглеродите 2 и 3 в С пръстена засилва отговора с около 30 пъти. Сравнението на кверцетин с физетин или с 3-хидроксифлавон показва, че всяка допълнителна хидроксилна група при позиция 5 или 7 на пръстен А, засилва отговора с около 10 пъти. Това повишение може широко да зависи от стабилизиращия ефект на взаимодействието между 5 хидроксилната група и прилежащата кетогрупа в С пръстена. Накрая, хидроксилните замяни върху В пръстена не са задължителни за пълната активност, а всъщност увеличаването на броя на групите причинява отслабване на активността (сравнение на кемпферол с кверцетин и мурицетин). Разликата може да се дължи на слабото увеличение или нарастване на неспецифичното свързване, причинено от по-полярното естество на флавонолите с многобройни хидроксилни групи.

Някои неактивни флавоноиди са описани като антагонисти на флавоноидната индукция на гените за възли в Rhizobium-зеленчуковата система (Djordjevic, M.A., Redmond, J. W., Batley, M. and Rolfe, B. G., 1987, EMBO 6:1173-1179; Peters, N. K. and Long, S. K., 1988, Plant Physiology 88:396-400). Не активните съединения при функцията за запазване на полена се изследват за тяхната способност да проявяват антагонизъм към действието на флавонолните агликони, както следва. CMF полена, както е описан в пример 1, в GM, се подлага на действието на неактивни съединения, при концентрации от 1 до 10 μm, в продължение на 30 min преди да се добави кемпферола към 1 μm. Експериментът се осъществява също и чрез едновременно прибавяне към поленовата суспенсия, както на неактивното съединение, така и на кемпферола при отнасяне 10:1. Честотата на поленова кълняемост се изчислява след 4 h инкубиране и не се установява

антагонистично действие при koя да е от изпробваните комбинации. Анализират се следните неактивни съединения: апигенин, халкон, ериодектиол, флавон, флаванон лутеолин, нарингенин, катехин, хлорогенна киселина, p-кумарова киселина, хидрохинон и салицилова киселина.

Пример 6. УВ въздействие.

Отчасти заради техните способности за абсорбция на УВ, се определя, че флавоноидите действат като предпазващи от УВ в растенията (W. Jahnen and K. Hahlbroch, 1988, Planta 173: 453 и тук направените отпратки). За да се определи дали липсата на кълняемост при полена с флавоноидна недостатъчност се дължи на УВ ефекта, се осъществяват експерименти за покълване на тъмно с три вариации. Полена се събира или от (1) цветя, които са събирани и запазени (във вода) при пълна тъмнина в продължение на 24 h или (2) свежо набрани цветя. Поленови суспенсии от тези два източника, в GM, с или без флавоноли, се приготвят на тъмно, като се използва безопасна червена светлина. Третият вариант се нуждае от приготвянето на поленовата суспенсия от свежо набраните цветове на светло, но с прибавяне на флавоноловия разтвор на тъмно. Всички индивиди се увиват във фолио, а след това се инкубират, както е описано в пример 5. Няма забележим ефект на светлината върху честотата на покълване, както за V26 контролата, така и за полена с флавоноидна недостатъчност, с или без добавка на флавоноли.

За да се определи повлияването на самоопрашването от УВ светлината, зряли петуниеви растения се отглеждат в продължение на няколко седмици под 610 nm филтър, както е описан от L. P. Taylor and W. R. Briggs, 1990, Plant Cell 2:115. Нужни са около две седмици, за да се образуват петуниевите пъпки и да узреят, следователно само тези пъпки, които са образувани, след като растенията са поставени под филтъра, и по този начин не са облъчени със светлина над 610 nm, се изследват и се самоопрашват. Не се осъществява засяване със семе от CMF самокръстосването (10 опита), но всички кръстосвания на V26-контрола се осъществяват при същите условия за пълно засяване в саксии.

Пример 7. Ефект от времето за излагане на флавонол

Количеството време за подлагане на флавонол, нужно за пълното покълване и максималното прорастване на тръбата, се определя като варира времето, за което покълващия полен е в присъствие на флавонол. Концентрацията на кемпферол, изчислена да дава приблизително максимално запазване, лесно отстраним чрез промиване (0,5 μm крайна), се прибавя към 60 x 15 mm блюдо, съдържащо суспенсия от 5 ml полен с флавоноидна недостатъчност в GM, и получената суспенсия непрекъснато се разклаща при 150 об/min. При времето, отбелязано на таблица 4, се отнемат 400 μl аликвоти, центрофугират се, промиват се с 1 ml GM за отстраняване на кемпферола, отново се центрофугират, ресуспендират се в 400 μl GM и се разделят на порции. Една 100 μl аликвотна част отново се прибавя към 0,5 μm кемпферол (контрола), но другата част се остава да прорасне без допълнително излагане на флавонол (третиране). Остава се растежът да продължи през всичките изминали 4 h от приготвянето на началната суспенсия, след което се изчислява степента на кълняемост и дължината на тръбата, при двете – третираното и контролното покълване. Резултатите се съдържат в следващата таблица 4.

ТАБЛИЦА 4

Третиран полен		Контрола	
време за излагане (мин)	покълване (%)*	дължина ** на тръбата	покълване (%)*
0	3.7 +/- 1.5	2x	48.3 +/- 2.5
10	6.6 +/- 2.7	2x	55.5 +/- 8.6
20	15.7 +/- 9.2	2-3x	47.9 +/- 7.0
30	13.8 +/- 1.7	2-3x	44.4 +/- 3.7
60	38.9 +/- 2.9	3x	48.4 +/- 1.3
120	47.3 +/- 3.6	>3x	47.7 +/- 2.2

* означава +/- SEM, n=3

** отнася се до диаметъра на поленовите зърна

Както се вижда от таблица 4, измереното нарастване на кълняемостта се установява чрез време на излагане само 10 min (таблица 1). Време на излагане от 1 до 2 h е нужно за максимална степен на покълване и дължина на тръбата.

Пример 8. In vivo запазване на фертилитета

Способността сам да се възстанови фертилитета на CMF петуния чрез прибавяне на флавонол и агликон към полена по време на опрашването се изследва чрез преброяване на сполучливите опрашвания, като резултат на самокръстосване на CMF петуния, осъществено в присъствие на прибавени флавоноли. Преди самоопрашването, флавонолните агликони се прилагат или (i) директно към близалцето или (ii) размесени със свежо събрания полен. Най-сполучливата техника, измерена чрез количеството посадени семена, изисква прилагането на флавонола към близалцето 12-16 h преди самоопрашването. Осъществяват се 47 самокръстосвания с прибавяне на кемпферол или кверцетин, и близо 60% (27 извън 47) продуцират семенни шушулки. Броят на семена за шушулка варира от 31 до 287, а при тестовете за покълване >90% от семената от всяка една шушулка са жизнеспособни. Всяко самокръстосване, извършено без прибавяне на флавоноли (>30 опита) не води до засаждане на семена.

Доминантният CMF белег, проявен от петуния с флавоноидна недостатъчност, е тясно свързан с втория доминантен ген, придаващ резистентност към канамицин (KAN) (Napoli C, Lemieux C and Jorgensen R, 1990, "Introduction of a chemeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-repression of homologous genes in trans", Plant Cell 2:279-289). KAN маркера се използва за тестване на разделянето на CMF характеристиката в семената, продуцирани чрез самокръстосване на растения с флавоноидна недостатъчност в присъствие на прибавени флавоноли. Прясно събрани семена се подлагат на повърхностна стерилизация в 20% белина, промиват се със стерилна вода и се накисват в продължение на 30 min в 100 ppm GA3 разтвор преди да се прехвърлят в съдовете за покълване (1xMS, 3 mM MES (pH 5,6u, 1xB5 витаминозна смес, 3% захароза и 0,2% втвърдително средство, съдържащи 100 μg/ml канамицин. След прорастване при 23°C с прибавка на 16/8-часов фотопериод, се изчислява резистентността към канамицин чрез скриниране за присъствие на истински листа и странични корени, нито един от които не се продуцира от млади стръкчета, чувствителни към канамицин. В следващата таблица 5, P-стойност представлява наблюдаваното ниво на значимост за една степен на свобода chi-square goodness-of-fit тест.

ТАБЛИЦА 5

млади стръкчета

шушулка	общо	KAN	KAN	P (3:1)
1	75	58	17	0.74
2	65	50	15	0.83
3	81	59	22	0.75

Както е показано на таблица 5, семената покълват в присъствие на 100 μg/ml канамицин, разделен на 3:1 съотношение KAN резистентност:чувствителност, както се очаква за хетерозиготен доминантен белег, както е показано на таблица 5.

Пример 9. Полево изследване

Полевото изследване се осъществява, като се използва естествено срещащ се в природата мутант на царевица с флавоноидна недостатъчност, бял полен, с дефектна CHS активност, който продуцира бял, нефункционален полен, и е самостерилен (E. H. Coe, S. M. McCormick, S. A. Modena, 1981, J. Hered. 72:318). Използваните царевични растения с бял полен притежават стабилни рецесивни мутации при C2 и интрогресивен Whp във W23 наследствени родители. Растенията (c2/c2 whp/whp) с бял полен се поддържат чрез кръстосване с полен от изогенни растения, носещи единично функционално копие на CHS (c2/c2 whp/whp). Растенията са мъжки стерилни при само и sibling кръстосвания и не продуцират видими флавоноидни пигментации в коя да е тъкан, включително полена и семената. Използват се

стандартни генетични полеви техники, за подсигуряване да не достигне заразен полен свилата на растенията с бял полен. Освен това, блока с бял полен се заобикаля с вариант с пигментирано зърно, така че всяко заразено зърно може незабавно да бъде разпознато. Мутантният бял полен от 50-100 растения се събира от пликчетата върху косата, обединява се, и се разделя на две части. Едната част се използва "както си е" за кръстосване, а другата се смесва в отношение приблизително 20:1 със сухи флавоноли (кверцетин, кемпферол или смес 50:50 от двата). Приготвената свила с бял полен се опрашва или с нетретирания бял полен или с бял полен с прибавка на флавонол, и незабавно се затваря в торбички. Зрелите класове се събират 45 дена след опрашването. Кръстосванията с бял полен са обикновено с около 200 зърна на клас, и това число рутинно се постига в допълнителните биохимични самокръстосвания. Общо се осъществяват 45 самокръстосвания в присъствие на добавени флавоноли и всички от тях (100%) продуцират съвсем пълни класове, докато самокръстосванията (45 опита), извършени без добавка на флавоноиди показват наличие на зърна под 1% от нормалното.

Посочените експерименти потвърждават, че флавонолите са нужни за функционирането на полена както следва: (I) метанолни и водни екстракти от близалца от див тип и полена може напълно да възстанови кълняемостта и растежа на тръбата на полена с флавоноидна недостатъчност; (ii) тези екстракти съдържат същите флавоноли, които показват активност при in vitro изследването за запазване фертилитета, описано тук; (iii) способността за спасяване поленовата кълняемост и пълното възстановяване на растежа на тръбата in vitro и пълното засаждане на зърната in vivo, се ограничава до специфичен клас флавоноиди, флавоноловите агликони; (iv) ефективната концентрация на флавонолите варира според структурата, но някои съединения показват подчертан ефект при степен, по-малка от 10 μm, съвсем във физиологичните концентрации на тези съединения.

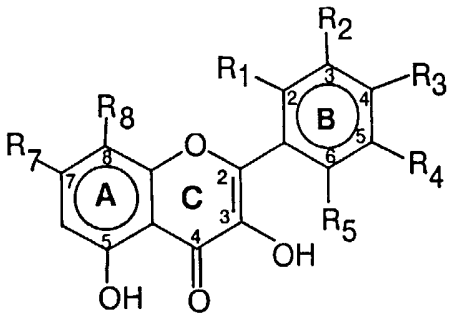
Флавоноидите се продуцират от всички класове растения, от гъби, мъхове и папрати, до голосеменни и покритосеменни. При предишните проучвания на флавоноидите често се използвали сухи листа или коренна тъкан от хербаризирани индивиди; следователно, липсват добри показания за това колко разпространено е било наличието на флавоноиди. Тяхното повсеместно присъствие в растителните тъкани и факта, че флавоноидите са били идентифицирани в поленови екстракти от няколко твърде далечни видове, означава, че флавоноидите са универсална съставна част на полена. Повечето растителни флавоноли се срещат като 3-О-гликозилирани видове (J. B. Harbome and C. A. Williams, 1988, in The Flavonoids, Advances in Research Since 1980 J. B. Harbome, Eds. (Chapman and Hail, London) chaps. 7. 8), и това е преобладаващата форма в полена на петунията (O. Ceska and E. D. Stylesq 1984, Phytochemistry 23:1822). Единствено агликонната форма може да запази поленовата функция, което предполага, или че нормално присъстват ниски неуловими количества агликони, или че е нужна гликозидазна активност за продуцирането на агликони, нужни за фертилизацията.

Поленът осигурява нормалното място на достъп за манипулиране на процеса на фертилизация. Загубата на флавонолова активност, която се получава при CMF растенията, действа като естествен гаметостатик, а не като гаметоцид. Пълната мъжка активност може да бъде възстановена чрез външно приложение на флавоноли към полена с флавоноидна недостатъчност. В допълнение към фактора, нужен за фертилизацията на висшите растения, значително предимство на настоящото изобретение е развитието на обратима мъжка стерилна система за продуциране на хибридни семена.

Тъй като предпочитания вариант на изобретението е илюстриран и описан, ще бъде оценено, че многобройни промени могат да бъдат направени без да се излиза извън замисъла и обхвата на изобретението.

Патентни претенции

1. Метод за регулиране фертилитета на растение, характеризиращ се с това, че се включва блокиране на продуцирането или на действието на флавоноли при локализацията на полена в растението, за получаване на условно мъжко фертилно растение с инхибирана кълняемост и способност за растеж на тръбичката, и че поленът се довежда в контакт с флавонол възстановяващ фертилитета, за спасяване на покълването или способността за растеж на тръбичката на растението, като флавонола, възстановяващ фертилитета е съединение с формула



където R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7 и R_8 са водород, хидроксилна или алкокси група, притежаващи от 1 до 3 въглеродни атома.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че продуцирането на флавоноли в растението е блокирано чрез инхибиране продукцията или активността на флавоно-3-хидроксилаза в растението.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че продуцирането на флавоноли в растението е блокирано чрез инхибиране продукцията или активността на халкон синтетаза в растението.

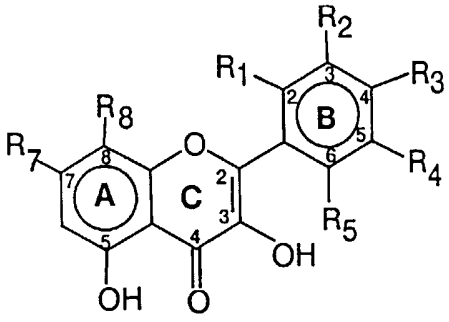
4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че включва освен това възстановяване активността на флавонолите на нивото на полена в растението, за запазване способността за кълняемост или растеж на тръбата на растението.

5. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че включва освен това и възстановяване на продукцията или активността на флавоно-3-хидроксилаза в растението, за запазване способността за кълняемост или растеж на тръбата на растението.

6. Метод съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че включва освен това и възстановяване на продукцията или активността на халкон синтетаза в растението, за запазване способността за кълняемост или растеж на тръбата на растението.

7. Метод за възстановяване растителния фертилитет на растения, с условно мъжки фертилитет, с флавоноидна недостатъчност, характеризиращ се с това, че полена на растението се поставя в контакт с известно количество флавоноли, способни да възстановят фертилитета, ефективни за засилване кълняемостта или растежа на тръбата на растението.

8. Метод съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че флавонолът, възстановяващ фертилитета е съединение с формула



характеризираща се с това, че R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7 и R_8 са водород, хидроксил или алкокси, притежаващи от 1 до 3 атома.

9. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че не повече от два R_1-R_5 са хидрокси или метокси, а останалите R_1-R_5 са водород, и R_7 и R_8 са водород, хидрокси или метокси.

10. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че флавонолът, възстановяващ фертилитета се подбира измежду групата галангин, кемпферол, изо-рамнетин, кверцетин и морин.

Приложение: 6 фигури

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

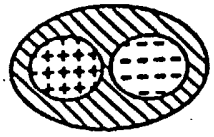
Експерт: Д. Кацарова

Редактор: Т. Панчева

Пор. 40356

Тираж: 40 МВ

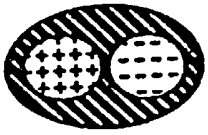
ПЕТУНИЯ
ДОМИНАНТА СТЕРИЛНОСТ



100 % СТЕРИЛЕН ПОЛЕН

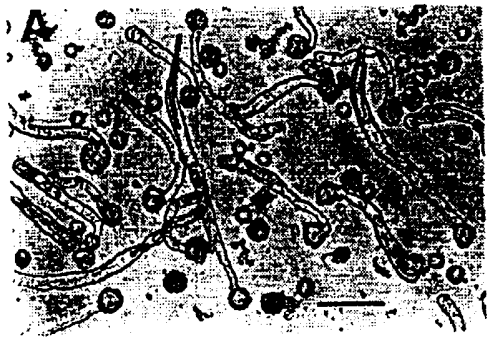
Фиг. 1А.

ЦАРЕВИЦА
РЕЦЕСИВНА СТЕРИЛНОСТ

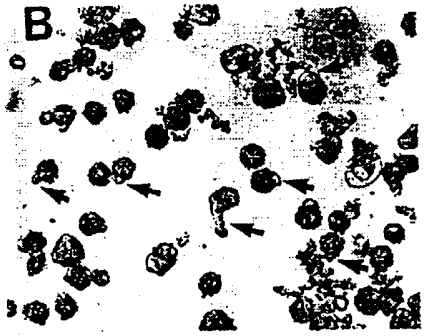


100% ФЕРТИЛЕН ПОЛЕН

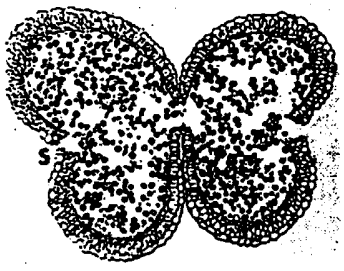
Фиг. 1В.



Фиг. 2А.



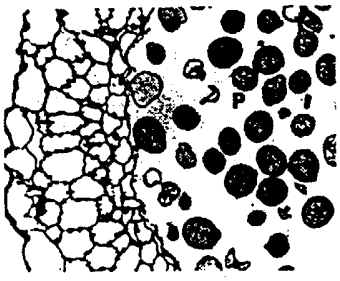
Фиг. 2В.



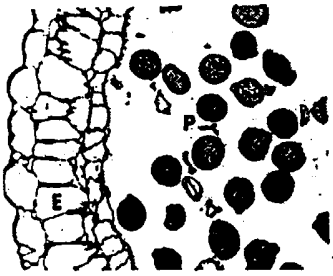
Фиг. 3А.



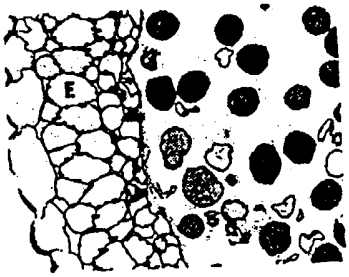
Фиг. 3В.



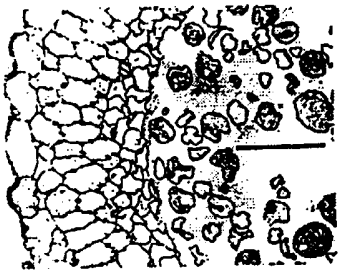
Sig. 3C.



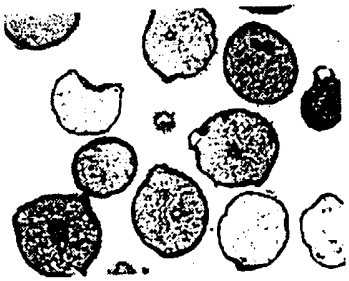
Sig. 3D.



Sig. 3E.



Sig. 3F.

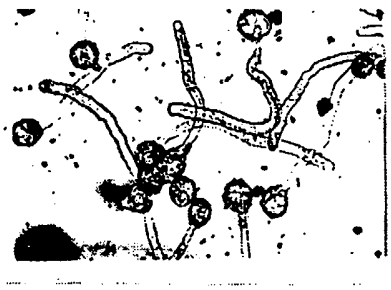


Sig. 3G.



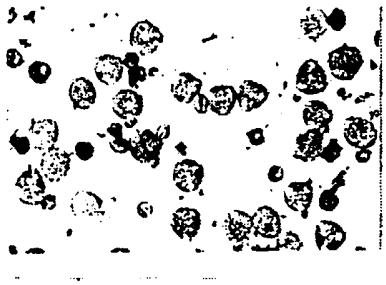
Sig. 3H.

C



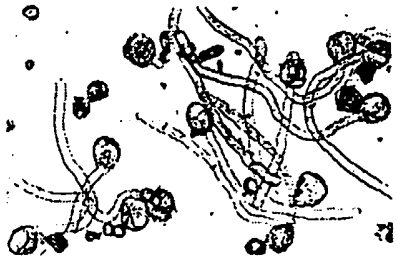
Sig. 4A

K-

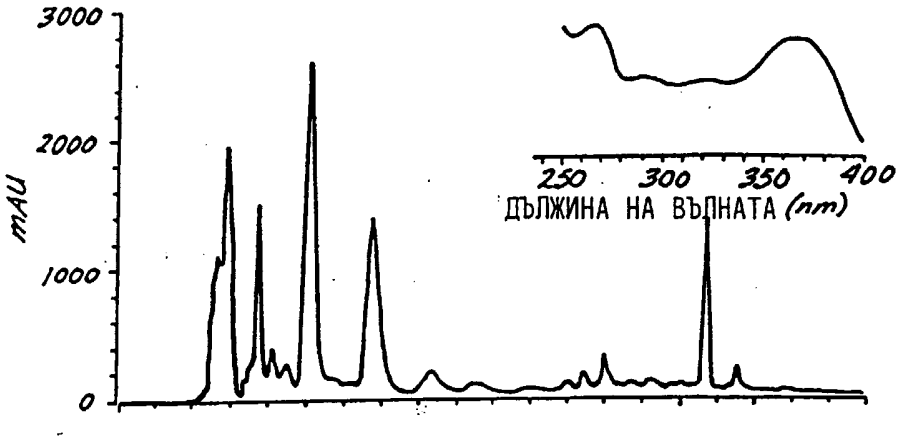


Sig. 4B.

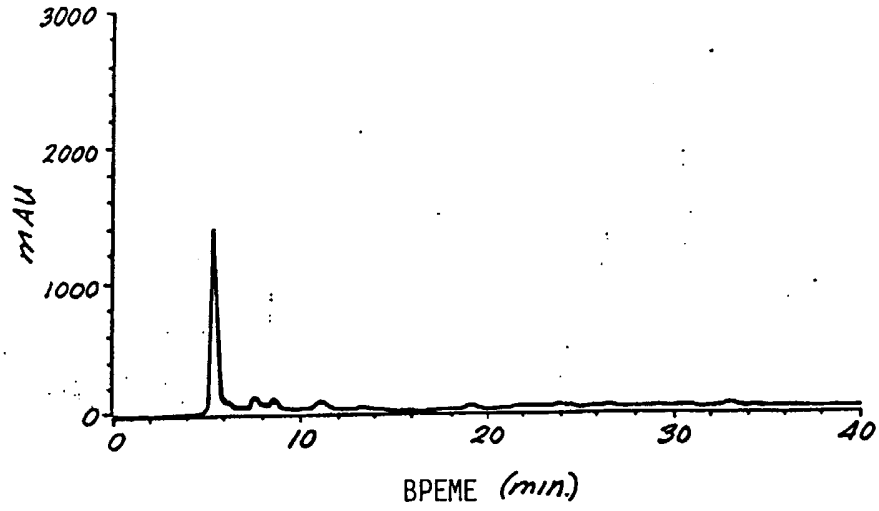
K+



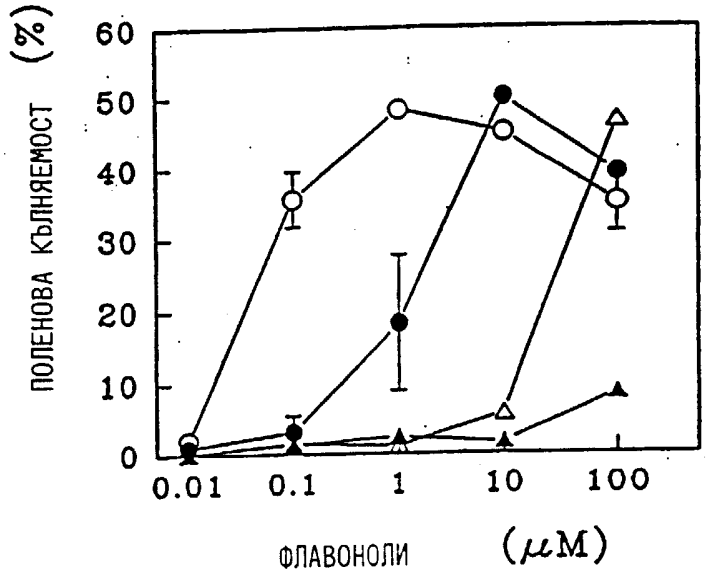
Sig. 4C.


3000
2000
1000
0
mAU
250
300
350
400
ДЪЛЖИНА НА ВЪЛНАТА (nm)

Фиг. 5А.


3000
2000
1000
0
mAU
0
10
20
30
40
ВРЕМЕ (min.)

Фиг. 5В.


ПОЛЕНОВА КЪЛНЯЕМОСТ (%)
60
50
40
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
100
ФЛАВОНОЛИ (μM)

Фиг.6.