

(11) *Número de Publicação:* **PT 90420 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12N005/14 A

C12N015/05 B

A01H001/00 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1989.04.28

(30) *Prioridade:* 1988.04.28 GB 8810120

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.11.10

(45) *Data e BPI da concessão:*
01/96 1996.02.01

(73) Titular(es):

PLANT GENETIC SYSTEMS, NV.
KOLONEL BOURGSTRAAT, 106 1040 BRUSSELS
BE

(72) Inventor(es):

WILLY DE GREEF BE
CELESTINA MARIANI BE
JAN LEEMANS BE
MARC DE BEUCKELEER BE

(74) Mandatário(s):

ANTÓNIO LUÍS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA ESTÉRIL MASCULINA E MATERIAL DE REPRODUÇÃO DA REFERIDA PLANTA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

MEMÓRIA DESCRITIVA
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

Nº 90.420

NOME: PLANT GENETIC SYSTEMS N.V., belga, com sede
em Avenue des Arts 46, 1040 Bruxelles, Bélgica,

EPIGRAFE: "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA
ESTÉRIL MASCULINA E MATERIAL DE PRODUÇÃO
DA REFERIDA PLANTA"

INVENTORES: Celestina Mariani, Jean Leemans,
Willy De Greef e Marc De Beuckeleer

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do
artigo 4º da Convenção da União de Paris de 20 de
Março de 1883.

Grã-Bretanha 29 de Abril de 1988, sob o Nº 8810120.9

4.

PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UMA PLANTA ESTÉRIL
MASCULINA E MATERIAL DE REPRODUÇÃO DA REFERIDA
PLANTA"

A presente invenção refere-se a plantas estéreis masculinas e ao seu material de reprodução (por exemplo, sementes), cujas células se transformaram devido ao facto de se ter integrado, de modo estável, no seu genoma nuclear, uma sequência de ADN estranho. A sequência de ADN estranho, de acordo com a presente invenção, compreende, pelo menos, um primeiro ADN estranho (daqui em diante designado como "ADN de esterilidade masculina") que: 1) codifica um ARN ou proteína ou polipéptido primários que, quando produzido ou produzido em excesso numa célula do estame da planta, perturba significativamente o metabolismo, funcionamento e/ou desenvolvimento da célula do estame; e, 2) se encontra na mesma unidade trans-

cricional e sob o controlo de um promotor primário que é capaz de comandar a expressão, de modo selectivo, do ADN da esterilidade masculina nas células dos estames da planta.

A presente invenção refere-se, em especial, a uma tal planta de esterilidade masculina nuclear e ao seu material de reprodução, no qual a sequência de ADN estranho da presente invenção é uma sequência quimérica de ADN que também pode conter, pelo menos, um segundo ADN estranho (o "ADN indicador") que: 1) codifica um segundo ARN ou proteína ou polipéptido que, quando presente, pelo menos, num tecido específico ou em células específicas da planta, tornam toda a planta facilmente distinguível das outras plantas que não contêm segundo ARN ou proteína ou polipéptido pelo menos num tecido específico ou em células específicas; 2) se encontra na mesma unidade transcricional e sob o controlo de um segundo promotor que é capaz de comandar a expressão do ADN indicador, pelo menos no tecido específico ou nas células específicas da planta; 3) se encontra no mesmo locus genético do genoma nuclear das células da planta em que se encontra o ADN da esterilidade masculina.

A presente invenção refere-se também a uma sequência quimérica de ADN que contém, pelo menos, um ADN de esterilidade masculina sob o controlo do primeiro promotor e que também pode conter, adjacente ao ADN da esterilidade masculina, pelo menos um ADN indicador sob o controlo do segundo promotor. Para além disto, a presente invenção refere-se a um vector que contém a sequência de ADN estranho, da presente invenção e que é adequada para a transformação de células de plantas, pelo que a sequência

de ADN estranho é integrada no genoma nuclear das células de um modo estável.

A presente invenção refere-se ainda a células de uma planta e a culturas de células de plantas, cujos genomas nucleares são transformados com a sequência de ADN estranho.

Para além disto, a presente invenção refere-se ainda a um processo para a produção de uma planta de esterilidade masculina nuclear, do seu material de reprodução e de culturas das suas células contendo a sequência de ADN estranho na qual o ADN de esterilidade masculina: 1) se encontra sob o controlo do primeiro promotor e, opcionalmente, no mesmo locus genómico do ADN indicador sob o controlo do segundo promotor; 2) se integra de um modo estável no genoma nuclear das células das plantas; e, 3) pode expressar-se de modo selectivo nas células dos estames da planta sob a forma do ARN, proteína ou polipéptido primário.

A presente invenção refere-se ainda a um processo para a produção de sementes híbridas, que se desenvolvem no interior de plantas híbridas por cruzamento de: 1) a planta masculina estéril da presente invenção que inclui, no seu genoma nuclear, o ADN indicador, que codifica, de preferência, uma proteína que confere à planta resistência a um herbicida; e 2) uma planta masculina fértil sem o ADN indicador no seu genoma. A presente invenção refere-se, especialmente, a um processo para a produção de sementes híbridas em escala comercial, de preferência numa população substancialmente aleatória, sem a necessidade

de um grande trabalho manual.

A presente invenção refere-se ainda a um promotor específico do tapetum de um genoma de planta. Pode utilizar-se este promotor como o primeiro promotor na sequência de ADN estranho da presente invenção para transformar a planta, tornando-a masculina estéril a nível nuclear.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Reconhece-se que a hibridação das plantas constitui um processo importante para a produção de uma descendência que possua uma combinação das características desejadas das plantas progenitoras. A descendência híbrida resultante possui, muitas vezes, a capacidade de exceder os seus progenitores em diferentes aspectos, tais como rendimento, adaptabilidade às alterações ambientais e resistência às doenças. Designa-se esta capacidade por "heterose" ou "vigor híbrido". Como resultado, a hibridização tem sido amplamente utilizada para melhorar as colheitas principais, tais como as de cereais, beterraba e girassol. Por numerosas razões, relacionadas em primeiro lugar com o facto da maioria das plantas ser susceptível de sofrer polinização directa e polinização cruzada, a polinização cruzada controlada das plantas sem auto-polinização significativa, para produzir uma colheita de sementes híbridas, é difícil de se conseguir à escala comercial.

Na natureza, a maioria das plantas cerealíferas

produzem órgãos reprodutores masculinos e femininos, na mesma planta, normalmente muito próximos um do outro, na mesma flor. Isto favorece a auto-polinização. Contudo, algumas plantas constituem exceções como resultado da especial morfologia dos seus órgãos reprodutores, o que favorece a polinização cruzada. Estas plantas produzem uma descendência híbrida com vigor e adaptabilidade melhorados. Uma tal morfologia da Cannabis ssp (cânhamo) envolve órgãos de reprodução em plantas separadas. Uma outra destas morfologias, na Zea mays (cereal), envolve órgãos reprodutores masculinos e femininos em diferentes partes da mesma planta. Uma outra destas morfologias na Elaeis guineensis (óleo de palma) envolve gâmetas masculinos e gâmetas femininos férteis os quais se tornam férteis em diferentes alturas do desenvolvimento da planta. Algumas outras espécies de plantas, tais como a Ananas Comosus (ananás), favorecem a polinização cruzada através da fisiologia particular dos seus órgãos reprodutores. Tais plantas desenvolveram um chamado "sistema de auto-incompatibilidade" em que o pólen de uma planta não é capaz de fertilizar o gâmeta feminino da mesma planta ou de outra planta com o mesmo genótipo.

Algumas outras espécies de plantas favorecem a polinização cruzada expressando naturalmente as chamadas características genômicas de "esterilidade masculina". De acordo com esta característica, as anteras das plantas degeneram antes do pólen, produzido pelas anteras, atingir a maturidade. Ver: "Male-Sterility in Higher Plants", M.L.H. Kaul, 1987, in Monographs on Theoretical and Applied Genetics 10, Edit. Springer Verlag. Crê-se que uma tal característica de esterili-

dade masculina natural resulte de uma ampla variedade de mutações naturais, envolvendo, na maioria das vezes, deficiências recessivas, não se mantendo facilmente esta característica nas espécies de plantas que, de um modo predominante, efectuam uma polinização directa, visto que em situações naturais não se produzirão sementes.

Existem quatro tipos principais de esterilidade masculina observados na Natureza. Nos programas comerciais de reprodução utilizam-se os quatro tipos de esterilidade masculina para assegurar a existência de polinização cruzada para produzir sementes híbridas para as sementeiras tais como as de cereais, beterraba, colza e girassol.

Um tipo de esterilidade masculina encontra-se codificada no núcleo e pensa-se que sejam herdados como alelos recessivos. Para fins de reprodução, conserva-se uma planta progenitora estéril masculina recessiva cruzando-a com uma planta masculina fértil heterozigótica que também englobe o alelo recessivo da esterilidade masculina, pelo que a descendência é constituída por 50% de plantas estéreis masculinas recessivas. Os outros 50% são constituídos por plantas masculinas férteis que têm de ser eliminadas da sementeira em programas de cruzamento que apenas se podem efectuar de modo eficaz se o alelo recessivo de esterilidade masculina for segregado conjuntamente com um marcador susceptível de ser seleccionado ou rastreado.

Na patente de invenção norte-americana Nº4727219, encontra-se descrito um procedimento para a utilização da este-

rilidade masculina de carácter recessivo na produção de milho híbrido.

Um segundo tipo de esterilidade masculina codificada no núcleo, mas herdada como um alelo dominante. Uma vantagem das plantas masculinas estéreis dominantes, em comparação com as plantas masculinas estéreis recessivas, reside no facto de se poderem conservar as plantas masculinas estéreis dominantes através de cruzamento com uma planta masculina fértil, para produzir uma geração que é constituída por 50% de plantas masculinas estéreis.

No entanto, a utilidade destas plantas estéreis masculinas nucleares dominantes é limitada devido ao facto do seu alelo dominante de esterilidade masculina não se encontrar, na maioria dos casos, em firme conexão (isto é, no mesmo locus genético) a um marcador susceptível de ser seleccionado ou de ser rastreado.

Um terceiro tipo de esterilidade masculina encontra-se codificada no citoplasma. Na maioria dos casos o código citoplasmático encontra-se no genoma mitocondríaco das plantas e apenas nalguns casos o código se encontra no genoma do cloroplasto das plantas. A hereditariedade da esterilidade masculina citoplasmaticamente codificada não segue as regras Mendelianas, mas depende bastante de factores citoplásmicos. A geração que se obtém a partir de cruzamentos entre plantas citoplasmaticamente masculinas estéreis e plantas masculinas férteis é toda ela portadora do gene citoplásmico da esterilidade masculina e, por

esse motivo, estéril. Como resultado, a descendências de plantas deste tipo possui apenas valor comercial se o produto econômico da descendência não se destinar a ser utilizado como semente mas antes como plantas tais como as ornamentais e beterraba.

Um quarto tipo de esterilidade masculina é o resultado de uma combinação de esterilidade masculina codificada no núcleo e da esterilidade masculina codificada no citoplasma. Os alelos nucleares que induzem a esterilidade masculina são, normalmente, recessivos e apenas as plantas que contêm o alelo citoplásmico da esterilidade masculina e que são homozigóticas para o alelo nuclear que induz a esterilidade masculina são fenotipicamente masculinas estéreis. Neste tipo de planta, os alelos dominantes correspondentes que induzem a fertilidade masculina ou "restauradores da fertilidade" produzem um fenótipo masculino fértil. Como resultado, a descendência masculina estéril deste tipo de planta pode tornar-se masculina fértil por polinização das plantas masculinas estéreis com pólen contendo os restauradores da fertilidade. Daí resulta que a descendência de plantas deste tipo possui valor comercial, em que o produto comercial é uma semente, isto é, plantas tais como cereais, sorgo e girassol.

A produção de sementes híbridas realiza-se, tipicamente, pela plantação em larga escala de plantas citoplasmaticamente masculinas estéreis e de plantas masculinas férteis, evitando, de certo modo (por exemplo com um marcador de distinção), que as sementes híbridas resultantes se misturem com as

sementes não híbridas. De acordo com a patente de invenção norte-americana Nº 3 842 538, separam-se, de um modo enfadonho, as sementes híbridas das sementes não híbridas, com base na cor. De acordo com a patente de invenção norte-americana Nº: 4 351 130, evita-se o problema da separação das sementes híbridas das sementes não híbridas utilizando plantas masculinas estéreis pequenas e plantas masculinas férteis grandes, destruindo-se depois as plantas masculinas férteis grandes. após a polinização. De acordo com as patentes de invenção norte-americanas Nºs: 4 658 085, 4 517 763 e 4 658 084, produzem-se as plantas citoplasmaticamente masculinas estéreis com tolerância a um herbicida, o qual não se encontra presente nas plantas masculinas férteis, que se destroem com o herbicida, após a polinização. De acordo com a patente de invenção norte-americana Nº 4 305 225, efectua-se a aspersão das plantas do arroz masculinas estéreis com uma hormona do crescimento (por exemplo, giberelina) no sentido de originar o completo aparecimento das panículas que suportam as flores, a partir das bainhas das folhas do arroz, aumentando, deste modo, a capacidade das flores para receber o pólen das plantas masculinas férteis.

Em todos estes processos para a produção de sementes híbridas a partir de plantas masculinas estéreis investigaram-se procedimentos para a sua obtenção simples e pouco dispendiosa, à escala comercial: 1) elevada produção de sementes híbridas a partir de cada planta masculina estéril; 2) uma população de sementes híbridas que resulta quase exclusivamente do pólen de plantas masculinas férteis e de embriões de plantas masculinas estéreis e, que se encontra substancialmente isenta

de sementes não híbridas de plantas masculinas férteis: 3) produção fácil das plantas masculinas estéreis e masculinas férteis: e 4) a remoção virtualmente completa ou destruição quer das plantas masculinas férteis após terem polinizado as plantas masculinas estéreis, quer a separação selectiva das sementes não híbridas, produzidas pelas plantas masculinas férteis, das sementes híbridas produzidas pelas plantas masculinas estéreis.

RESUMO DA PRESENTE INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, proporciona-se uma célula de uma planta, na qual o genoma nuclear é transformado com uma sequência de ADN estranho, de preferência uma sequência quimérica de ADN, que se caracteriza por:

- a) um ADN de esterilidade masculina que codifica um primeiro ARN, proteína ou polipéptido que, quando produzido ou produzido em excesso numa célula do estame da planta, perturba significativamente o metabolismo, funcionamento e/ou desenvolvimento de célula do estame; e
- b) um primeiro promotor capaz de comandar de modo selectivo a expressão do ADN da esterilidade masculina nas células dos estames da planta; encontrando-se o ADN de esterilidade masculina na mesma unidade transcricional, e sob o controlo, do primeiro promotor.

A sequência de ADN estranho no genoma nuclear da célula transformada, pode compreender, também, de preferência no mesmo locus genético do ADN da esterilidade masculina:

- c) um ADN indicador que codifica um segundo ARN, proteína ou polipéptido que, quando presente em, pelo menos, um tecido específico ou em células específicas da planta, a tornam facilmente distinguível das outras que não contêm o segundo ARN, proteína ou polipéptido, pelo menos no tecido específico ou células específicas; e
- d) um segundo promotor capaz de comandar o ADN indicador, pelo menos, no tecido específico ou nas células específicas; encontrando-se o ADN indicador na mesma unidade transcricional, e sob o controlo, do segundo promotor.

Também de acordo com a presente invenção, proporciona-se uma sequência quimérica de ADN estranho que compreende o ADN da esterilidade masculina e o primeiro promotor e que pode compreender, também, o ADN indicador e o segundo promotor, assim como, pelo menos, um ADN adicional que codifica um péptido transitório susceptível de transportar a primeira proteína ou polipéptido ou a segunda proteína ou polipéptido para o interior de um cloroplasto ou mitocôndria de uma célula de uma planta em cujo citoplasma se expressa a sequência quimérica de ADN estranho.

Ainda de acordo com a presente invenção, proporciona-se: uma planta masculina estéril constituída pelas células

transformadas; uma semente de plantas masculinas estéreis; sementes e plantas híbridas produzidas pelo cruzamento de uma planta masculina estéril com uma planta masculina fértil; e, um processo para a produção de tais sementes híbridas.

Ainda de acordo com a presente invenção, proporcionam-se primeiros promotores específicos do tapetum.

DESCRIÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, produz-se uma planta masculina estéril a partir de uma única célula de uma planta, mediante transformação da célula da planta segundo um procedimento bem conhecido, que permite inserir de modo estável, no genoma nuclear da célula, a sequência de ADN estranho da presente invenção. A sequência de ADN estranho compreende, pelo menos, um ADN de esterilidade masculina, que está sob o controlo e fundida na extremidade 5', com o primeiro promotor e se encontra fundida na sua extremidade 3' com mensagens de regulação de transcrição adequadas (incluindo o sinal de poliadenilação). Deste modo, produz-se ou sobreproduz-se selectivamente o primeiro ARN, proteína ou polipéptido nas células dos estames da planta, de modo a tornar a planta masculina estéril. A sequência de ADN estranho também compreende, de preferência, pelo menos um ADN indicador que se encontra sob o controlo e fundido na sua extremidade 5' com o segundo promotor e se encontra fundido na sua extremidade 3' com informações adequadas de regulação de transcrição (incluindo o sinal de poliadenilação). O ADN indicador encontra-se, de preferência, no mesmo locus

genético do ADN de esterilidade masculina, pelo que o segundo ARN, proteína ou polipéptido se produzem, pelo menos, no tecido específico ou nas células específicas da planta, pelo que se pode distinguir facilmente a planta e/ou separá-la das outras plantas que não contêm o segundo ARN, proteína ou polipéptido no tecido específico ou nas células específicas. Isto garante, com um elevado grau de certeza, a segregação conjunta do ADN de esterilidade masculina e do ADN indicador na progénie da planta.

Transforma-se, de preferência, a célula de uma planta (especialmente de uma planta susceptível de ser infectada com Agrobacterium), de acordo com a presente invenção, utilizando um vector que consiste num plasmido Ti desarmado que contém a sequência de ADN estranho e que é transportado pelo Agrobacterium. Pode efectuar-se esta transformação utilizando os procedimentos descritos, por exemplo, nas publicações das patentes de invenção europeias O 116 718 e, O 270 822. Os vectores plasmidos Ti preferidos contêm a sequência de ADN estranho entre as sequências das extremidades, ou, pelo menos, localizadas à esquerda da sequência da extremidade direita do ADN T do plasmido Ti. É evidente que se podem utilizar outros tipos de vectores para transformar as células da planta, utilizando procedimentos tais como transferência directa do gene (conforme descrito, por exemplo, na publicação da patente de invenção europeia Nº O 223 274), transformação medida pelo pólen (conforme se descreve na publicação da patente de invenção europeia Nº O 270 356, publicação PCT W085/01856, e publicação da patente de invenção europeia Nº O 275 069), transformação in vitro do protoplasto (conforme se descreve, por exemplo, na patente de invenção norte-

-americana Nº 4 684 611), transformação da planta mediada pelo ARN de um vírus (conforme descrito, por exemplo, na publicação da patente de invenção europeia Nº 0 067 553 e na patente de invenção norte-americana Nº 4 407 956) e transformação mediada pelo lipossoma (conforme se descreve, por exemplo, na patente de invenção norte-americana Nº 4 536 475).

De preferência, proporciona-se uma planta nuclearmente masculina estéril da presente invenção, transformando a célula da planta com um vector plasmido Ti, desarmado, contendo a sequência de ADN estranho com o ADN de esterilidade masculina sob o controlo de um primeiro promotor e o ADN indicador sob o controlo de um segundo promotor. O ADN indicador pode encontrar-se a montante ou a jusante do ADN de esterilidade masculina no vector plasmido Ti, mas, de preferência, são adjacentes um ao outro e localizam-se entre as sequências das extremidades ou localizam-se, pelo menos, à esquerda da sequência da extremidade direita do vector plasmido Ti, pelo que são conjuntamente transferidas, de um modo correcto, para o genoma da célula da planta. Contudo, se se desejar, pode transformar-se inicialmente a célula com uma sequência de ADN estranho contendo o ADN de esterilidade masculina e um primeiro promotor e pode transformar-se, subsequentemente, com um ADN indicador e um segundo promotor, que se inserem no mesmo locus genético no genoma nuclear da célula como o ADN da esterilidade masculina. Os vectores adequados para se atingir este objectivo são os mesmos que se referiram antes para a transformação das células com a sequência de ADN estranho. O vector preferencial é um plasmido vector Ti desarmado.

A selecção do ADN de esterilidade masculina não é crítica. Pode seleccionar-se e isolar-se um ADN de esterilidade masculina adequado segundo um procedimento bem conhecido, uma vez que ele codifica o primeiro ARN, proteína ou polipéptido que perturba significativamente o metabolismo correcto, funcionamento e/ou desenvolvimento de qualquer célula do estame, na qual se expressa o ADN de esterilidade masculina, conduzindo, de preferência, por esse meio à morte de qualquer dessas células do estame. Os exemplos de ADN de esterilidade masculina codificam: ARNases tais como a RNase T1 (que degrada as moléculas de ARN por hidrólise da ponte a seguir a qualquer resíduo de guanidina) e Barnase; ADNases tais como uma endonuclease (por exemplo, EcoRI); ou protease tais como a papaína (por exemplo, zimogénio de papaína e proteína activa de papaína).

Outros exemplos ADNs de esterilidade masculina codificam enzimas que catalisam a síntese de fito-hormonas, tais como: a isopentil-transferase, que é uma enzima que catalisa o primeiro passo na biossíntese da citoquinina e que é codificada pelo gene 4 do ADN T do Agrobacterium; e as enzimas envolvidas na síntese da auxina e codificados pelo gene 1 e pelo gene 2 do ADN T do Agrobacterium.

Outros exemplos ainda de ADNs de esterilidade masculina codificam; glucanases; lipases tais como a fosfolipase A2 (Verheij et. al. Rev. Biochem Pharmacol. 91, 1981, 92-203); peroxidases lipídicas; ou inibidores de parede celular das células das plantas. Outros exemplos de ADNs de esterilidade masculina codificam proteínas tóxicas para as células das plan-

tas, tais como uma toxina bacteriana (por exemplo o fragmento B da toxina diftérica ou botulina).

Ainda um outro exemplo de ADN de esterilidade masculina é um ADN de sentido inverso que codifica um cordão de ADN complementar em relação a um cordão de ADN que é naturalmente transcrito nas células dos estames das plantas sob o controlo de um promotor endógeno conforme se descreve, por exemplo, na publicação da patente de invenção europeia Nº 0 223 399. Pode transcrever-se um tal ADN de sentido inverso numa sequência de ARN capaz de se ligar à porção codificante e/ou não codificante de um ARN, produzido naturalmente na célula do estame, de tal modo que iniba a transferência do ARN naturalmente produzido. Um exemplo de um ADN de sentido inverso é o ADN de sentido inverso do gene TA29 (descrito no Exemplo 2) que se expressa naturalmente, sob o controlo do promotor TA29, nas células do tapetum das anteras das plantas.

Um outro exemplo de um ADN de esterilidade masculina codifica uma enzima específica de ARN (isto é, a chamada "ribozima"), capaz de uma clivagem altamente específica contra uma dada sequência alvo, conforme descrito por Haseloff e Garlach (Nature 334, 1988, 585-591). Tal ribozima é, por exemplo, a ribozima lançada contra o ADN codificado pelo gene TA29.

Ainda outros exemplos de ADNs de esterilidade masculina codificam produtos que podem tornar as células dos estames sensíveis a doenças específicas, tais como infecções por

fungos. Pode utilizar-se um tal ADN de esterilidade masculina numa planta em que todas as outras células, nas quais não se expressa o ADN da esterilidade masculina, são resistentes a uma doença específica.

Por "estranho", no que se refere à sequência de ADN estranho da presente invenção, pretende-se significar que a sequência de ADN estranho contém um ADN estranho de esterilidade masculina e/ou um primeiro promotor estranho. Por "estranho", no que se refere a um ADN, tal como o ADN de esterilidade masculina e um primeiro promotor, assim como um ADN indicador, um segundo promotor e qualquer outro ADN, na sequência de ADN estranho, entende-se que tal ADN não se encontra no mesmo meio genómico na célula da planta transformada com esse ADN, de acordo com a presente invenção, tal como o está esse ADN quando se encontra naturalmente na célula da planta, bactéria, animal, fungo, vírus, ou similares, a partir das quais se origina um tal ADN. Isto significa, por exemplo, que o ADN estranho de esterilidade masculina ou o ADN indicador pode ser: 1) um ADN nuclear numa planta de origem; 2) endógeno à célula da planta transformada (isto é, a partir de uma planta de origem com o mesmo genótipo que a planta a transformar); e 3) na mesma unidade transcricional que o seu próprio promotor endógeno e informações de regulação de transcrição na extremidade 3' (da planta de origem) na sequência de ADN estranho da presente invenção na célula da planta transformada; mas 4) inserido num local do genoma nuclear da célula da planta transformada diferente daquele em que se encontrava na planta de origem, pelo que não se encontra

rodeado na célula da planta transformada pelos genes que o rodeiam naturalmente na planta de origem. Um ADN estranho de esterilidade masculina ou um ADN indicador pode, também, por exemplo : 1) ser um ADN nuclear numa planta de origem ; e 2) ser endógeno à célula da planta transformada ; mas, 3) encontrar-se na mesma unidade transcricional que um promotor endógeno diferente (isto é, não o seu próprio) e/ou informações de regulação de transcrição da extremidade 3' numa sequência quimérica de ADN estranho da presente invenção numa célula de uma planta transformada. Um ADN estranho de esterilidade masculina ou um ADN indicador pode também ser: um ADN nuclear numa planta de origem; e 2) ser endógeno à célula da planta transformada; mas 3) encontrar-se na mesma unidade transcricional que um promotor heterólogo e/ou informações de regulação de transcrição na extremidade 3' numa sequência quimérica de ADN estranho da presente invenção numa célula de planta transformada um ADN de esterilidade masculina ou um ADN estranho também pode, por exemplo, ser heterólogo à célula da planta transformada e encontrar-se na mesma unidade transcricional em que se encontra um promotor endógeno e/ou informações de regulação de transcrição da extremidade 3' (por exemplo do genoma nuclear de uma planta com o mesmo genótipo que a planta a ser transformada) numa sequência quimérica de ADN estranho da presente invenção numa célula de planta transformada. Um exemplo de um ADN estranho de esterilidade masculina pode surgir a partir do genoma de uma planta com o mesmo genótipo que o da planta a ser transformada e codificar uma enzima catalítica tal como uma protease ou ribonuclease, que é endógena às células dos estames da planta a ser transformada,

pelo que se produz a enzima em excesso nas células transformadas dos estames no sentido de perturbar significativamente o seu metabolismo, funcionamento e/ou desenvolvimento. De preferência, o ADN de esterilidade masculina e o ADN indicador são ambos heterólogos para a célula da planta a ser transformada.

Por "heterólogo", no que se refere ao ADN, tal como um ADN de esterilidade masculina, um primeiro promotor, um ADN indicador, um segundo promotor e qualquer outro ADN na sequência de ADN estranho, pretende-se referir um ADN que não se encontra naturalmente no genoma nuclear das células de uma planta com o mesmo genótipo da planta a ser transformada. Exemplos de ADNs heterólogos incluem os ADNs dos cloroplastos e das mitocôndrias obtidos a partir de uma planta com o mesmo genótipo da planta a ser transformada, mas os exemplos preferidos são os ADNs dos cloroplastos, mitocôndrias e ADNs nucleares das plantas que possuem um genótipo diferente das plantas a serem transformadas, ADNs de genomas animais e bacterianos e ADNs plasmídicos e cromossômicos de genomas, fungos e de vírus.

Por "quimérica", no que se refere à sequência de ADN estranho, da presente invenção, pretende-se referir que pelo menos um dos seus ADNs de esterilidade masculina: 1) não se encontra na natureza sob o controlo do seu primeiro promotor para um ADN de esterilidade masculina; 2) não se encontra na natureza no mesmo locus genético de, pelo menos, um dos seus ADNs indicadores. Exemplos de sequências quiméricas de ADN estranho, da presente invenção, compreendem: um ADN de esterili-

dade masculina de origem bacteriana sob o controlo de um primeiro promotor da planta de origem; e um ADN de esterilidade masculina da planta de origem sob o controlo de um primeiro promotor da planta de origem e no mesmo locus genético de um ADN indicador de origem bacteriana.

Uma vez que o ADN de esterilidade masculina se expressa selectivamente nas células dos estames de uma planta, é preferível que o promotor primário, que controla o ADN de esterilidade masculina na sequência de ADN estranho, seja um promotor capaz de comandar selectivamente a expressão do gene nas células do estame das plantas. (Por "estame" pretende-se referir o órgão das flores que constituem o gâmeta masculino e que englobam uma antera e um filete). Um promotor específico de um estame pode ser um promotor endógeno ou um promotor exógeno e pode ser do genoma nuclear ou do genoma do cloroplasto ou do genoma mitocondrial da célula da planta. Em qualquer dos casos, o primeiro promotor é estranho ao genoma nuclear da célula da planta a ser transformada. De preferência, o primeiro promotor faz com que o ADN de esterilidade masculina se expresse apenas nas células das enteras, do pólen ou dos filetes, especialmente no tapetum ou células epidérmicas das anteras. Pode seleccionar-se e isolar-se o primeiro promotor mediante um procedimento bem conhecido a partir de espécies de plantas que se pretendem tornar masculinas estéreis, uma vez que o primeiro promotor comanda, de um modo selectivo, a expressão do ADN de esterilidade masculina nas células dos estames de modo a aniquilar ou a incapacitar o estame e a tornar a planta incapaz de produzir gâmetas masculinos férteis. Também se selecciona e isola o primeiro promotor, de preferência, uma vez que é eficaz para impedir a expressão do ADN de esterilidade masculina nas outras partes da planta que não estão en-

volvidas na produção de pólen fértil, especialmente nos órgãos femininos da planta. Pode, por exemplo, identificar-se e isolar-se numa planta, um primeiro promotor endógeno adequado específico dos estames que se pretende transformar em masculina estéril, por:

1. pesquisa de um mARN que apenas se encontra presente na planta durante o desenvolvimento dos seus estames, de preferência nas suas anteras, polén ou filetes;
2. isolamento desse mARN específico dos estames;
3. preparação de um cADN a partir desse mARN específico dos estames;
4. utilização deste cADN como uma sonda para identificar as regiões no genoma da planta que contêm ADN que codifica para o mARN específico do estame; e depois
5. identificação da porção do genoma da planta que se encontra a montante (isto é, 5') do ADN que codifica o mARN específico do estame e que contém o promotor deste ADN.

Exemplos de tais primeiros promotores são o promotor TA29, o promotor TA26 e o promotor TA13, descritos nos exemplos que se apresentam adiante, que se isolaram a partir do tabaco e são promotores específicos do tapetum. A partir deste genoma pode isolar-se um outro primeiro promotor específico do tapetum de outras espécies de plantas, utilizando o gene TA29, TA26 ou TA13 como uma sonda, tal como no passo 4 anterior. Sob condições de hibridação, tal sonda hibridar-se-á com o ADN que codifica um mARN específico do tapetum numa mistura de sequências de ADN a

partir do genoma de outras espécies de plantas (Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Ed. Cold Spring Harbour Laboratory, 1982). Depois disto, tal como no passo 5 anterior pode identificar-se o outro primeiro promotor específico do tapetum.

Se se encontrar presente mais do que um ADN de esterilidade masculina na sequência de ADN estranho, da presente invenção, todos os ADNs de esterilidade masculina podem estar sob o controlo de um único primeiro promotor, mas, de preferência, cada ADN de esterilidade masculina encontra-se sob o controlo do seu próprio primeiro promotor. Quando se encontram presentes na sequência de ADN estranho uma pluralidade de ADNs de esterilidade masculina, também podem codificar o mesmo ou diferentes primeiros ARN(s), polipéptido(s) ou proteína(s). Por exemplo, quando o ADN de esterilidade masculina codifica um ARNase tal como a ARNase T1, é preferível que, pelo menos, 3 e, especialmente de 4 a 6 cópias de ADN de esterilidade masculinas e o seu promotor primário sejam proporcionadas na sequência de ADN estranho. Em qualquer dos casos, todo o ADN(s) de esterilidade masculina e os seus primeiro(s) promotor(es) devem encontrar-se, de preferência, adjacentes um ao outro na sequência de ADN estranho e em qualquer vector utilizado para transformar células de plantas com a sequência de ADN estranho.

A selecção da sequência de ADN indicada também não é crítica. Pode seleccionar-se e isolar-se um ADN indicador adequado, segundo um procedimento bem conhecido, uma vez que este codifica um segundo mARN, proteína ou polipéptido que permite distinguir e separar facilmente as plantas que expressam o ADN

indicador das plantas que não expressam o segundo ARN, proteína ou polipéptido. Exemplos de ADNs indicadores codificam proteínas que podem proporcionar uma cor que permite distinguir as células das plantas, tal como o gene Al que codifica a desidro-quercetina-4-redutase (Meyer et al., Nature, 330, 1987, 677-678) e o gene da glucoronidase (Jefferson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. ("PMMAS") 83, 1988, 8447), ou que proporcionam uma característica morfológica específica na planta tal como nanismo ou uma forma diferente das folhas. Outros exemplos de ADNs indicadores conferem às plantas: tolerância à fadiga, tal como a proporcionada pelo gene que codifica a superóxido-dismutase, de acordo com o descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 88/402222,9; resistência à doença ou à peste tal como a proporcionada pelo gene que codifica uma endotoxina do Bacillus thuringiensis que confere resistência aos insectos conforme descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 86/30029.1 ou um gene que codifica um péptido bacteriano que confere uma resistência bacteriana conforme se descreve no pedido de patente de invenção europeia Nº 88/401673.4.

Os ADNs indicadores preferidos codificam proteínas secundárias ou polipéptidos que inibem ou neutralizam a acção de herbicidas tais como: o gene sfr e o gene sfrv que codificam enzimas que conferem resistência aos inibidores da glutamino-sintetase tais como "Biolaphos" e fosfinotricina, conforme descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 87/4005440; genes que codificam enzimas alvo modificadas para certos herbicidas que possuem uma afinidade para os herbicidas menor do que as enzimas endógenas que se originem naturalmente, tais como a glutamino-sintetase modificada como um alvo para a fosfinotricina,



conforme se descreve na publicação da patente de invenção europeia Nº 0 240 792 e uma 5-enol-piruvil-siquimato-3-fosfato-sintetase modificada como um alvo para o glicosato, conforme se descreve na publicação da patente de invenção europeia Nº 0 218 571.

Também pode seleccionar-se e isolar-se o segundo promotor que controla o ADN indicador segundo um procedimento bem conhecido, uma vez que o ADN indicador se expressa selectivamente quer num quer em mais tecidos específicos ou células específicas ou de modo constitutivo em toda a planta, conforme desejado, dependendo da natureza do segundo ARN, proteína ou polipeptido codificado pelo ADN indicador. Por exemplo, se o ADN indicador codificar a resistência a um herbicida, pode ser útil ter o ADN indicador expresso em todas as células da planta, utilizando um segundo promotor constitutivo potente, tal como um promotor 35S (Odell et al., Nature, 313, 1985, 810-812), um promotor 35S'3 (Hull e Howell, Virology, 86 1987, 482-493), o promotor do gene da nopalino-sintetase ("PNOS") do plasmído Ti (Herrera-Estrella, Nature, 303, 1983, 209-213) ou o promotor do gene da octopino-sintetase ["POCS" De Greve et al., J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 1982, 499-511]. Se o ADN indicador codificar uma proteína que confira resistência a uma doença, será útil possuir o ADN indicador expresso selectivamente no tecido lesado, utilizando, por exemplo, um promotor TR, tal como os promotores TR1' ou TR2' do plasmído Ti (Vemlten et al., EMBO J. 3, 1984, 2723-2730). Se o ADN indicador codificar a resistência a um herbicida, será útil possuir o ADN indicador expresso selectivamente no tecido verde, utilizando, por exemplo, o promotor do

gene que codifica a pequena sub-unidade de Rubisco (pedido de patente de invenção europeia Nº 87/400 544.0). Se o ADN indicador codificar um pigmento, poderá ser útil possuir o ADN indicador expresso em células específicas, tais como as células das pétalas, as células das folhas ou as células das sementes, de preferência na camada exterior do revestimento da semente.

Pode-se identificar e isolar, segundo um procedimento bem conhecido, um segundo promotor específico de um tecido para uma planta que se pretende transformar em masculina estéril e facilmente diferenciada das plantas não transformadas por:

1. pesquisa de um mARN que apenas se encontra presente na planta durante o desenvolvimento de um determinado tecido, tal como o das pétalas, folhas ou sementes;
2. isolamento do mARN desse tecido específico;
3. preparação de um cADN a partir desse mARN específico do tecido;
4. utilização desse cADN como uma sonda para identificar as regiões do genoma da planta que contêm o ADN que codifica o mARN específico do tecido; e, depois,
5. identificação da porção do genoma da planta que se encontra a montante do ADN que codifica o mARN específico do tecido e que contêm o promotor do

referido ADN.

Se se encontrar presente mais do que um ADN indicador, na sequência de ADN estranho, de acordo com a presente invenção, todos os ADNs indicadores podem encontrar-se sob o controlo de um único segundo promotor, mas, de preferência, cada um dos ADNs indicadores encontrar-se-á sob o controlo do seu próprio promotor. De preferência, cada um dos ADNs indicadores encontrar-se-á sob o controlo do seu próprio segundo promotor e codificará um segundo ARN, proteína ou polipéptido diferentes, proporcionando características diferentes e distintas à planta transformada. Em qualquer dos casos, o(s) ADN(s) indicador(es) e o(s) promotor secundário(s) serão adjacentes um ao outro e a um ou mais ADNs de esterilidade masculina contidos na sequência de ADN estranho, da presente invenção, e em qualquer um dos vectores utilizados para transformar as células das plantas com a sequência de ADN estranho.

Prefere-se, geralmente, que o primeiro ARN, proteína ou polipéptido, codificado pelo ADN de esterilidade masculina, interfira de modo significativo com o metabolismo, funcionamento e/ou desenvolvimento das células do estame, actuando no citoplasma ou no núcleo das células do estame. No entanto, quando se pretende que as primeira proteína ou polipéptido e/ou a segunda proteína ou polipéptido sejam transportadas do citoplasma

para os cloroplastos ou mitôcondrias das células das plantas transformadas, a sequência de ADN pose incluir, para além disto, um ADN estranho, adicional, que codifica um péptido de transporte. O ADN adicional encontra-se entre o ADN de esterilidade masculina e o promotor primário se a primeira proteína ou polipéptido se

destina a ser transportada desse modo e está entre o ADN indicador e o promotor secundário se a segunda proteína ou polipéptido se destina a ser transportada deste modo. Por "péptido de transporte" pretende-se referir um fragmento de polipéptido que se encontra normalmente associado a uma proteína ou sub-unidade de proteína de um cloroplasto ou de uma mitocôndria e que se produz na célula como a proteína precursora codificada pelo ADN nuclear da célula. O péptido de transporte é responsável pelo processo de translocação da proteína ou sub-unidade de proteína da mitocôndria ou do cloroplasto, codificadas no núcleo, para o interior dos cloroplastos ou das mitocôndrias e durante este processo o péptido de transporte separa-se ou é proteoliticamente removido da proteína ou sub-unidade do cloroplasto ou da mitocôndria. Podem proporcionar-se um ou mais ADN's adicionais à sequência de ADN estranho, da presente invenção, para transportar um ou mais primeiros ou segundos proteínas ou polipéptidos, de acordo com o descrito, de um modo geral, nos pedidos de patente de invenção europeias N^{os}: 85/402 596.2 e 88/402 222.9 e por: Van den Broeck et al., Nature 313, 1985, 358-363; Schatz, Eur. J. of Bioch. 165, 1987, 1-6; e Boutry et al., Nature 328, 1987, 340-342. Um exemplo de um péptido de transporte adequado para o transporte para o interior dos cloroplastos é o péptido de transporte da pequena sub-unidade da enzima RUBP-carboxilase (pedido de patente de invenção europeia N^o 85/402 596.2) e um exemplo de um péptido de transporte para o transporte para o interior das mitocôndrias é o péptido de transporte da enzima Mn-superóxido-dismutase (ver exemplo 16).

Na sequência de ADN estranho, da presente invenção,

podem seleccionar-se informações reguladoras de transcrição na extremidade 3', entre aqueles que são capazes de possibilitar o terminus de transcrição e poliadenilação correctos do mARN nas células das plantas. Os sinais reguladores de transcrição podem ser os sinais naturais do gene a ser transcrito, mas, também, podem ser estranhos ou heterólogos. Exemplos de sinais de transcrição heterólogos são os do gene da octopino-sintetase (Gielen et al., EMBO J. 3, 1984, 835-845) e o gene 7 do ADN T (Velttten e Schell Nucleic Acids Research ("NAR") 13, 1985, 6981-6998).

Também de acordo com a presente invenção, podem utilizar-se culturas de células de plantas, tais como culturas de células de anteras, contendo a sequência de ADN estranho da presente invenção, na qual o primeiro promotor efectua a expressão do ADN de esterilidade masculina, numa dada fase de desenvolvimento do pólen, de um modo mais específico, após a meiose, para regenerar plantas masculinas estéreis homozigóticas dominantes ("Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from Brassica napus", E.B. Swanson, M.P. Coumans, S.C. Wu, T.L. Barby e W.D. Beversdorf, Plant Cell Reports, 6, 1987, 94-97).

Ainda de acordo com a presente invenção, proporcionam-se processos para a produção de sementes híbridas que se podem desenvolver para darem plantas híbridas. Um processo envolve o cruzamento de uma planta masculina estéril a nível do núcleo, que inclua, pelo menos, um ADN indicador, com uma planta masculina fértil sem o ADN indicador. Plantaram-se as plantas masculinas estéreis e masculinas férteis em filas separadas, próximas uma da outra. Um outro processo envolve o cruzamento de uma planta nuclearmente

masculina estéril, incluindo, pelo menos, dois ADNs indicadores diferentes com uma planta masculina fértil, que possui em comum com a primeira apenas um dos dois ADNs indicadores diferentes numa forma homozigótica. Podem desenvolver-se os progenitores das plantas masculinas estéreis e das plantas masculinas férteis, numa população substancialmente aleatória, aumentando as hipóteses de polinização cruzada, sem necessidade de padrões precisos de plantação. Em seguida, pode remover-se facilmente, de entre a população, a planta progenitora masculina fértil, utilizando características distintas codificadas pelo ADN indicador não comum que a planta progenitora masculina fértil não possuía. Neste processo, de preferência, o ADN indicador não comum, na planta masculina estéril, encontra-se sob o controlo de um promotor constitutivo e codifica uma proteína ou polipéptido que torna a planta masculina estéril resistente a um dado herbicida. Pode destruir-se a planta masculina fértil, após polinização cruzada, utilizando o referido herbicida.

As plantas que se transformaram com o ADN de esterilidade masculina, de preferência com o ADN de esterilidade masculina e o ADN indicador codificando a resistência ao herbicida, integradas de um modo estável e transmissíveis através das gerações como alelos dominantes de acordo com a presente invenção são alternativas e proporcionam diversas vantagens sobre os sistemas de esterilidade masculina citoplásmica que se utilizam presentemente na reprodução e produção de colheitas híbridas. Tais vantagens englobam:

1. Para cereais de polinização cruzada a estratégia de reprodução é mais simples, devido ao facto de



não ser necessário introduzir um gene restaurador na linha progenitora masculina fértil, no cruzamento que produzirá a semente híbrida comercialmente vendida. Na realidade, uma linha progenitora nuclearmente masculina estéril heterozigótica cruzada com uma outra linha progenitora masculina fértil, para produção comercial de sementes, produzirá uma descendência híbrida masculina estéril de 50% e uma descendência híbrida masculina fértil de 50%, daí resultando que a sementeira comercial produza pólen suficiente para garantir a fecundação completa das sementes e proporcionar assim uma produção normal.

Constituem exemplos de tais colheitas os cereais e a colza.

2. Para as colheitas para as quais as sementes não representam o produto comercial, a estratégia de reprodução também é simples, sem necessidade de um gene restaurador expresso na linha progenitora masculina fértil. É claro que para estas colheitas não tem importância que 50% das sementes híbridas comercialmente vendidas sejam masculinas estéreis. Exemplos dessas colheitas são a beterraba e a alfafa.

3. Este sistema permite, numa operação, a produção de linhas nucleares masculinas estéreis e de linhas de manutenção a partir de linhas existentes, da mesma família, eliminando a necessidade de um cruzamento de reforço. Isto reduz o intervalo de tempo entre a concepção e a comercialização de um híbrido, ao longo de, pelo



menos, 6 a 8 gerações. Um exemplo de uma estratégia típica para a produção de plantas híbridas, utilizando como plantas progenitoras as plantas que possuem inserido e expresso o ADN de esterilidade masculina, pode consistir nos seguintes passos:

- 1) efectuar manualmente híbridos de ensaio cruzando linhas naturais e ensaiando a capacidade de combinação e as características seleccionadas (2 anos).
- 2) produzir uma linha progenitora de cada um dos híbridos nuclearmente masculinos estéreis, de acordo com o processo que constitui o objecto da presente invenção (1 ano).
- 3) Multiplicar as plantas progenitoras nuclearmente masculinas estéreis obtidas pelo referido processo, daqui em diante designadas por "A^S", e a sua linha de manutenção, daqui em diante designada por "A", e a planta progenitora masculina fértil polinizadora, daqui em diante designada por "B", da futura colheita comercial (3 anos). Introduzindo durante o mesmo período os híbridos seleccionados em experiências oficiais de produção (3 anos).
- 4) produzir e vender as sementes híbridas aprovadas (1 ano).

4. Combinado com um ADN indicador que codifica a resistência a um herbicida, um tal sistema de esterilidade masculina permite a produção de 2, 3 e 4 estados híbridos em qualquer combinação necessária. Crê-se ser suficiente introduzir o ADN de esterilidade masculina e adjacente a este, o ADN indicador, no interior do genoma

nuclear de uma planta que se utilizará como uma das linhas de reprodução avós ("grand parent") para se obterem 2 ou 3 estados híbridos e, no genoma nuclear de duas linhas avós para 4 estados híbridos. Pode manter-se cada uma das linhas de reprodução de acordo com os dois cruzamentos seguintes e que aqui que se fornecem, a título de exemplo, e em que "SH" representa, respectivamente, os alelos dominantes de esterilidade masculina (S) e da resistência a um herbicida (H) e sh representa os alelos recessivos, respectivamente, de fertilidade masculina (s) e da sensibilidade a um herbicida (h):

- a. SH/sh x sh/sh proporciona uma descendência constituída por 50% de SH e de 50% de sh e, após aspersão com o herbicida para o qual H confere resistência, obtiveram-se plantas 100% estéreis.
- b. sh/sh x sh/sh proporciona uma progénie 100% fértil.

5. Proporciona uma protecção para o possuidor do ADN indicador que se integrou no sistema de esterilidade masculina tornando mais difícil aos competidores reproduzir este ADN indicador nas suas próprias linhas de produção.

Fornecem-se a seguir, a título de esclarecimento, dois exemplos de reprodução de sementes, de acordo com a presente invenção:

ESQUEMA 1: Reprodução de uma planta contendo um ADN de esterilidade masculina adjacente a um ADN indicador que codifica a resistência ao herbicida

1A) Conservando a linha A^S de esterilidade masculina:

Linha A^{SH}/sh x linha A^{sh}/sh

Proporciona-se

50% A^{SH}/sh (fenótipo: masculino-estéril
resistente ao herbicida

50% ssh/sh (fenótipo: masculino-fértil,
sensível ao herbicida)

1B Produção de colheitas de semente híbridas:

a) plantação de sementes de B^{sh}/sh (plantas masculinas e das sementes obtidas pelo cruzamento 1A) que consistem em A^{SH}/sh e de A^{sh}/sh ("plantas femininas") em filas separadas.

b) eliminação do genótipo A^{sh}/sh por aspersione as filas de plantas femininas com o herbicida.

c) ocorrência de polinização cruzada:

A^{SH}/sh x B^{sh}/sh e B^{sh}/sh x B^{sh}/sh

proporciona nas filas femininas:

50% AB^{SH}/sh (fenótipo: híbrido, masculino estéril,
resistente ao herbicida)

50% AB^{sh}/sh (fenótipo: híbrido, masculino fértil,
sensível ao herbicida)

e nas filas de plantas masculinas 100% B^{sh}/sh .

d) eliminação do genótipo B^{sh}/sh que ocorre nas filas de plantas masculinas por aspersão com o herbicida ou por meios mecânicos.

e) recolha das sementes híbridas das filas femininas em que ocorreu a polinização cruzada de c).

Esta é a semente comercialmente vendida.

ESQUEMA 2: Reprodução de uma planta que contém um ADN de esterilidade masculina adjacente de dois ADNs indicadores, codificando cada um deles uma resistência a herbicida diferente (H1 e H2).

2A) Conservação da linha A^S de esterilidade masculina:

$A^S: A^{SH1H2}/sh1h2 \times A^{sh1h2}/sh1h2$

Proporcionam-se

50% $A^{SH1H2}/sh1h2$ (fenótipo: masculino estéril, resistente a ambos os herbicidas).

50% $A^{sh1h2}/sh1h2$ (fenótipo: masculino fértil, sensível a ambos os herbicidas).

2B) Conservação a linha de polinização B:

$B^{sh1H2}/sh1H2 \times B^{sh1H2}/sh1H2$

proporciona

100% $B^{sh1H2}/sh1H2$ (fenótipo: masculino fértil, sensível ao herbicida 1 e resistente ao herbicida 2).

2C) Produção de colheitas de sementes híbridas:



- a) Plantação das sementes obtidas a partir de 2A) e das sementes obtidas a partir de 2B, aleatoriamente.
- b) eliminação do genótipo $Ashlh2/shlh2$ por aspersão do campo com o herbicida 2.
- c) ocorrência da polinização cruzada:
 $ASH1H2/shlh2 \times Bsh1H2/sh1H2$
 Proporciona
 50% $ABSH1H2/sh1H2$
 50% $ABshlh2/sh1H2$
 e
 ocorrência da auto-polinização:
 $Bsh1H2/sh1H2 \times Bsh1H2/sh1H2$
 Proporciona
 100% $Bsh1H2/sh1H2$
- d) eliminação das plantas com o genótipo $Bsh1H2/sh1H2$ obtidas a partir da linha progenitora B, para os quais ocorreria a polinização directa, por aspersão do campo com o herbicida 1.
- e) recolha das sementes híbridas das plantas $ASH1H2/sh1H2$ restantes obtidas pela polinização cruzada de c).

Os Exemplos que adiante se fornecem têm como objectivo tornar mais esclarecedora a presente invenção. As figuras referidas nos Exemplos são as seguintes:



A fig. 1 apresenta os mapas de restrição do cADN de TA29 e do seu fragmento ClaI no pTA29S3, do Exemplo 1.

A fig. 2 representa a sequência de cADN do fragmento PstI do gene TA29, do Exemplo 2.

A fig. 3 A representa a sequência de ADN e a sequência amino-ácida do gene TA29, desde o sítio ClaI até ao sítio Hind III. Por cima das sequências indicam-se os locais de restrição importantes e por debaixo das sequências indica-se a sequência de aminoácidos codificada por ORF. Também se indicam:

-do nucleótido ("nt") 1446 ao 1452:
compartimento TATA (asteriscos),

-no nt 1477: sítio de início de transcrição do
mARN de TA29 (asteriscos),

-do nt 1514 ao 1537: a sequência 3'-5' de oligómero
de síntese, conforme descrito no Exemplo 2 e

- do nt 1940 ao 2296 (entre setas): a sequência de
alinhamento do cADN de TA29.

A fig. 3B apresenta o alinhamento de cADN de TA13 (linha do topo) e do cADN de TA29 (linha ao fundo), conforme discutido no Exemplo 4. Indicam-se os nucleótidos homólogos por linhas verticais.

A fig. 3C representa a sequência do ADN de TA26, conforme discutido no Exemplo 4; o ORF encontra-se sublinhado.

A fig. 4A indica de um modo esquemático a construção do vector pMB2 do Exemplo 3.

A fig. 4B representa o mapa do vector pMB3 do Exemplo 3.

A fig. 5 representa um mapa do vector pTMM3 do Exemplo 5.

A fig. 6 representa um mapa do vector pTMM4 do Exemplo 7.

A fig. 7A representa o mapa do vector pTMM6 do Exemplo 9.

A fig. 7B representa um mapa do vector pTMM6A do Exemplo 11.

A fig. 8 representa um mapa do vector pTMMB do Exemplo 12.

A fig. 9A representa um mapa do vector pTVEP1 do Exemplo 14.

A fig. 9B representa um mapa do vector pTVEP2 do Exemplo 14.

A fig. 10 A representa um mapa do vector pTVEP63 do Exemplo 16.

A fig. 10 B representa um mapa do vector pTVEP62 do Exemplo 16.

A fig. 11 representa uma fotografia de flores de plantas do tabaco normais comparadas com flores de plantas do

tabaco transformadas com o ADN de esterilidade masculina do exemplo 9.

A fig. 12 representa uma fotografia de um corte transversal de uma antera de uma planta do tabaco normal comparada com uma antera da planta do tabaco transformada com o ADN de esterilidade masculina do Exemplo 9 (amplificação: 250 x).

Salvo indicação em contrário, todos os procedimentos para se efectuarem as manipulações de ADN recombinante realizam-se de acordo com métodos normalizados descritos por Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. Depositaram-se no Deutsche Sammlung Für Mikroorganismen und Zellculturen ("DSM"), Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, República Federal da Alemanha ao abrigo do Tratado de Budapeste: os plasmídeos e vectores seguintes, utilizados nos Exemplos:

Plasmídeo ou vector	Nº de Depósito no DSM	Data
pMB3	4470	21 Março 1988
pGSC1600	4467	21 Março 1988
pGCC1700	4469	21 Março 1988
pGV2260	2799	Dezembro 1983
pGSC1701A	4286	22 OUT. 1987
pTTM4	4471	21 Março 1988
pMAC5-8	4566	25 Abril 1988
pTTM6	4468	21 Março 1988

EXEMPLO 1 - Subclonagem de um gene específico de uma antera
(o "gene TA29")

Obteve-se do Professor Robert Goldberg da University of California, Los Angeles (UCLA) : um cADN (cADN de "TA29") específico das anteras da Nicotiana tabacum clonada como um fragmento PstI no pBR329 (Covarrubias e Bolivar, Gene 17, 1982, 79), por prolongamento GC; e o clone genómico correspondente ("lambda TA29"), que se isolou a partir da biblioteca genómica de N. tabacum "Samsun" utilizando o cADN TA29 como uma sonda e que se inseriu no sítio EcoRI do fago vector lambda cH32 (Loenen e Blattner, Gene 26, 1983, 171). O cADN TA29 possuía uma extensão de 365 pares de bases ($\pm$ 0,4 Kb) e hibridou-se com um mARN específico do tapetum de 1 100 nucleótidos que representa 0,24% do mARN de poli A⁺ das anteras de N. tabacum. Conforme se mostra na Fig. 1, TA.29 lambda contém dois fragmentos EcoRI, medindo a inserção total 13,2 Kb.

Subclonou-se um fragmento interno de ClaI de 7,5 Kb, conforme se indica na Fig. 1, contendo o gene TA29, a partir de TA29 lambda, no pLK31 (Botterman e Zabeau DNA 6, 1987, 6) que produziu um plasmido denominado "pTA29S3". Fragmentos de lambda TA29 ligados a nitrocelulose e digeridos com a combinação de EcoRI/ClaI/HindIII-EcoRI e a combinação de ClaI-EcoRI e hibridados contra cADN de TA29, indicaram a presença de sequências homólogas do cADN de TA29.

EXEMPLO 2 - Determinação da sequência de nucleótidos do cADN de TA29 e da sua sequência homóloga a partir do pTA29S3:
Cartografia do gene TA29 e do seu promotor.

Efectuou-se a sequenciação completa da inserção PstI de cADN de TA29 no pBR329 (Maxam e Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA ("PNAS"), 74 , 1977, 560). Na Fig. 2 apresenta-se a sequência do cADN. Revela a presença de uma sequência de transcrição aberta sobre toda a sequência do cADN (conforme se indica).

Em seguida, determinou-se a sequência da inserção ClaI no pTA29S3 desde o sítio ClaI ao sítio HindIII (3261 pares de bases à parte). A comparação da sequência de cADN de TA29 e da sequência de pTA29S3 revelou a presença de uma sequência no pTA29S3 que era inteiramente homóloga da sequência de cADN de TA29.

A Fig. 3 apresenta a sequência do gene TA29 no pTA29S3. A sequência do pTA29S3 que é idêntica à sequência de cADN de TA29 encontra-se entre as setas na Fig. 3. Revela-se na Fig. 3 uma suposta sequência de transcrição aberta pela sequência de aminoácidos correspondente. Isto indica que o gene TA29 codifica uma proteína de 321 resíduos aminoácidos e que não se encontram presentes intrões na região de código. A extensão da sequência de transcrição aberta de 964 nucleósidos (principais) assemelha-se ao tamanho de uma transcrição presente no mRNA das anteras do tabaco, que se isolou a partir de botões novos (12-20 mm de comprimento) das flores do tabaco e ausente

no mARN que se isolou a partir das folhas das flores mais velhas (quando os botões se encontram abertos e surgem as pétalas). A extensão deste mARN é de, aproximadamente, 1 100 nucleótidos.

Existem dois codões ATG, um no nucleótido ("nt") 1527 e outro no nt 1560, que podem funcionar como codões de iniciação para a sequência de transcrição aberta, 33 nucleótidos à parte. Existe uma sequência de consenso TATA no nt 1446 presente 81 nucleótidos a montante da extremidade 5' do primeiro codão ATG (indicado pelos asteriscos na Fig.3). Para confirmar que este compartimento "TATA" faz parte do promotor do gene TA29, determinou-se a extremidade 5' do mARN de TA29. Isto efectuou-se por desdobramento do promotor (Mc Knight et al., Cell 25, 1981, 385). Com este objectivo, utilizou-se um oligómero de 24 nucleótidos, possuindo a sequência; 5' GGA GCT ACC ATT TTA GCT AAT TTC 3', uma vez que é complementar do gene TA29 desde o nt 1514 ao nt 1537, conforme se indica na Fig. 3.

Marcou-se radioactivamente este nucleótido com ^{32}P por tratamento com quinina da extremidade 5'. Depois de se ter hibridado com mARN das anteras, desdobrou-se o oligonucleótido por transcriptase inversa. Analisou-se o oligonucleótido desdobrado resultante, num gel de sequenciação, a seguir a uma progressão de sequenciação para determinar o seu tamanho exacto. Verificou-se que o fragmento possuía 61 nucleótidos de extensão. Isto indica que a iniciação de transcrição do mARN de TA29 teve lugar no nt 1477 (indicado por asteriscos na Fig. 3). Por este motivo, o gene TA29 possui um compartimento "TATA" localizado 31 nucleótidos a montante do sítio de iniciação de transcrição. O mARN contém uma sequência principal de 51 nucleóti-

dos de extensão desde o nt 1477 ao nt 1527, uma região de código de 964 nucleótidos desde o nt 1527 ao nt 2491 e uma região não codificante 3' de aproximadamente 100 nucleótidos desde o nt 2492 ao nt 2590. Neste caso, pensa-se que, em aproximadamente 92% dos genes das plantas presentemente caracterizados [Joshin, Nucleic Acids Research ("NAR") 15 (16), 1981, 6643], se utiliza o primeiro codão AUG do mRNA para iniciar a transferência. O promotor TA29 parece, por isso, encontrar-se localizado entre o sítio de restrição ClaI e o nt 1477.

EXEMPLO 3 - Construção de uma sequência promotora ("PTA29") derivada do gene TA29

Para se construírem sequências quiméricas de ADN contendo as sequências reguladoras da extremidade 5', incluindo o promotor, do gene TA29 na mesma unidade transcricional e, sob o controlo de um primeiro ADN heterólogo de esterilidade masculina, construiu-se uma sequência conforme se indica na Fig. 4, efectuando a subclonagem, de um fragmento ClaI/AccI de 2,5 Kb de pTA29S3 no sítio de ligação múltipla de AccI de pMAC 5-8 (pedido de patente de invenção europeia Nº87/402348.4). Produziu-se um vector denominado "pMB2", que se apresenta na Fig. 4, que se pode utilizar para isolar um ADN de cordão simples, para se utilizar em mutagénese comandada de um sítio.

Depois, modificou-se a sequência em redor do primeiro codão ATG, AAAATGGTA para ACCATGGTA, substituindo dois resíduos de adenina por resíduos de citosina. Esta mutação

criou a sequência CCATGG que constitui o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição NcoI. Esta mutagénese comandada de um sítio efectuou-se no pMB2 utilizando um oligonucleótido de síntese de 24 nucleótidos com a sequência seguinte:

3'GTT TAA TCG ATG GTA CCA TCG AGG 5'

O plasmídeo resultante, contendo o sítio NcoI recentemente criado, designou-se por "pMB3" e apresenta-se na Fig. 4B. Determinou-se a sequência precisa do nucleótido que abrange o sítio NcoI com o objectivo de se confirmar que esta apenas diferia da sequência 5' do gene TA29 na substituição AA--CC, originando o sítio NcoI. Designou-se por "PTA29" o fragmento ClaI--NcoI de 1507 nucleótidos de extensão.

EXEMPLO 4 - Identificação de clones de cADN obtidos a partir de outros mARNs específicos dos estames

Para demonstrar que se podiam identificar outros mARNs específicos das anteras e serem depois utilizados para se isolarem clones de cADN com propriedades análogas às do gene TA29, obtiveram-se através do Professor Goldberg da UCLA dois outros cADNs específicos das anteras do N. tabacum ("cADN de TA13" e "cADN de TA26").

O cADN de TA13 é um clone de 1 100 pares de bases que se hibridou com duas espécies de mARN de, respectivamente, cerca de 1100 e 1200 nucleótidos, os quais são específicos das células do tapetum e que abundam num estágio muito preco-

ce do desenvolvimento das anteras. Efectuou-se a sequenciação do cADN de TA13 utilizando o procedimento do Exemplo 2 e depois comparou-se com a sequência de cADN de TA29, conforme indicado na Fig. 3B. Esta comparação de sequências revelou que o cADN de TA13 e o cADN de TA29 partilhavam uma homologia de 92% e que ORF era muito rico em glicina.

Efectuou-se a clonagem do cADN de TA26 com um PstI inserido no pBR329 por múltiplo prolongamento GC. É um clone de 519 pares de bases que se hibridou com um espécie de mARN de tabaco de 580 nucleótidos, sendo este mARN específico para as células do tapetum e abundante em determinados estádios do desenvolvimento das anteras. Efectuou-se a sequenciação de todo o cADN e TA26 utilizando o procedimento do Exemplo 2, e quando se comparou com a sequência do cADN de TA29, verificou-se não existir homologia. Na Fig. 3C proporciona-se a sequência do cADN de TA26.

EXEMPLO 5 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de PTA29 e de um gene de glucoronidase

Construiu-se um plasmido designado por "pTTM3", que se apresenta na Fig. 5, por associação dos seguintes fragmentos de ADN, bem conhecidos:

1. um fragmento vector, que inclui as sequências extremas, derivado do pGSC1600;
2. uma sequência quimérica contendo a sequência

promotora de PTA29 do Exemplo 3, fundida estruturalmente com um fragmento NcoI/EcoRI de pMB3, contendo um gene de E. coli que codifica a beta-glucoronidase ["GUS (Jefferson et al., PMNAS 83, 1986, 8447; Jefferson et al., EMBO J. 6, 1987, 3901] e os sinais da extremidade 3' de um gene de octopino-sintetase ["OCS" (Dhaese et al., EMBO J. 2, 1983, 419];

3. uma sequência quimérica contendo um promotor de Arabidosis SSU ("PSSU" ou "PSSUARA"), um gene de resistência a um herbicida sfr (pedido de patente de invenção europeia Nº 87/400 544.0) e as informações da extremidade 3' de um gene 7 de ADN T [Velten e Schell, NAR 13, 1985, 6981]; e
4. uma sequência quimérica contendo o fragmento EcoRI/SacI de pGSFR401 que contém um promotor da nopalino-sintetase ("PNOS"), um gene neo que codifica a resistência a canamicina e os sinais da extremidade 3' de um gene de octopino-sintetase (pedido de patente de invenção europeia Nº: 87/400 544.0), em que pGSFR401 se designa por "pGSR4".

O pTIM3 é um vector de ADN T contendo, nas sequências das extremidades de ADN T, duas sequências quiméricas: PSSU-sfr, na qual sfr é um ADN indicador (pedido de patente de invenção europeia Nº 87/400 544.0) sob o controlo de PSSU como um segundo promotor; e PTA29-GUS é um gene de transmissão cuja expressão nas plantas e nas células das plantas sob o controlo

do promotor TA29 pode ser facilmente localizada e quantificada.

EXEMPLO 6 - Introdução de uma sequência de ADN quimérica do Exemplo 5 no Tabaco

Construiu-se uma estirpe recombinante do Agrobacterium por deslocação do pTIM3 (do Exemplo 5) a partir da E. coli para o interior do Agrobacterium C58C1 Rif^R que contém o pGV2260 (De Blaere et al., NAR 13, 1985, 4777). Efectuou-se a deslocação utilizando a E.coli HB101 contendo pRK2013 (Figurski et al., PNAS 76, 1979, 1648) como um auxiliar, conforme descrito na publicação do pedido de patente de invenção europeia Nº 0 116 718. A estirpe de Agrobacterium resultante continha um plasmido híbrido Ti, que compreendia pGV2260 e pTIM3.

Utilizou-se esta estirpe para transformar os discos das folhas do tabaco (N.tabacum Petite Havane SR1) utilizando procedimentos normalizados, conforme descrito, por exemplo, no pedido de patente de invenção europeia Nº87/400544.0. Seleccionaram-se os caules e os rebentos transformados utilizando, no meio, 5 mg/l do herbicida fosfinotricina (De Block et al., EMBO J. 6, 1987, 2513). Não se detectou actividade enzimática da beta-glucoronidase nos rebentos e caules transformados resistentes ao herbicida.

Depois, deixaram-se os rebentos transformados criarem raízes, transferiram-se para o solo da estufa e desenvol-

veram-se até florescerem. Examinaram-se as flores e descobriu-se que apenas as células do tapetum nas anteras dos estames continham actividade de beta-glucoronidase. Este facto demonstra que o propotor TA29 é capaz de comandar, selectivamente, a expressão de um gene heterólogo, tal como o gene da beta-glucoronidase, nas células do tapetum das plantas.

EXEMPLO 7 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de PTA29 e de um gene 4

Construiu-se um plasmido que se designou por "pITM4", apresentado na Fig. 6, pela associação dos seguintes fragmentos, bem conhecidos, de ADN:

1. um fragmento vector, incluindo as sequências extremas de ADN T, derivado de pGSC1700 [Cornellisen e Vandewise, NAR, 17 (1), 1989, 19-29];
2. a sequência quimérica (Nº 3) do Exemplo 5, contendo o promotor PSSU que controla a expressão do gene sfr e da extremidade 3' do gene 7 de um ADN T.
3. a sequência quimérica (Nº4) do Exemplo 5, contendo o promotor PNOS que controla a expressão do gene neo e da extremidade 3' do gene da octopino-sintetase; e
4. a sequência quimérica que contém a sequência promotora de PTA29, do Exemplo 3, estruturalmente fundida com um ADN T do gene 4 do Agrobacterium que codifica o isopentil-transferase (Akiyoshi et al., PNAS 76, 1984, 5994; Barry et al., PNAS 81, 1984, 4776) que contém os seus próprios sinais regu-

ladores de transcrição da extremidade 3'.

O pTMM4 é um vector binário de tipo ADN T contendo, nas extremidades das sequências de ADN T, as seguintes sequências químicas: PSSU-sfr e PNOS-neo nos quais os genes sfr e neo são ADNs indicadores que codificam indicadores seleccionáveis de carácter dominante para as plantas que se encontram sob o controlo de PSSU e de PNOS como promotores secundários, respectivamente; e o gene 4 de PTA29, no qual o gene 4 existe um ADN de esterilidade masculina que se encontra sob o controlo de PTA29 como um primeiro promotor e que codifica o enzima isopentenil-transferase que poderá originar um aumento na produção de citoquinina. Um acréscimo na produção de citoquinina nas células do tapetum, sob o controlo do promotor TA29, perturbará o metabolismo e a organogénese das células do tapetum.

EXEMPLO 8 - Introdução da sequência química do Exemplo 7 no Tabaco

Conforme se descreveu no Exemplo 6, introduziu-se o pTMM4 (do Exemplo 7) com deslocação da E. coli para o Agrobacterium C58C1 Rif^R. E estirpe de Agrobacterium resultante continha um plasmido Ti de tipo binário que compreendia pGV2260 e pTMM4.

Ainda de acordo com o descrito no Exemplo 6, utilizou-se esta estirpe para transformar os discos das folhas do tabaco e seleccionaram-se os caules e os rebentos transformados utilizando 5 mg/ml de fosfinotricina. Os rebentos resisten-

tes ao herbicida criaram raízes, o que demonstra que o gene 4 ainda não se expressava nas plantas transformadas.

Transferiram-se, depois, as plantas para o solo numa estufa e deixaram-se crescer até florirem. Examinaram-se as flores e não se encontraram células funcionais do tapetum nas anteras dos seus estames. Isto demonstra que o promotor TA29 é capaz de comandar, selectivamente, a expressão do gene 4 heterólogo, nas células do tapetum das plantas.

EXEMPLO 9 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de PTA29 e de um gene T1 de ARNase

Construiu-se um plasmido que se designou por "pTIM6", que se apresenta na Fig. 7A, pela associação dos bem conhecidos fragmentos de ADN, que se seguem:

1. um fragmento vector, que inclui as sequências das extremidade do ADN T, de pGSC1600;
2. a sequência quimérica (Nº3) do Exemplo 5, que contém o promotor PSSU, o gene sfr de resistência a um herbicida e a extremidade 3' do ADN T do gene 7;e
3. uma sequência quimérica que contém a sequência promotora de PTA29, do Exemplo 3, fundida estruturalmente com um gene de síntese que codifica a ARNase T1 de A. orrthyzae,
(Quaas et al., Biophosphates and their Analogues-Synthese, Structure, Metabolism and Activity,

Amesterdão, Elsevier Science Publicher B.V., 1987; Quaas et al., Eur. J. Biochem., 173, 1988, 617-622) e os sinais da extremidade 3' de um gene de nopalina-síntese ("NOS") (An et al., EMBO J., 4 (2), 1985, 277).

O PTIM6 é um vector de ADN T que contém, nas sequências das extremidades do ADN T, duas sequências quiméricas; PSSU-sfr que é um ADN indicador sob o controlo de PSSU como um segundo promotor; e o gene T1 de PTA29-ARNase, que é um ADN de esterilidade masculina sob o controlo de PTA29 como um primeiro promotor. A expressão nas células do tapetum do ADN de esterilidade masculina sob o controlo do promotor TA29 produzirá ARNase T1 que será letal para as células, uma vez que a ARNase T1 degradará as moléculas de ARN que são indispensáveis para o metabolismo dessas células.

EXEMPLO 10 - Introdução de uma sequência quimérica de ADN do Exemplo 9 no Tabaco

Conforme se descreveu no Exemplo 6, construiu-se uma estirpe de Agrobacterium recombinante por deslocação de pTIM6 (do Exemplo 9) da E. coli para o Agrobacterium C58C1 Rif^R. Utilizou-se a estirpe de Agrobacterium resultante, portadora de um plasmido Ti conjuntamente integrado, e que compreendia o pGV2260 e o pTIM6, para transformar os discos das folhas do tabaco. Seleccionaram-se os caules e os rebentos transformados utilizando 5 mg/l de fosfinotricina. O seu crescimento demonstrou

que o gene T1 de ARNase não se expressava nos caules e rebentos resistentes ao herbicida.

Os rebentos transformados criaram raízes, transferiram-se para o solo, numa estufa e desenvolveram-se até florescerem. As plantas do tabaco transformadas desenvolveram as suas flores normais excepto no que diz respeito às suas anteras. As anteras, apesar de possuírem configuração normal, abriram, espontaneamente, mais tarde, em comparação com as anteras das plantas do tabaco não transformadas (ver Fig.11). Após a discência, pouco ou nenhum pólen se libertou das plantas transformadas, e os grãos de pólen formados pelas plantas transformadas foi cerca de 50 a 100 vezes inferior em volume, aos grãos de pólen normais e eram de configuração irregular. Para além disto, a maioria dos grãos de pólen das plantas transformadas não conseguiu germinar e a eficácia de germinação do pólen das plantas transformadas foi cerca de 0 a 2% da eficácia de germinação dos grãos de pólen normais. Para além disto, as plantas transformadas não produzem quaisquer sementes por auto-polinização, nem por auto-polinização natural nem por auto-polinização efectuada manualmente.

A avaliação microscópica de uma secção transversal de camada fina de uma planta transformada demonstrou que não se havia formado uma camada de tapetum normal e que o saco polínico se encontrava vazio (ver Fig. 12). Isto demonstra que o promotor TA29 é capaz de comandar selectivamente a expressão do gene T1 heterólogo de ARNase nas células do tapetum das plantas transformadas e, que a ARNase é capaz de perturbar

suficientemente o funcionamento das células do tapetum, de modo a tornar as plantas masculinas estéreis.

EXEMPLO 11 - Introdução de um derivado de uma sequência quimérica de ADN do Exemplo 12 na colza

Construiu-se uma estirpe recombinante do Agrobacterium por deslocação do pT1M6A⁻ da E.coli para o Agrobacterium C58 Rif^R, que contém pMP90 (Konts e Schell, Mol. Gen. Genetics, 204, 1986, 383-369). O plasmido pM90 proporciona funções vir e trans e não é portador de um gene que codifica a resistência a ampicilina. Conforme se indica na Fig. 7B, o pT1M6A⁻ é um derivado de pT1M6 (do Exemplo 9), no qual se inactivou o gene da β -lactamase que codifica a resistência à ampicilina, por inserção de uma sequência de ADN no sítio ScaI do gene da β -lactamase.

Utilizou-se a estirpe recombinante de Agrobacterium (que se designou por "A3144"), e que engloba pMP90 e pT1M6A⁻, para a transformação de Brassica napus, de acordo com o procedimento de Lloyd et al., Science, 234, 1986, 464-466, e de Klimaszevska et al., Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, 1985, 183-197. Utilizou-se a carbenicilina para aniquilar A3144 após se ter efectuado a cultura simultânea. Seleccionaram-se os caules transformados com 5 mg/l de fosfotricina e 100 ~~mg~~ ^{µg}/ml de canamicina, e regeneraram-se nas plantas os caules resistentes. Após indução dos rebentos e das raízes, transferiram-se as plantas transformadas para uma estufa e

deixaram-se desenvolver até florirem. Examinaram-se as flores que apresentaram essencialmente o mesmo genótipo que se havia observado nas plantas do tabaco transformadas, que se descreveu no Exemplo 10. Isto demonstra que o promotor TA29 é capaz de comandar, selectivamente, a expressão de um gene heterólogo de ARNase T1 nas células do tapetum das plantas que não sejam tabaco, de modo a tornar essas outras plantas masculinas estéreis.

EXEMPLO 12 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de pPTA29 e de um gene Barnase

Construiu-se um plasmido que se denominou "pTIM8" e que se representa na Fig. 8, pela associação dos fragmentos de ADN, bem conhecidos, que se seguem:

1. um fragmento vector, incluindo as sequências das extremidades de ADN T, derivado de pGSC1700 (Cornelissen e Vandewiele, NAR, 17(1), 1989, 19-29) e no qual se inactivou o gene da β -lactamase (1' da Fig. 8) por inserção de uma sequência de ADN no sítio ScaI;
2. a sequência quimérica (nº3) do Exemplo 5, contendo o promotor PSSU, o gene sfr de resistência ao herbicida e a extremidade 3' do gene 7 do ADN T;
3. a sequência quimérica (nº4) do Exemplo 5, e que contém o promotor PNOS, o gene neo e a extremidade 3' do gene da oactopino-sintetase; e

4. uma sequência quimérica de ADN, contendo a sequência do promotor PTA29 do Exemplo 3, fundida estruturalmente com o gene Barnase do Bacillus amyloliquefaciens (Hartley e Rogerson, Preparative Biochemistry, 2 (3), 1972, 243-250) e a extremidade 3' do gene da nopalino-sintetase do Exemplo 9.

O pTM8 é um vector de ADN T de tipo binário que contém nas sequências das extremidades do ADN T, três sequências quiméricas: PSSU-sfr e PNOS-neo que são ADNs indicadores com PSSU e PNOS, respectivamente, como segundos promotores, e o gene Barnase de PTA29, que é um ADN de esterilidade masculina sob o controlo de PTA29, como um promotor primário. A expressão nas células do tapetum de ADN de esterilidade masculina sob o controlo do promotor TA29 produzirá, de um modo selectivo, Barnase, nas células do tapetum, pelo que esta Barnase interferirá no metabolismo dessas células.

EXEMPLO 13 - Introdução de uma sequência quimérica de ADN do Exemplo 12 no Tabaco e na colza

Conforme descrito no Exemplo 11, construiu-se uma estirpe recombinante de Agrobacterium C58C1 Rif^R contendo pMP90 (Koncz e Schell, Mol. Gen. Genetics, 204, 1986, 383-396). Utilizou-se a estirpe resultante (denominada "A3135"), englobando pMP90 e pTM8, para a transformação dos discos das folhas do tabaco e para a transformação da colza. Seleccionaram-se

os caules e raízes utilizando 5 mg/l de fosfinotricina e 100 μ g/ml de canamicina. Verificou-se, pelo seu desenvolvimento, que o gene Barnase não se encontrava expresso nos caules e nas raízes transformadas resistentes ao herbicida.

Deixaram-se desenvolver as raízes dos caules, transferiram-se para o solo numa estufa e deixaram-se desenvolver até florirem. Examinaram-se as flores do tabaco e da colza e observou-se um fenótipo para as plantas transformadas que é essencialmente o mesmo fenótipo das plantas do tabaco transformadas que se descreveu no Exemplo 10. Isto demonstra que o promotor TA29 é capaz de comandar, selectivamente a expressão do gene heterólogo de Barnase nas células do tapetum da planta, tornando-a, por esse motivo, numa planta masculina estéril.

EXEMPLO 14 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de pTA29 e de um gene que codifica a papaína

Construiu-se um plasmido designado por "pTVEPl", e que se representa na Fig. 9A, pela associação dos seguintes fragmentos de ADN bem conhecidos:

1. um fragmento vector que inclui as sequências das extremidades do ADN T derivado do pGSC1700, na qual se inactivou o gene da β -lactamase (1' da Fig. 9A) por inserção de uma sequência de ADN no sítio ScaI;
2. a sequência quimérica (nº3) do Exemplo 5, con-

tendo o promotor PSSU, o gene de resistência ao herbicida, sfr e a extremidade 3' do ADN T do gene 7.

3. a sequência quimérica (nº4) do Exemplo 5, que contém o promotor PNOS, o gene neo e a extremidade 3' do gene da octopino-sintetase; e

4. uma sequência quimérica que contém a sequência do promotor PTA29, fundida estruturalmente com:

a) um gene de papaína do fruto Carica papaya, que codifica o zimogénio da papaína que é uma endopeptidase das plantas (Cohen et al., Gene, 48, 1986, 219-227) capaz de atacar o péptido, assim como pontes de ésteres; efectuaram-se as seguintes modificações na sequência de ADN de Cohen et al. (1986) utilizando a mutagenese comandada de um sítio, conforme descrito no Exemplo 3;

i. efectuou-se a mutação do nucleótido A, na posição 1, a montante do primeiro codão ATG, no nucleótido C, no sentido de se obter um sítio de clonagem NcoI adequado:

e

ii. efectuou-se a mutação dos codões GAA respectivamente nas posições 47, 118, 135, para codões CAA que codificam a glutamina; e

b) a extremidade 3' da nopalino-sintetase do Exemplo 9.

O plasmido pTVEP1 é um vector de ADN T de tipo binário, que contém nas sequências das extremidades do ADN T três sequências quiméricas: PSSU-sfr e PNOS-neo que são ADNs indicadores que codificam indicadores dominantes seleccionáveis para as transformações das plantas, sob o controlo de, respectivamente, PSSU e PNOS como segundos promotores; e o gene da papína de PTA29 que é um ADN de esterilidade masculina sob o controlo de PTA29, como um promotor primário. A expressão nas células do tapetum do ADN da esterilidade masculina sob o controlo do promotor TA29 produzirá uma endopeptidase (o zimogénio da papína) que clivará as proteínas das células do tapetum, levando, assim, ao aniquilamento dessas células.

Também se construiu um plasmido que se designou por "pTVEP2", apresentado na Fig. 9B, pela associação dos fragmentos bem conhecidos:

1. um fragmento vector, que inclui as sequências das extremidades do ADN T derivado do pGSC1700 e no qual se inactivou o gene da β -lactamase (1' de Fig. 9B), por inserção de uma sequência de ADN no sítio ScaI;
2. a sequência quimérica (nº3) do Exemplo 5, contendo o promotor PSSU, o gene sfr da resistência ao herbicida e a extremidade 3' do ADN T do gene 7;
3. a sequência quimérica (nº4) do Exemplo 5, que contém o promotor PNOS, o gene neo e a extremidade 3' do gene da octopino-sinte-

tase; e

4. uma sequência quimérica, contendo a sequência do promotor PTA29, do Exemplo 3, fundida estruturalmente com:

a) um gene de ~~papá~~ína do fruto Carica papaya que codifica a proteína activa do zimogénio da ~~papá~~ína; efectuaram-se as seguintes modificações na sequência de ADN de Cohen et al. (1986) utilizando a mutagénese comandada de um sítio, conforme descrito no Exemplo 3:

i. efectuou-se a mutação do codão AAT que codifica Asn, a montante do primeiro resíduo de Ile da proteína activa, no codão GAT, o ~~que~~ proporciona um sítio EcoRV de clonagem adequado (GAT ATC). Fundiu-se, directamente o sítio EcoRV produzido com a sequência de pTA29, no sentido de se obter uma orientação na fusão estrutural, do promotor com a sequência que codifica a proteína activa do zimogénio da ~~papá~~ína; e

ii. efectuou-se a mutação dos codões GAA que codificam o glutamato, respectivamente nas posições 47, 118, 135, em codões CAA que codificam a glutamina; e

b) a extremidade 3' do gene da nopalino-sintetase do Exemplo 9.

O plasmido pTVEP2, tal como o pTVEP1, é um vector

de ADN de tipo binário, que contém as sequências das extremidades do ADN T, três genes quiméricos: PSSU-sfr e PNOS-neo que codificam indicadores dominantes seleccionáveis para as transformações das plantas; e o gene da papáina de PTA29 que codifica uma endopeptidase que clivará proteínas nas células do tapetum, conduzindo assim à morte destas células.

EXEMPLO 15 - Introdução de sequências quiméricas de ADN do Exemplo 14. no tabaco e na colza

Conforme descrito no Exemplo 11, deslocaram-se o pIVEP1 e o pIVEP2 da E. coli para Agrobacterium C58C1 Rif^R, separados, portadores de pMP90.

Utilizaram-se as estirpes resultantes, portadoras de pMP90 com pIVEP1 e pMP90 com pIVEP2, para transformar o tabaco e a colza, seguindo os procedimentos descritos nos Exemplos 11 e 13. Verificou-se, pelo seu desenvolvimento, que os genes de papáina não se expressavam nos caules, rebentos e as raízes transformadas resistentes ao herbicida e à canamicina.

Transferiram-se as plantas transformadas para uma estufa e desenvolveram-se no solo até florirem. Examinaram-se as flores do tabaco e da colza e observaram-se os fenótipos das plantas transformadas que eram essencialmente os mesmos que os fenótipos das plantas do tabaco transformadas que se descreveram no Exemplo 10. Isto demonstra que o promotor TA29

é capaz de comandar a expressão dos genes heterólogos da papaína no pTVEP1 e no pTVEP2, selectivamente, nas células do tapetum das plantas, tornando-as, deste modo, masculinas estéreis.

EXEMPLO 16 - Construção de uma sequência quimérica de ADN de pTA29 e de um gene que codifica EcoRI

Construiu-se, conforme se indica na Fig. 10A, um plasmido que se designou por "pTVE63", pela associação dos seguintes fragmentos já bem conhecidos:

1. um fragmento vector, incluindo as sequências do ADN T derivadas de pGCSC1701A2 (pedido de patente de invenção europeia nº 87/115985.1);
2. a sequência quimérica (nº3) do Exemplo 5, que contém o promotor PSSU, o gene sfr de resistência ao herbicida e a extremidade 3' do ADN T do gene 7;
3. a sequência quimérica (nº4) do Exemplo 5, que contém o promotor PNOS, o gene neo e a extremidade 3' do gene da octopino-sintetase;
4. uma sequência quimérica contendo a sequência do promotor de pTA29, do Exemplo 3, fundida estruturalmente com:
 - a) um gene que codifica a endonuclease de restrição EcoRI de uma E.coli (Green et al., J.

Biol. Chem., 256, 1981, 2143-2153; Botterman e Zabeau, Gene, 37, 1985, 229-239) e capaz de reconhecer e clivar a sequência alvo GAATTC num ADN de cordão duplo; efectuaram-se as mutações que se seguem, na sequência de ADN de Green et al. (1981), utilizando a mutagénese comandada de um sítio, conforme se descreveu no Exemplo 3:

- i. substituíram-se os nucleótidos do codão de iniciação ATG por ATGCA, criando um sítio NsiI no codão de iniciação e dando origem às seguintes sequências de nucleótidos:

ATGCA, TCT, AAT ...; e

- ii. clonou-se o fragmento HindII - HindIII do gene EcoRI clonado no pEcoRI2 (Botterman e Zabeau, 1985) no vector de mutagénese dirigida de um sítio de pMAC5; e

- b) a extremidade 3' do gene da nopalino-sintetase do Exemplo 9; e

- 5. um gene que codifica uma metilase EcoRI sob o controlo do seu promotor natural (Botterman e Zabeau, Gene 37, 1985, 229-239) que é susceptível de inibir a actividade de EcoRI na E. coli ou no Agrobacterium, no sentido de subjugar a potencial fuga de expressão do gene de EcoRI nos microrganismos.

O plasmido pTVE63 é um vector de ADN T de tipo binário que contém nas sequências das extremidades do ADN T, três sequências quiméricas: PSSU-sfr e PNOS-neo que são ADNs

indicadores sob o controle de PSSU e de PNOS, respectivamente, como segundos promotores; e de um gene PTA29-EcoRI, que é um ADN de esterilidade masculina sob o controle de PTA29 como um primeiro promotor. A expressão do ADN de esterilidade masculina sob o controle do promotor TA29 nas células do tapetum produzirá a endonuclease de restrição EcoRI que clivará o ADN de cordão duplo nos sítios GAATTC (ver para análise dos sistemas de modificação de restrição de tipo II: Wilson, IIG 4 (11), 1988, 314-318) das células do tapetum, conduzindo, deste modo, à morte destas células.

Construiu-se, também, um plasmido, denominado pIVE62, que se representa na Fig. 10B, pela associação dos seguintes fragmentos bem conhecidos:

1. um fragmento vector que inclui as sequências das extremidades de ADN T, derivado do pGSC1701A2;
2. a sequência quimérica (nº3), do Exemplo 5, contendo o promotor PSSU, o gene *sfr* de resistência ao herbicida e a extremidade 3' do ADN T do gene 7;
3. a sequência quimérica (nº4) do Exemplo 5, que contém o promotor PNOS, o gene *neo* e a extremidade 3' *neo* do gene da octopino-sintetase;
4. uma sequência quimérica que contém a sequência do promotor pTA29, do Exemplo 3, fundida estruturalmente com um fragmento de um gene que codifica o péptido de transporte da Mn-superóxido-dismutase ("Mn-SOD") que é um fragmento NcoI-PstI de um fragmento HpaI-HindIII de pSOD1 (Bowler et al., Embo J.,

8, 1989, 31-38); efectuaram-se as modificações seguintes na sequência de ADN, de Bowler et al., utilizando uma mutagénese comandada de um sítio, conforme se descreveu no Exemplo 3:

- i. substituíram-se os nucleótidos AA localizados a montante nas posições -1 e -2 do codão de iniciação ATG, por nucleótidos CC, criando um sítio NcoI no codão de iniciação e proporcionando as seguintes sequências de nucleótidos:

- CCATGGCACTAC

NcoI

- ii. modificaram-se os nucleótidos T, TCG, CTC, localizados imediatamente a jusante do sítio de processamento do péptido de transporte, para C, TGC, AGC, criando um sítio PstI atrás do sítio de processamento e proporcionando as sequências de nucleótidos seguintes:

CTC, CGC, GGC, ^LTTG, ^QCAG, ^TACC, ^FTTT, ^STCG, ^LCTC

CTC, CGC, GGC, TTG, CAG, ACC, TTC, TGC, AGC...

PstI

nas quais a seta indica o sítio de processamento da sequência do péptido de transporte e a linha superior indica a sequência de aminoácidos que corresponde à sequência de código de Mn-SOD; também se fundiu estruturalmente o fragmento NcoI-PstI com um gene que codifica a endonuclease de restrição EcoRI de E.coli (Greene et al., J. Biol.Chem.

256, 1981, 2143-2153 ; Botterman e Zabeau, Gene, 37, 1985, 229-239) e capaz de reconhecer e de clivar a sequência alvo GAATTC num ADN de cordão duplo, como se observa no pIVE63; e

b) a extremidade 3' do gene da nopalino-sintetase do Exemplo 9; e

5. um gene que codifica a EcoRI metilase sob o controlo do seu promotor natural (Botterman e Zabeau, 1985) que é capaz de inibir a actividade de EcoRI na E.coli ou no Agrobacterium, no sentido de se superar a potencial fuga de expressão do gene de EcoRI nos microrganismos, sendo este gene inserido no fragmento vector foradas sequências das extremidades.

O plasmido pIVE62 é um vector de ADN I de tipo binário que contém, nas sequências das extremidades, três sequências quiméricas: PSSU-sfr e PNOS-NPTII que são ADNs indicadores sob o controlo, respectivamente, de PSSU e de PNOS, como segundos promotores; e o gene da endonuclease EcoRI do péptido de transporte pTA29 que é um ADN de esterilidade masculina que possui pTA29 como um primeiro promotor e uma sequência que codifica o péptido de transporte entre elas. A expressão do ADN de esterilidade masculina, sob o controlo do promotor TA29, nas células do tapetum produzirá uma endonuclease de restrição que será projectada para o interior das mitocôndrias das células do tapetum e clivará o ADN de cordão duplo nos sítios GAATTC, nessas células. Isto conduzirá à morte destas células.

EXEMPLO 17 - Introdução de sequências quiméricas do ADN do
Exemplo 16 no tabaco e na colza

Conforme se descreveu nos Exemplos 11 e 15, deslocou-se o pIVE62 e o pIVE63 da E.coli para o Agrobacterium C58C1 Rif^R portador de pMP90. Utilizaram-se as estirpes resultantes, portadoras de pIVE62 com pMP90 e pIVE62 com pMP90 para transformar o tabaco e para transformar a colza, de acordo com os procedimentos descritos nos Exemplos 11 e 13. Verificou-se, através do crescimento das plantas, que os genes da endonuclease EcoRI não se encontravam expressos nos caules, rebentos e raízes resistentes aos herbicidas e a canamicina.

Transferiram-se as plantas transformadas para uma estufa e deixaram-se desenvolver no solo até florirem. Examinaram-se as flores do tabaco e da colza e observaram-se os fenótipos das plantas transformadas, que eram essencialmente os mesmos das plantas transformadas do tabaco e da colza, descritos no Exemplo 10. Isto demonstra que o promotor TA29 é capaz de comandar, de um modo selectivo, a expressão do gene heterólogo da endonuclease EcoRI nas células do tapetum das plantas transformadas com pIVE62 e com pIVE63, tornando-as, deste modo, masculinas estéreis.

Escusado será dizer que a presente invenção não se limita à transformação de qualquer (quaisquer) planta(s) específica(s). A presente invenção refere-se a qualquer planta cujo genoma nuclear pode ser transformado com um ADN de esterilidade masculina sob o controlo de um primeiro promotor que pode comandar, de um modo específico, a expressão das células dos

estames das plantas, pelo que a planta pode ser polinizada por auto-polinização e polinização cruzada. A presente invenção refere-se, por exemplo, a plantas como as plantas da batata, do tomate, da colza, da alfafa, do girassol, do algodão, do aipo, da cebola, dos cereais, da soja, do tabaco, das couves e da beterraba.

A presente invenção também não se limita aos vectores e plasmidos específicos descritos nos Exemplos anteriores, mas abrange antes quaisquer plasmidos e vectores que contenham ADN de esterilidade masculina sob o controlo do primeiro promotor.

Além disso, a presente invenção não se limita aos promotores específicos descritos nos Exemplos anteriores, tal como o promotor TA29, abrange mais precisamente qualquer sequência de ADN que codifique um promotor capaz de comandar, de um modo selectivo, a expressão do ADN de esterilidade masculina nas células dos estames. Nesta situação, a presente invenção abrange a sequência de ADN do promotor TA29 da Fig. 3A, assim como quaisquer sequências de ADN equivalentes, tais como a do promotor TA13 da Fig. 3B e de TA26 da Fig. 3C, que se podem utilizar para controlar, de um modo selectivo, a expressão do ADN de esterilidade masculina nas células do tapetum das plantas. No entanto, pensa-se que as sequências de ADN de TA29, TA26 e TA13 podem ser modificadas por:

- 1) substituição de alguns códões por outros que codificam os mesmos aminoácidos ou por outros aminoácidos; e/ou
- 2) eliminação ou adição de alguns códões; desde que tais modificações não alterem substancialmente as propriedades

do promotor codificado para o controlo da expressão de uma esterilidade masculina específica do tapetum.

Para além disto, a presente invenção não se limita aos ADNs de esterilidade masculina descritos nos Exemplos antecedentes, mas abrange, de um modo mais preciso, qualquer sequência de ADN que codifique um primeiro ARN, proteína ou polipéptido que perturbem significativamente o metabolismo, funcionamento e/ou desenvolvimento de uma célula do estame na qual é produzida, sob o controlo de um primeiro promotor.

A presente invenção não se limita, ainda aos ADNs indicadores específicos descritos nos Exemplos precedentes, mas abrange, de um modo mais preciso, qualquer sequência de ADN que codifique um segundo ARN, proteína ou polipéptido que confere, pelo menos, a um tecido específico de uma planta ou a células específicas das plantas, nas quais se expressa essa sequência de ADN, características distintas quando comparadas com um tecido específico da planta ou com células específicas da planta, nas quais esta sequência não se encontra expressa.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Célula de uma planta, cujo genoma nuclear é transformado com uma sequência de DNA estranha, de preferência uma sequência de DNA quimérica estranha, caracterizada pelo facto de incorporar:

a) um DNA de esterilidade masculina que codifica um primeiro RNA, proteína ou polipeptído o qual, quando produzido ou sobreproduzido numa célula de estame da planta referida, perturba significativamente o metabolismo, o funcionamento e/ou o desenvolvimento da referida célula de estame; e

b) um primeiro promotor susceptível de orientar a expressão do referido DNA de esterilidade masculina nas células dos estames da planta referida, de preferência em células de antera, pólen e/ou filamento, particularmente em células de tapetum e/ou epidérmicas de antera; estando o referido DNA de esterilidade masculina na mesma unidade transcricional, e sob o controlo, do referido primeiu

ro promotor.

2.- Célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a referida sequência de DNA estranha incluir também, de preferência no mesmo sítio genético que o referido DNA de esterilidade masculina:

c) um DNA marcador que codifica um segundo RNA, proteína ou polipeptídeo qual, quando presente pelo menos num tecido específico ou pelo menos em células específicas da referida planta, torna a referida planta facilmente separável de outras plantas que não contêm o segundo RNA, proteína ou polipeptídeo pelo menos nas referidas células ou tecido específico; e

d) um segundo promotor susceptível de orientar a expressão do referido DNA marcador pelo menos no referido tecido ou células específicas; estando o referido DNA marcador na mesma unidade transcricional, e sob o controlo, do referido promotor.

3.- Célula de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo facto de a referida sequência de DNA estranha incorporar adicionalmente:

e) um primeiro DNA que codifica um péptido de transição susceptível de transportar a primeira proteína ou polipeptídeo para um cloroplasto ou mitocondria da referida célula de estame; estando o referido primeiro DNA na mesma unidade transcricional que o referido DNA de esterilidade masculina e referido o primeiro promotor e entre o referido DNA de esterilidade masculina e o referido

primeiro promotor;

e/ou

f) um segundo DNA que codifica um péptido de transição susceptível de transportar a referida segunda proteína ou polipeptido para um cloroplasto ou mitocondria de pelo menos o referido tecido específico ou células específicas; estando o segundo DNA na mesma unidade transcricional que o referido DNA marcador e o referido segundo promotor e entre o referido DNA marcador e o referido segundo promotor.

4.- Célula de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo facto de o referido DNA de esterilidade masculina codificar: uma RNase, particularmente RNase T1 ou Barnase; uma DNase, especialmente uma endonuclease, particularmente ECORI uma protease, especialmente uma papaína, particularmente Zimogeno de papaína ou proteína activa de papaína; uma glucanase; uma lipase, particularmente fosfolipase A₂; uma peroxidase lipídica; um inibidor de parede da célula; uma toxina bacteriana; ou um ribozimo, particularmente o ribozimo contra mRNA codificado pelo gene TA29, o gene TA26 ou o gene TA13; ou é um DNA anti-sentido, particularmente o DNA anti-sentido do gene TA29, do gene TA26 ou do gene TA13.

5.- Célula de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo facto de o DNA de esterilidade masculina

codificar um enzima que catalisa a síntese de uma fito-hormona, particularmente um enzima codificado pelo gene 1, gene 2 ou gene 4 do DNA de Agrobacterium T.

6.- Célula de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 5, caracterizada pelo facto de o referido DNA marcador ser: um gene de resistência herbicida, particularmente um gene sfr ou sfrv; um gene que codifica um enzima alvo modificado para um herbicida com uma afinidade menor para o herbicida, particularmente uma 5-enol-piruvilshiquimato-3-fosfato-sintase como um alvo para glifosato ou uma glutamina-sintetase modificada como um alvo para um inibidor de glutamina-sintetase tal como fosfinotricina; um gene que codifica uma proteína ou um polipeptido que confere uma cor pelo menos ao referido tecido específico ou às células específicas, particularmente o gene Al ou o gene GUS; um gene que codifica uma proteína ou um polipeptido que confere uma tolerância de tensão à planta referida, particularmente o gene que codifica Mn-superóxido-dismutase; ou um gene que codifica uma proteína ou polipeptido que confere uma resistência às doenças ou pestes, particularmente um gene que codifica uma endotoxina de Bacillus thuringiensis que confere resistência aos insectos ou um gene que codifica um peptido bacteriano que confere uma resistência bacteriana.

7.- Células de acordo com uma qualquer das reivindica-

ções 1 a 6, caracterizada pelo facto de o referido primeiro promotor ser PTA29, PTA26, PTA13 ou um promotor de um DNA que codifica um mRNA específico de tapetum hibridizável em TA29, TA26 ou TA13.

8.- Célula de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 7, caracterizada pelo facto de o referido segundo promotor ser: um promotor fundamental, particularmente um promotor 35S, um promotor 35S'3, um promotor PNOS ou um promotor POCS; um promotor indutível nos tecidos feridos, particularmente um promotor TR1' ou TR2'; um promotor que orienta a expressão de gene selectivamente num tecido de plantas possuindo actividade fotossintética, particularmente um promotor SSU; ou um promotor que orienta a expressão de gene selectivamente nas células das folhas, pétalas ou sementes, particularmente células de revestimento de sementes.

9.- Vector adequado para transformar uma célula de uma planta, particularmente uma planta susceptível de ser infectada com Agrobacterium, caracterizado pelo facto de ser constituído por a referida sequência de DNA estranha de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, particularmente PTTM4, PTTM6, PTTM6A⁻, PTTM8, PTVEP1, PTVEP2, PTVE62 ou PTVE63.

10.- Processo para a produção de uma planta estéril masculina e material de reprodução da planta referida, tendo a referida sequência de DNA estranho de acordo com uma qualquer das

reivindicações 2 a 8 estavelmente integrada no genoma nuclear das suas células, pelo que o referido DNA de esterilidade masculina é susceptível de ser expresso selectivamente nas células de estame da referida planta para produzir o referido primeiro RNA, proteína ou polipeptido nas células de estame e podendo assim o referido DNA marcador ser expresso em pelo menos o referido tecido específico ou células específicas da referida planta para a tornar separável das plantas não transformadas, caracterizado pelo facto de possuir os seguintes passos não biológicos: a) transformação de uma célula da referida planta por introdução da sequência de DNA estranho no genoma nuclear da referida célula; e depois b) regeneração da referida planta e dos materiais de reprodução a partir da célula referida.

11.- Cultura de células de planta, caracterizado pelo facto de conter a célula de planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8.

12.- Planta, particularmente milho, batata, tomate, colza, alfafa, girassol, algodão, aipo, cebola, trevo, soja, tabaco, vegetais do tipo brassicáceas ou beterraba sacarina, caracterizada por incluir a célula da planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8.

13.- Semente, caracterizada pelo facto de pertencer a uma

planta de acordo com a reivindicação 12.

14.- Processo para produzir uma semente híbrida, caracterizado pelo facto de incluir os seguintes passos:

a) polinização cruzada i) de uma planta estéril masculina que contém a sequência de DNA estranho de acordo com uma qualquer das reivindicações 2 a 8, incluindo tanto o referido segundo promotor como o referido DNA marcador, especialmente o DNA marcador que confere uma resistência ao herbicida, particularmente um gene sfr ou sfrv, estavelmente integrado no genoma nuclear das células da referida planta estéril masculina, com ii) uma planta fértil masculina homozigótica sem o referido DNA marcador, especialmente sem o referido DNA marcador que confere a referida resistência herbicida; e depois b) separação da referida planta fértil masculina da referida planta estéril masculina tirando vantagem da ausência de expressão do referido DNA marcador pelo menos no referido tecido específico ou células específicas da referida planta fértil masculina.

15.- Processo para produzir uma semente híbrida de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de a referida planta estéril masculina conter pelo menos dois DNAs marcadores diferentes estavelmente integrados no genoma nuclear das suas células e por a referida planta fértil masculina conter um, mas não o outro, dos dois referidos DNAs marcadores; e por a referida

4.

planta fértil masculina ser separada da referida planta estéril masculina tirando vantagem da ausência de expressão do outro DNA marcador pelo menos no referido tecido específico ou células específicas da referida planta fértil masculina; conferindo de preferência o outro DNA marcador uma resistência a um herbicida.

16.- Semente híbrida, caracterizada pelo facto de ser obtida pelo processo de acordo com a reivindicação 14 ou 15.

17.- Planta híbrida, caracterizada pelo facto de ser obtida pelo desenvolvimento da semente híbrida de acordo com a reivindicação 16.

18.- Primeiro promotor de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de ser um PTA29, PTA26, PTA13 ou um promotor de um DNA que codifica para um mRNA específico de tapetum hibridizável para TA29, TA26 ou TA13.

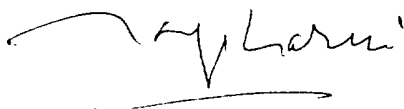
19.- Sequência de DNA quimérica estranha de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo facto de o referido DNA de esterilidade masculina não estar naturalmente sob o controlo do primeiro promotor e/ou não estar naturalmente no mesmo sítio genético que o referido DNA marcador.

20.- Processo para produzir plantas e material de reprodução, tal como sementes, das referidas plantas incluindo um material genético estranho estavelmente integrado num seu genoma nuclear

e susceptível de ser expresso como um RNA, proteína ou polipeptido, incluindo os seguintes passos não biológicos: a) produção de células de plantas transformadas ou tecidos de plantas incluindo o referido material genético estranho de células de plantas de partida ou tecidos de plantas que não exprimem o referido RNA, proteína ou polipeptido, b) produção de plantas regeneradas e/ou material de reprodução das referidas plantas a partir de células de plantas transformadas ou tecidos de plantas que incluem o referido material genético estranho, e c) eventualmente, replicação biológica das referidas plantas regeneradas e/ou material de reprodução; em que o referido passo de produção de células de plantas transformadas ou tecidos de plantas incluindo o referido material genético estranho é caracterizado pelo facto: de se transformar o genoma nuclear das referidas células de planta de partida ou tecidos de plantas com uma sequência de DNA estranha de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 8, bem como elementos reguladores que são susceptíveis de permitir a expressão da sequência de DNA estranho nas referidas células de plantas ou tecidos de plantas, para proporcionar a integração estável da sequência de DNA estranho em células de planta transformadas ou tecidos de plantas, bem como em plantas e material de reprodução produzido através de gerações subsequentes,

Lisboa, 28 de Abril de 1989

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O

"Processo para a produção de uma planta estéril masculina
e material de reprodução da referida planta"

Planta, cujo genoma nuclear é transformado com uma sequência de DNA estranho que codifica um produto que perturba selectivamente o metabolismo, o funcionamento e/ou desenvolvimento de células de estames da planta. A sequência de DNA estranho também codifica eventualmente um marcador.

Lisboa, 28 de Abril de 1989

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



FIG.1

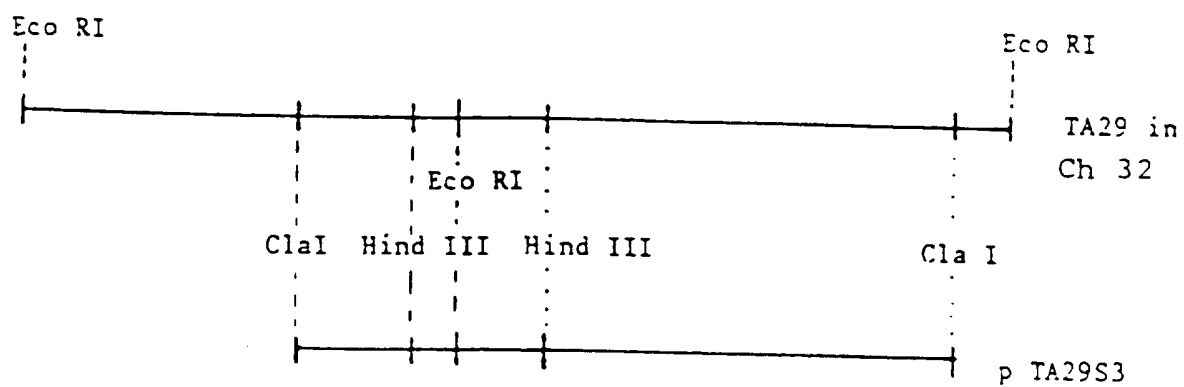


Fig. 2

27 54
CAA TCC GCT AGA CTA TAC CGT TGC AAG CCA GGG CCA AAT ATG TGT GAC AGT AAA
Q S A R L Y R C K P G P N M C D S K

81 108
GAC TGT AAT GAG CTT CTC CTA CAC TTT GTT TTC CCA ATG CAA GAC AAA CAT GAC
D C N E L L L H F V F P M Q D K H D

135 162
AAT AAA CAA GAA CAT CTA AGA TAT GGA GGA CGC CGA GGT ATA GGT CTC ACT GTG
N K Q E H L R Y G G R R G I G L T V

189 216
GGA GGA GTT GGC GGT TTT GGA ATT GGT TTT GGT CCT TGG GGT GGT GGT GGT GGC
G G V G G F G I G F G A W G G G G G

243 270
GGA GGA GGT GGT GGT TCT GAT GCC CCT GGT TGT AGT AAC GAT GGC TGT GAC CCT
G G G G G S D A P G C S N D G C D P

297 324
GGT TTT GGC TGT CCC CCG GGC TGT GGT TAT GCA TGT CCT GCC AAC AAT CCT AGT
G F G C P P G C G Y A C P A N N P S

351
GGA GGA ATA ACT GAA TTC CAT ATC TCA GGA TTG TTG GCA
G G I T E F H I S G L L A

Figura 3A

ClaI

GTTTGACAGCTTATCATOGATTATATTAGGGATTTTACACAAATAGOOGGCTATA 56

TTAATTGTTTACTTTTTCTAACCATATACATAGATTATACATTGATTATACATGAATTATACACATTTAAT 126

ATATAAATTATGCATATAATATACATTGCTGGTTAATTTTAGTTTAAAGTTATAGGGTGGGAGGCTATTT 196

GGATTAAATCTTTATTATATTAAATATTTAOGAATTTTGGTGTGACGGTGTAAATCATATGTATTGATA 266

CTTGTGTCTCTTTTATTAAATTTTAGTGATTAGATTTOOCTAGAACTAOCATATGCTGTTTTTAGGTTT 336

GTATAATATGAGAAAAGTTTATTTTAGTOGCTTCCAAATATATATTATATACTTTCTCOGGTCCACAA 406

TAAGTGATTTTTTGGTTGTTTTACACAGATTAAGAAATTCACATTTTAAACATTAAATAGCAATGAAAT 476

GATCATATTAACCTTTACTATTTCTTCACATAAACATTTCTAACACATACTCCAAACOCATTTACTCCAA 546

GGGCACTGTAGTAAAAAATAATTAAATCATTTTGTAAATCTAAAAAATCACTTATTTTGGACCATAAA 616

AAAAGGGCCAAAAATAACTTATTGTGGACGGGAGAGAGTAATACACTTTTTTGGTTAGOGAATGCCAATTA 686

ATTTAGACATTGTGTTATGTTCCAGTTAAOOGCTTTOOCTGCACCTCTTTCAATCTATCTCTOGATAGAAA 756

ATTGTGATACTTTGOGACTTCTATCAGAGGACTTTTTGTTTTCCATGTAACAATCTGTCAATTTGGATGG 826

GGAGATTTGCACAAATAGGCTAATTTATGTGTCCCAATTTAAATTTTAAOCCCATGTGATCAGAACTTAG 896

CCAOGAGCACCAGAAGTTTGATGGATATGTGACTTTGTCACTATCCGGTTTACTAATCAAGAGCTATTTT 966

TATTCAAAATTGGATATCTAGCTAAGTATAACTGGATAATTTGCATTAACAGATTGAATATAGTGCCAAA 1036

CAAGAAGGGACAATTGACTTGTCACTTTATGAAAGATGATTCAAACATGATTTTTTATGTACTAATATAT 1106

ACATCTACTCGAATTAAAGOGACATAGGCTCGAAGTATGCACATTTAGCAATGTAAATTAAATCAGTTT 1176

TTGAATCAAGCTAAAAGCAGACTTGCATAAGGTGGGTGGCTGGACTAGAATAAACATCTTCTCTAGCACA 1246

GCTTCATAATGTAATTTCCATAACTGAAATCAGGGTGAGACAAAATTTTGGTACTTTTTTCTCACAATAA 1316

GTOCATGTTTGCAACAAATTAATACATGAAOCTTAATGTTAOCCTCAGATTAGOOTGCTACTOCCCAAT 1386

TTCTCTGAAATGCTOCAAACAAAAGTTAGTTTTGCAAGTTGTTGTGTATGTCCTGTGCTCTATATATGOOC 1456

*

TTGTGGTGCAAGTGTAACAGTACAACATCATCACTCAAATCAAAGTTTTTACTTAAAGAAATTAGCTAAA 1526

TACCATOGAGG

HindIII

ATGGTAGCTOCAAATGGGTTTTCAATTTCTTTTATGATTTTGCTAAGCTTAGCAATATGCTCTGGCCAGC 1596

M V A P K W V F I S F M I L L S L A I C S G Q P

CTGTTAOCCTCTGATGCAATTAAGGCTAAGGAAGCTGATCATGACAAOCTCAAAGCTCACACTCTGAGTAA 1666

V T S D A I K A K E A D H D N L K A H T L S N

TATOGACGCCAAAGGCTTTGGAGGAGGOGGTGGATTGGCATTTGGTGGTGGTGGGGOOGGTGGTGGTGA 1736

I D A K G F G G G G G F G I G G G W A G G G G

GGTGGTGGAGATGGTGGTGGTTCTGACAOOCTAACTAOGGTTATAAOCTGGCTGCAGTATOCATGGTT 1806

G G G D G G G S D T P N Y G Y N P G C S I H G C

GCACTGTCCCTGGCTTTGGTTTTCTAOCCTAAAOCTGTCTTTGGTGTCCAGTCTAATCCOCTGGTTGTGG 1876

T V P G F G F L P K P V F G V P V Y S P G C G

Figura 3 A (continuação)

cDNA clone TA29 --> ACAATCC

CTATGTGTGTGTOGGGOGATATTOCTACTGGAGGAATGACTGAATOCAAAATOCAGGAATATCACAATCC 1946
Y V C P A D I P T G G M T E S K I T G I S Q S

GCTAGACTATAACGGTTGCAAGOCAGGGOC AAAATATGTGTGACAGTAAAGACTGTAATGAGCTTCTOCTAC
GCTAGACTATAACGGTTGCAAGOCAGGGOC AAAATATGTGTGACAGTAAAGACTGTAATGAGCTTCTOCTAC 2016
A R L Y R C K P G P N M C D S K D C N E L L L H

ACTTTGTTTTTCCCAATGCAAGACAAACATGACAATAAACAAGAACATCTAAGATATGGAGGAAGGCGAGG
ACTTTGTTTTTCCCAATGCAAGACAAACATGACAATAAACAAGAACATCTAAGATATGGAGGAAGGCGAGG 2086
F V F P M Q D K H D N K Q E H L R Y G G R R G

TATAGGTCTCACTGTGGGAGGAGTTGGGGTTTTTGGAAATGGTMTTGGTGCTTGGGGTGGTGGTGGTGGC
TATAGGTCTCACTGTGGGAGGAGTTGGGGTTTTTGGAAATGGTMTTGGTGCTTGGGGTGGTGGTGGTGGC 2156
I G L T V G G V G G F G I G F G A W G G G G G

GGAGGAGGTGGTGGTCTCTGATGCCCCCTGGTTGTAGTAAOGATGGCTGTGACCCCTGGTMTTGGCTGTCCCC
GGAGGAGGTGGTGGTCTCTGATGCCCCCTGGTTGTAGTAAOGATGGCTGTGACCCCTGGTMTTGGCTGTCCCC 2226
G G G G G S D A P G C S N D G C D P G F G C P P

EcoRI

CGGGCTGTGGTTATGCAATGTCTGCCAACAATCTAGTGGAGGAATAACTGAATTCCATATCTCAGGATT
CGGGCTGTGGTTATGCAATGTCTGCCAACAATCTAGTGGAGGAATAACTGAATTCCATATCTCAGGATT 2296
G C G Y A C P A N N P S G G I T E F H I S G L

<— end cDNA clone TA29

ATCAOGAATTOGATGGAOCTTACAGATGTAGGOCAGATATGTGTGAAAGTGAAGATTGTAATGAACTTCTT 2366
S R F D G P Y R C R P D M C E S E D C N E L L

CTACACTTTGTTTTCTOCAATGCAACACAAACATGAGAAOOGACATGATCATATAGTAGAAAGGAGTGATG 2436
L H F V S P M Q H K H E N R H D H I V E R S D E

AGGAGGAAGCGCATCATCAGTCAAAGCAGCATAAAGAOGAAGACATCATAAACTAGGCTCTOCCACAAAC 2506
E E A H H Q S K Q H K D E D I I N *

CAAAAAAAAGGAACTATATATGTAGCTTCAGOCAAAAAACTGTATACACTGTCTAAGAATACTCACTTC 2576

CAAGCACTTAAATAAACTAGTTTACAGTGGATTGGGATATAATCAGTTGGACAATTGCTAAACCTCC 2646

TCATGCACTGTAAAAATAGACTTGCTACTAGTATTTGGAATATAATGCTGAATATATTTGTTGTACTTT 2716

GOCTAATGTCAATCAGCAATCAGCAATTTCTCTGTAGTTAGAAAATGAAAGGAAGAATCAGGAACCTCAT 2786

ATTTAAAGGTGAAATAATTTAAAGATOGOGAAGCAGTCACAATTTAATAGTACCAGGAAAATAATCTAT 2856

AGGAATCACAGAACTTTTTGATTTATCAAATTAAGGAAGCAACTGGGAAAATGTGAAATGAATGAACAT 2926

AATGCTGAAAGCTATTGATCAGATGATTGGATTGATTTOGTAGGAGCAACATATGATTTAAGATTATTTT 2996

AACAAGATGGOCATAAAGTAGCATATCAATTTGTAATTTAACATTATTACACTCAAACTCAGGAAGATTGT 3066

CAATTTACCCCTCAAAACAAAGTTTTTAAGCCTTCAGTCTOCTTCAOCCACAGTGGCAOCTGOCCAAATTGGC 3136

AGCACTTCCCCGGGGTGGAAATGCTGTGGAGTTTGGTGTACAAATCCAOCTGGAAAATCACAGCAATTGATG 3206

HindIII

TTTCTTCATCATCTTOGGGTGCAATTGCTTTTACTTTGTGCAGTGGATGATCAAAGCTT 3266

٤

1 aaagtctttacttaaaagaaattagctaaaatggtagctccaaaatggtctttcatttcttttatgattttg

73 taagcttagcaatatgctctggccagcctgttacctttgatgcaattaaggctaaaggaagctgatcatgaca

145 acctcaaagctcacactctaagtaatatcgacaccaaaaggctttggaggaggcgggtggatttggcattgggtg

217 gtgtttgggcoggaggtggtggtggtggtggttctgaagccctaaactacggttataaacctggctgcagta

289 tccgtggttgcaactgtccctggctttggtttcctacctaatcctggttttggtgttccagtctattccctg

361 gttgtggctatgtgtgtccagccgatatttctgctgaagggaatgactgaatccaaaatcacaggaatatcag

1 Ac

433 AATCgGCTAGACcATAtOGaTGCAGGOCtGGGgCAAATATGTGTGgCAGTAAAGAtTGTAATGAGCCTTCOC
||||| ||||||| ||| || ||||| ||| ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

8 AATCcGCTAGACtATAcOGtTGCAaGOCaGGGcCAAATATGTGTGaCAGTAAAGAcTGTAATGAGCCTTCOC

505 TACACTTTGTTTTTCCcATGCAAGACAAACATGAgAATAACAAGAAAtATCTAAGATATGGAGGAOGtOGAG
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

75 TACACTTTGTTTTTCCcATGCAAGACAAACATGAcAATAACAAGAAcATCTAAGATATGGAGGAOGcOGAG

577 GTATAGGTCTCAgTGTGAGtGaAtcTaGtGGTTTTGGAATTGGTTTTGGTGCTcggggGtGGTGGTGGTGGG
||||||||| ||||| ||| ||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

147 GTATAGGTCTCAcTGTGgGaGgAgtTgGcGGTTTTGGAATTGGTTTTGGTGCT tGgGGTGGTGGTGGtG

649 GGGGAGGAGGgGGTGaTTCTaATGOCOCCTGGcTtTgaTAtCccGGaTtTaAOCOCGGcTTTGGCTGTOCOC
||||||||| ||||| ||||| ||||||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||

216 GGGGAGGAGgtGGTGgTTCTgATGOCOCCTGGtTgTagTaaCgatGGcTgTgAOCOCGGtTTTGGCTGTOCOC

721 CGGGCTGTGGTTATGCAATGTCTGOCACAAATOCCTAGTGGAGGAATAACTGAATTOCATATCTCAGGATTaT
||||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||

238 CGGGCTGTGGTTATGCAATGTCTGOCACAAATOCCTAGTGGAGGAATAACTGAATTOCATATCTCAGGATTgT

793 caccAaacaatggaccttacagatgtaggccagatatgtgtgagagtgaagattgtaaatgaacttctactac
|

360 tggcAg

865 actttgtttctccaaagcaacacaaacacgagaacogacatgatcatacagt agaaagaaatgaagaggagg

937 aagctcatcatcagtcaaagcatcataaagacgaagacatcataaactag

SEQUENCIA DE cADN DE TA26

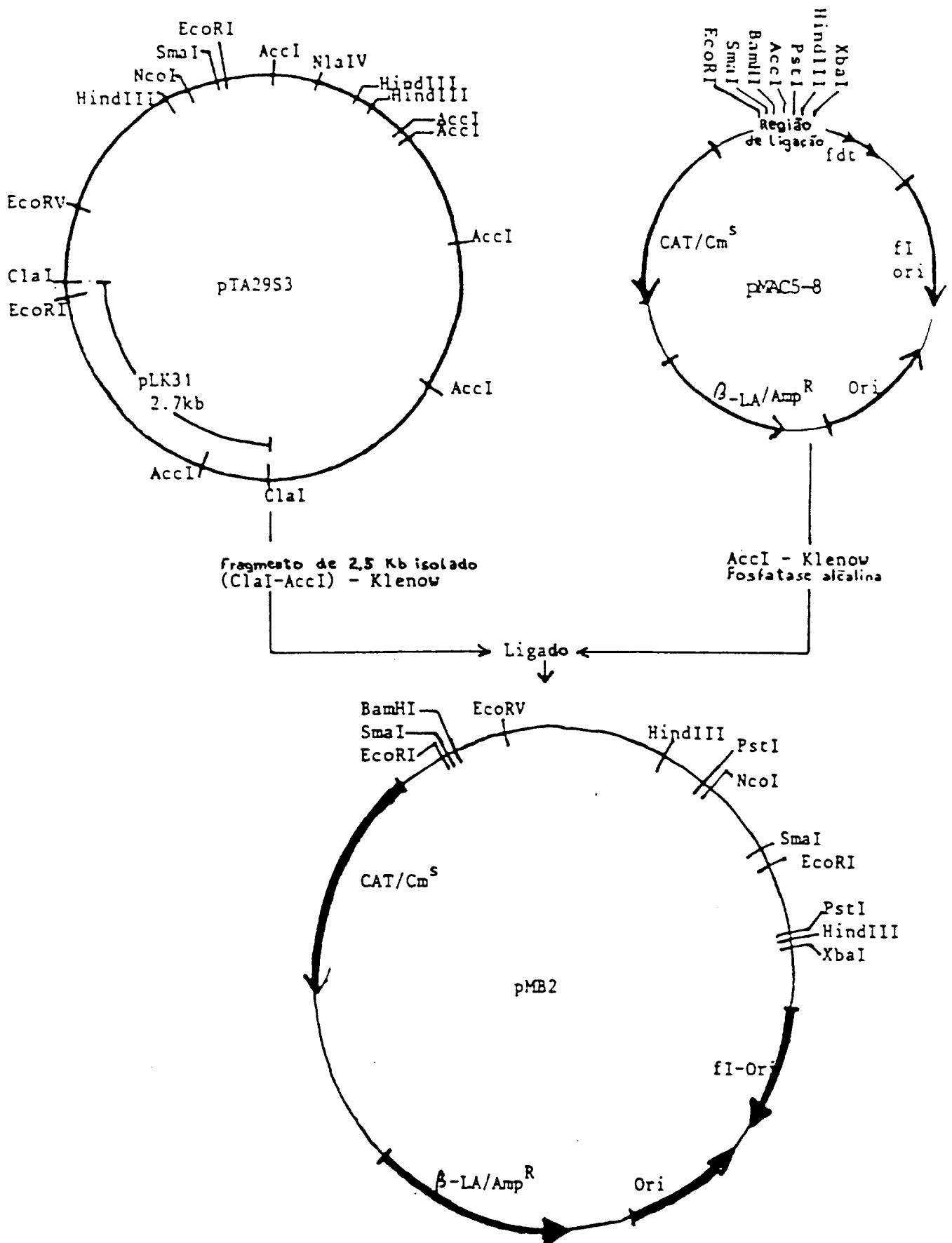
4.

10	20	30	40	50	60	70
CGCAGGGGGG	GGGGGGGGGG	GGGGGGCAAA	GATGTCAATA	ACTTCCAAGT	TCTTGCTAGT	TATGTCCCTA
80	90	100	110	120	130	140
GGACTAATAG	TTTTTACCAC	ATTTTCACTT	GCTGATCAAC	ACTACCAATC	TACCAAACAT	GAGCTTGGAC
150	160	170	180	190	200	210
GTTCTGATAC	TAATCAGCTA	AACATGAATG	GTTACTTAGC	CATGGAACCA	GCACCACCAG	ACCTTGAGCA
220	230	240	250	260	270	280
AGAAGGGGCAT	ATGTGGCGCT	TGAACGACGA	CTCGATCGCC	ATGGAACCAG	CACCACCAGA	CCTTGAGCAA
290	300	310	320	330	340	350
GAAGTGCATA	TGTGGCGCTT	GAACGACGAC	TCGATCGCCA	TGGAACCAGC	ACCAAGGTTT	GAGCTAGAAG
360	370	380	390	400	410	420
GGCAGAAGCA	ACATGAGCAT	GAGTCACACT	TGAGGCTAGT	AACTTAGAAA	ACATGATTAG	CACCAGAATA
430	440	450	460	470	480	490
GAATTAACCTT	GGAAGATGGT	GGATTATTGT	ACTATAGTCC	CTTATTCTAA	GTTGTGGATC	AATAATAAAG
500	510	520	530	540	550	560
CTCCATTGTC	CTAAATTTC	ATCTGAGTTA	AATTATCACC	TTATAATTAA	GTACCCCCCC	CCCCCCCCC

C

FIGURA 3C

Fig. 4 A



① 卅

LEGENDA

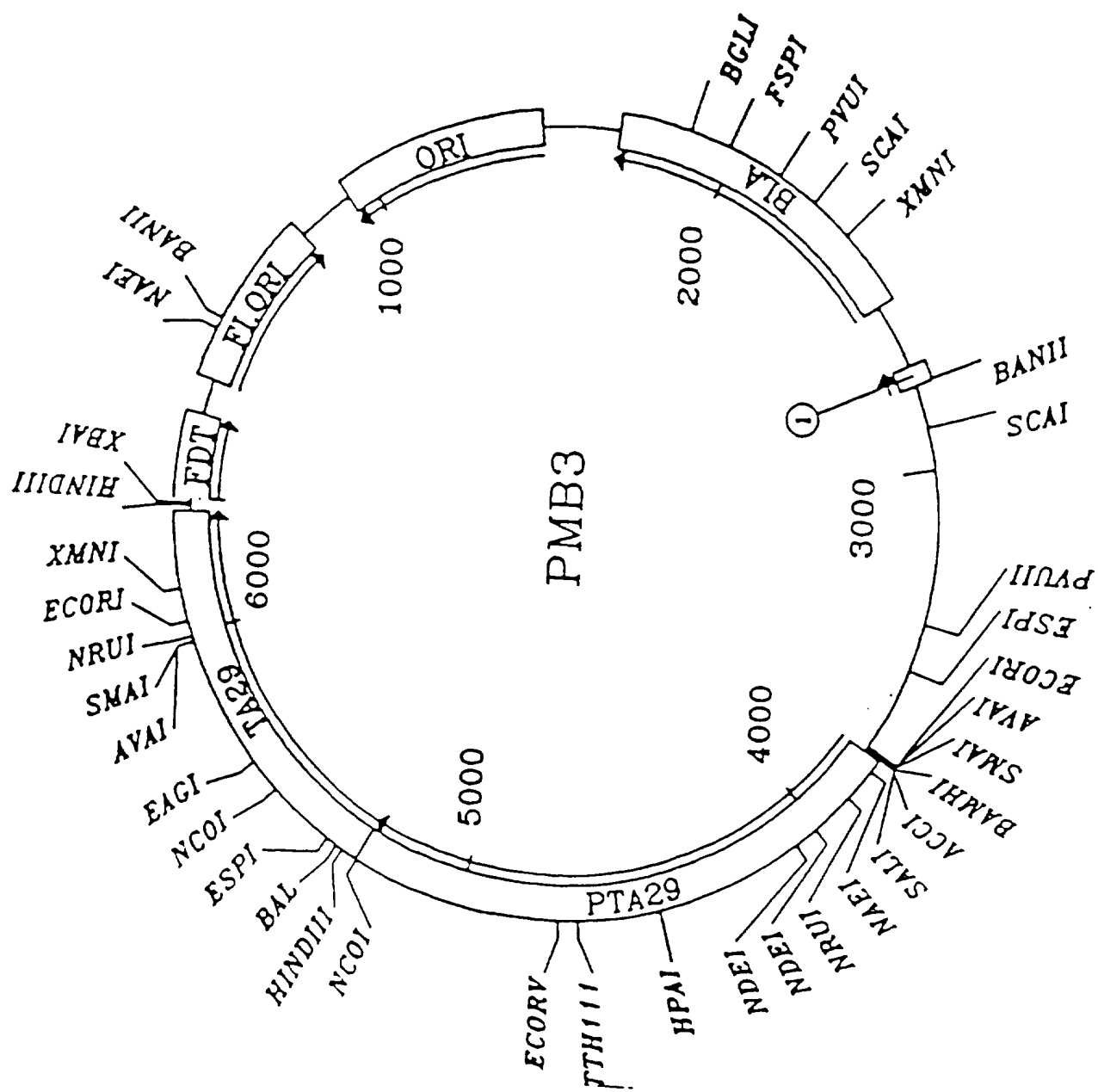
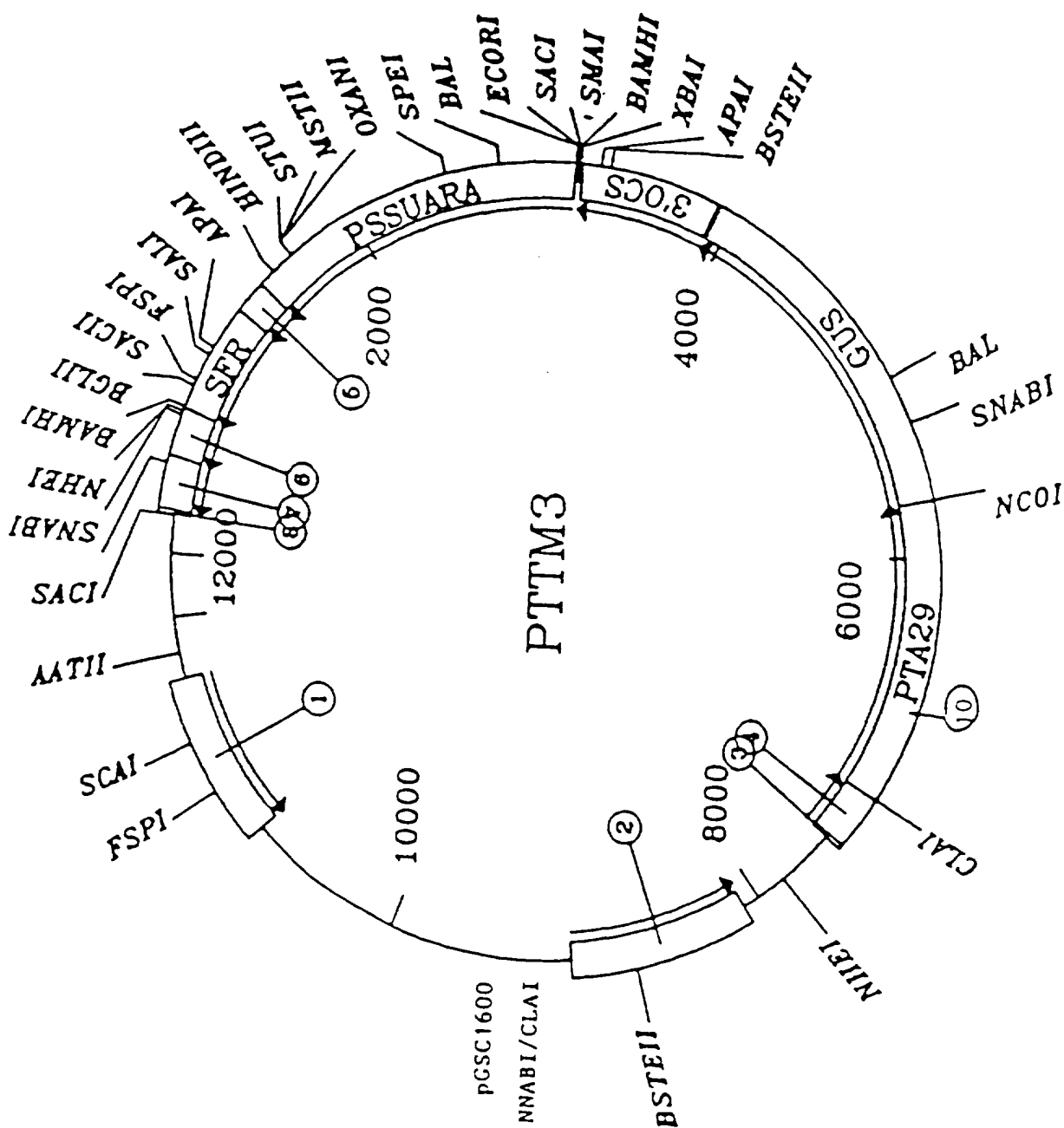


FIG. 5

LEGENDA

- ① BETA-LACTAMASE
- ② SM-SP-AD.-TRANSP.
- ③ LB.
- ④ T-DNA
- ⑤ TP
- ⑥ EXTREMIDADE 3' DE T7
- ⑦ T-DNA
- ⑧ RR
- ⑩ PTA29S3/pMB3



4.

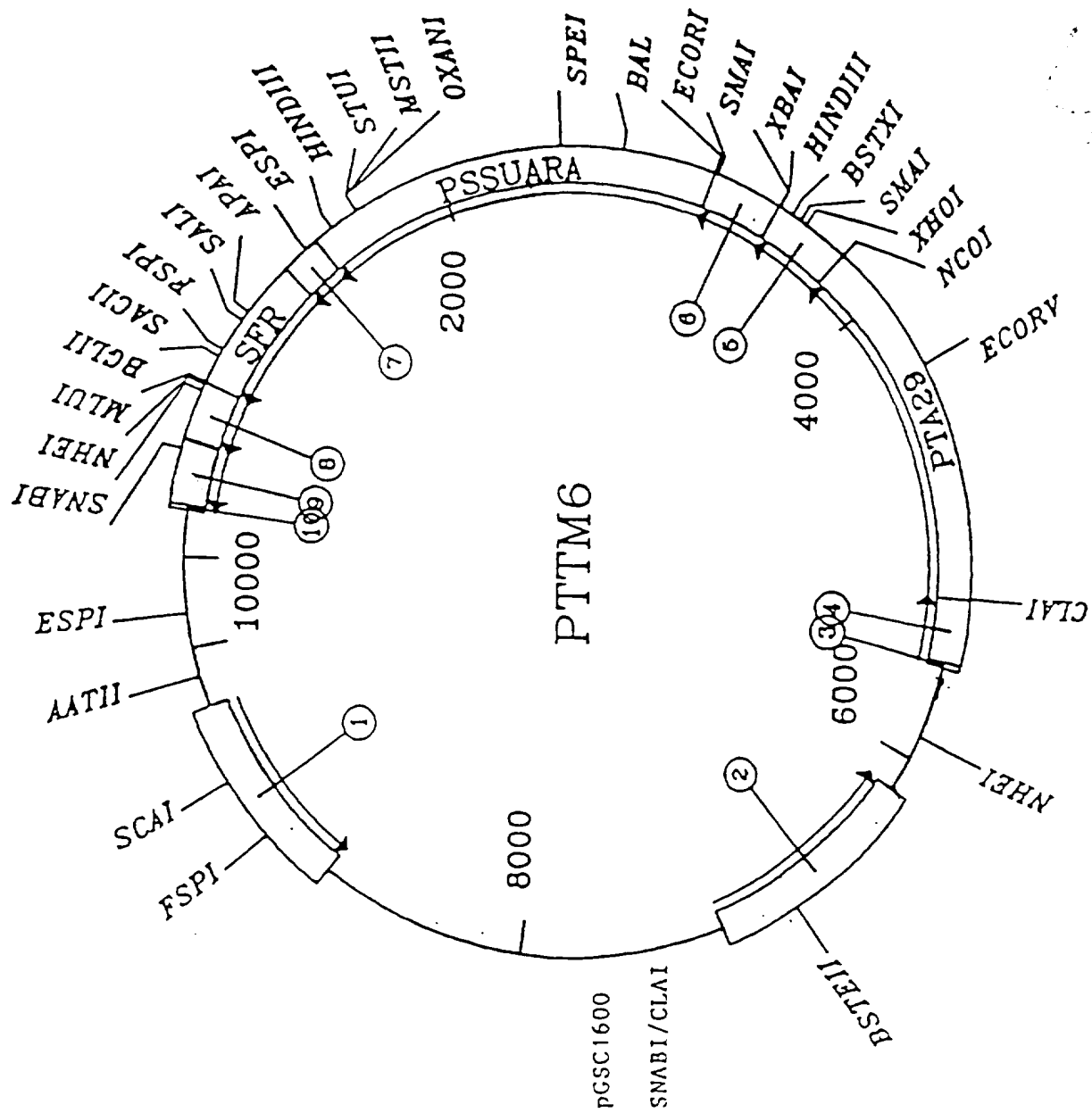
A circular map of the PTTM4 plasmid. The map shows various restriction enzyme sites labeled around the circumference, including NSI, XBAI, ECORV, PSTI, BAMHI, MLUI, NDEI, NRUI, SMAI, BGLII, INCOI, SACII, MSTII, OXAI, NARI, PSTI, BAL, IONN, BSTEI, APAI, NRUI, MSTII, OXAI, PSTI, BSTXI, BSTEI, SCAI, AATII, SACI, SNABI, BAMHI, MLUI, BGLII, SACII, ITAS, APAI, HINDIII, STUI, MSTII, OXAI, NSI, SPEI, BAL, ECORI, SCAI, and SMVI. Key features include the PVS1 REPLSTAB origin at the bottom, the PTA29 promoter at the top right, and three genes labeled 1, 2, and 3. Gene 1 is located between approximately 16000 and 18000 bp, Gene 2 between 8000 and 10000 bp, and Gene 3 between 4000 and 6000 bp. The PTA29 promoter is located near the 0/10000 mark. The map also indicates the positions of GENE 4 and PTA29.

- ① BETA-LACTAMASE
- ② SM-SP-AD TRANSF.
- ③ LB
- ④ T-DNA
- ⑤ PHOS
- ⑥ 3NOS
- ⑦ TP
- ⑧ EXTREMIDADE 3' DE T7
- ⑨ T-DNA
- ⑩ RB

FIG. 7 A

LEGENDA

- ① BETA-LACTAMASE
- ② SM-SP-AD-TRANSP.
- ③ LB
- ④ T-DNA
- ⑤ ARNASE T1
- ⑥ EXTREMIDADE 3' DE NOS
- ⑦ TP
- ⑧ EXTREMIDADE 3' DE T7
- ⑨ T-DNA
- ⑩ RB



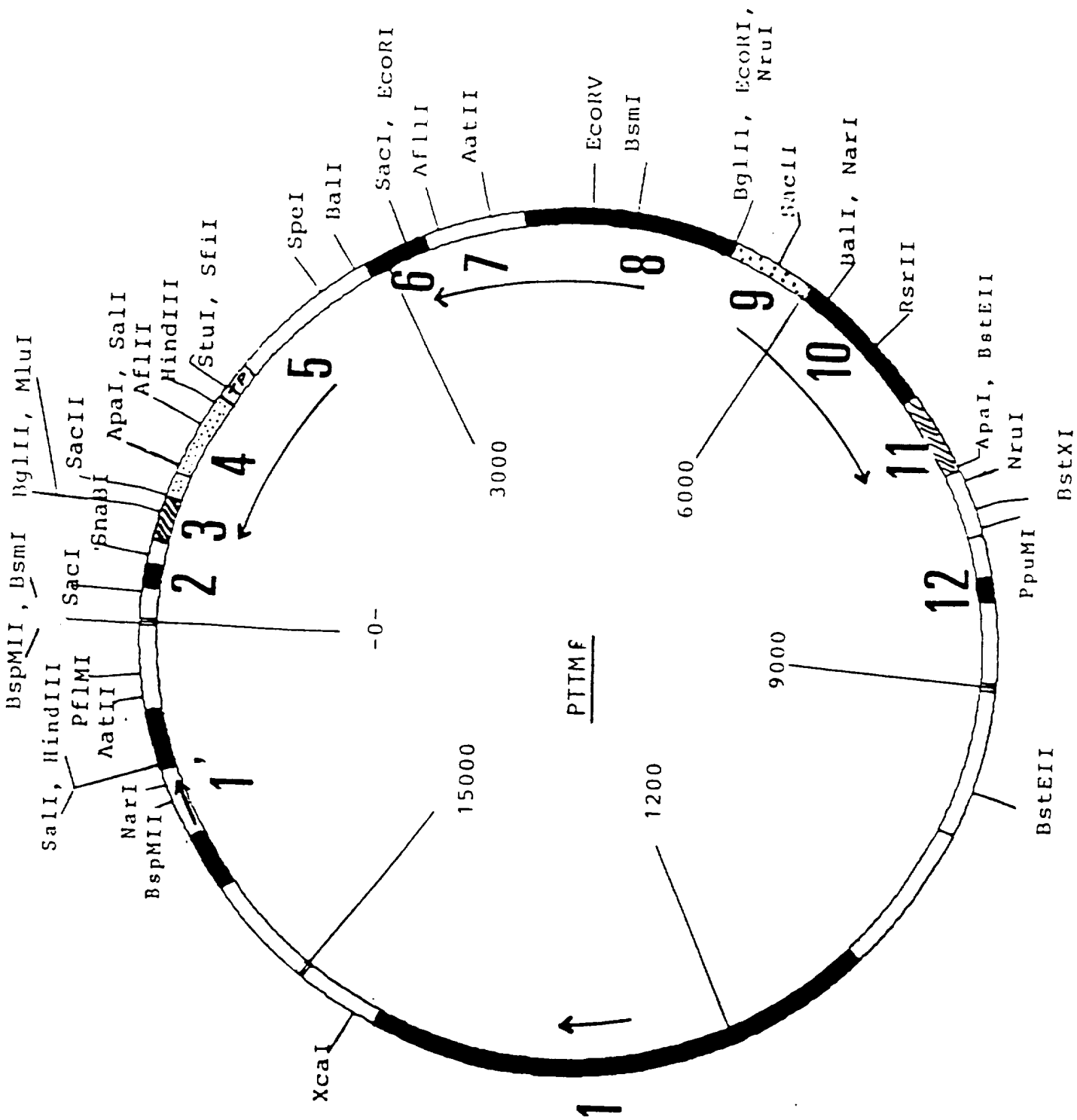


FIGURA 7B
1 : PVS1 ORI
2 : EXTREMIDADE DIREITA
3 : EXTREMIDADE 3'DE 77
4 : SFR
5 : PSSUARA
6 : EXTREMIDADE 3'DE NOS
7 : ARNASE T1
8 : PTA29
9 : PROMOTOR NOS
10 : NPTII
11 : EXTREMIDADE 3'DE OCS
12 : EXTREMIDADE ESQUERDA
1' : B-LACTAMASE COM INSERÇÃO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
84

1	:	PVS1 ORI
2	:	EXTREMIDADE DIREITA
3	:	EXTREMIDADE 3'DE T7
4	:	SFR
5	:	PSSUARA
6	:	EXTREMIDADE 3'DE NOS
7	:	BARNASE
8	:	PTA29
9	:	PROMOTOR NOS
10	:	NPTII
11	:	EXTREMIDADE 3'DE OCS
12	:	EXTREMIDADE ESQUERDA
1'	:	B-LACTAMASE COM INSERÇÃO

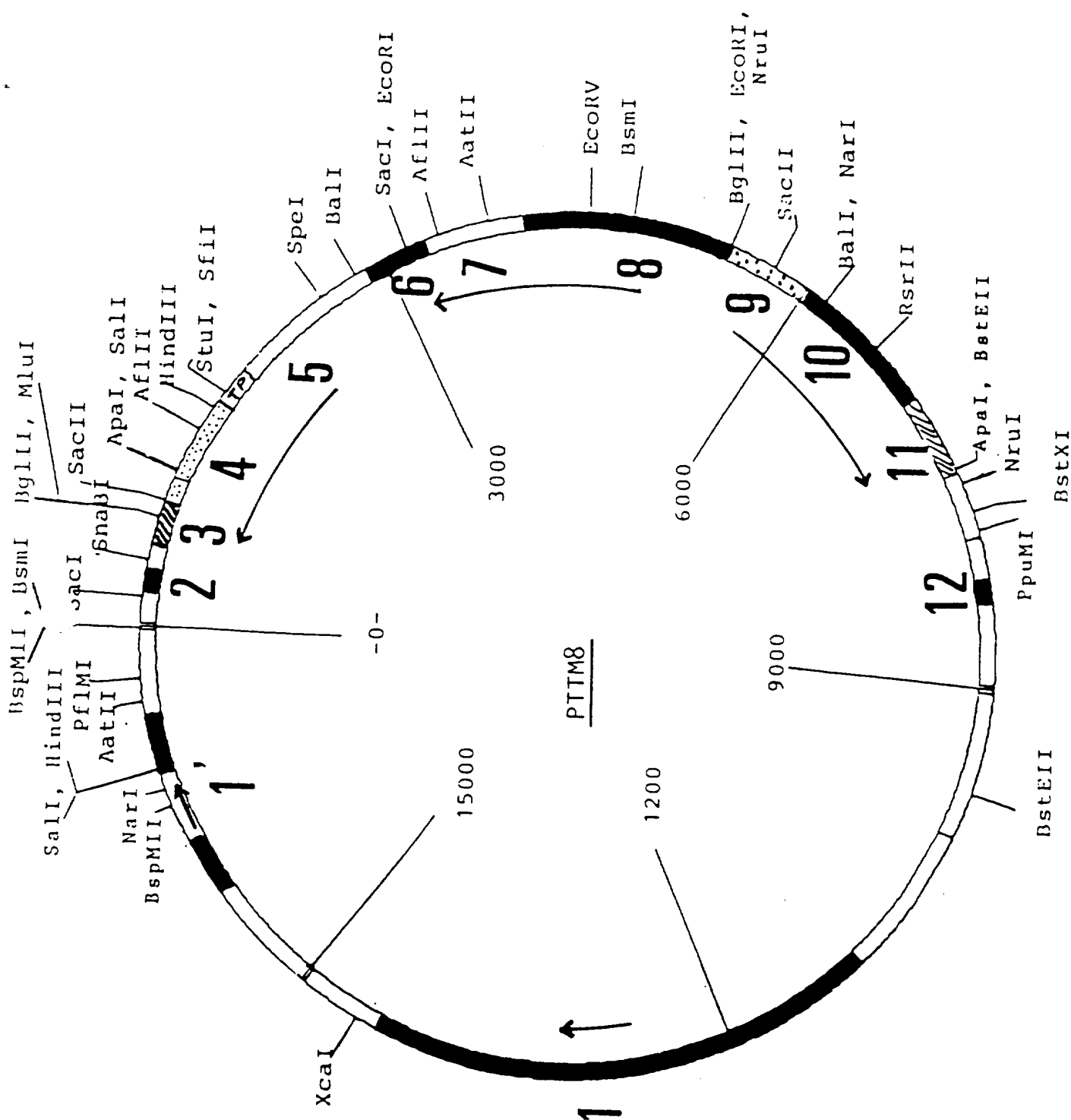


FIGURA	9 A
1 :	PVS1 ORI
2 :	EXTREMIDADE DIREITA
3 :	EXTREMIDADE 3' DE T7
4 :	SFR
5 :	PSSUARA
6 :	EXTREMIDADE 3' DE NOS
7 :	ZIMOGENIO DE PAPAÍNA
8 :	PTA29
9	PROMOTOR NOS
10 :	NPTII
11 :	EXTREMIDADE 3' DE OCS
12 :	EXTREMIDADE ESQUERDA
1' :	B-LACTAMASE COM INSERÇÃO

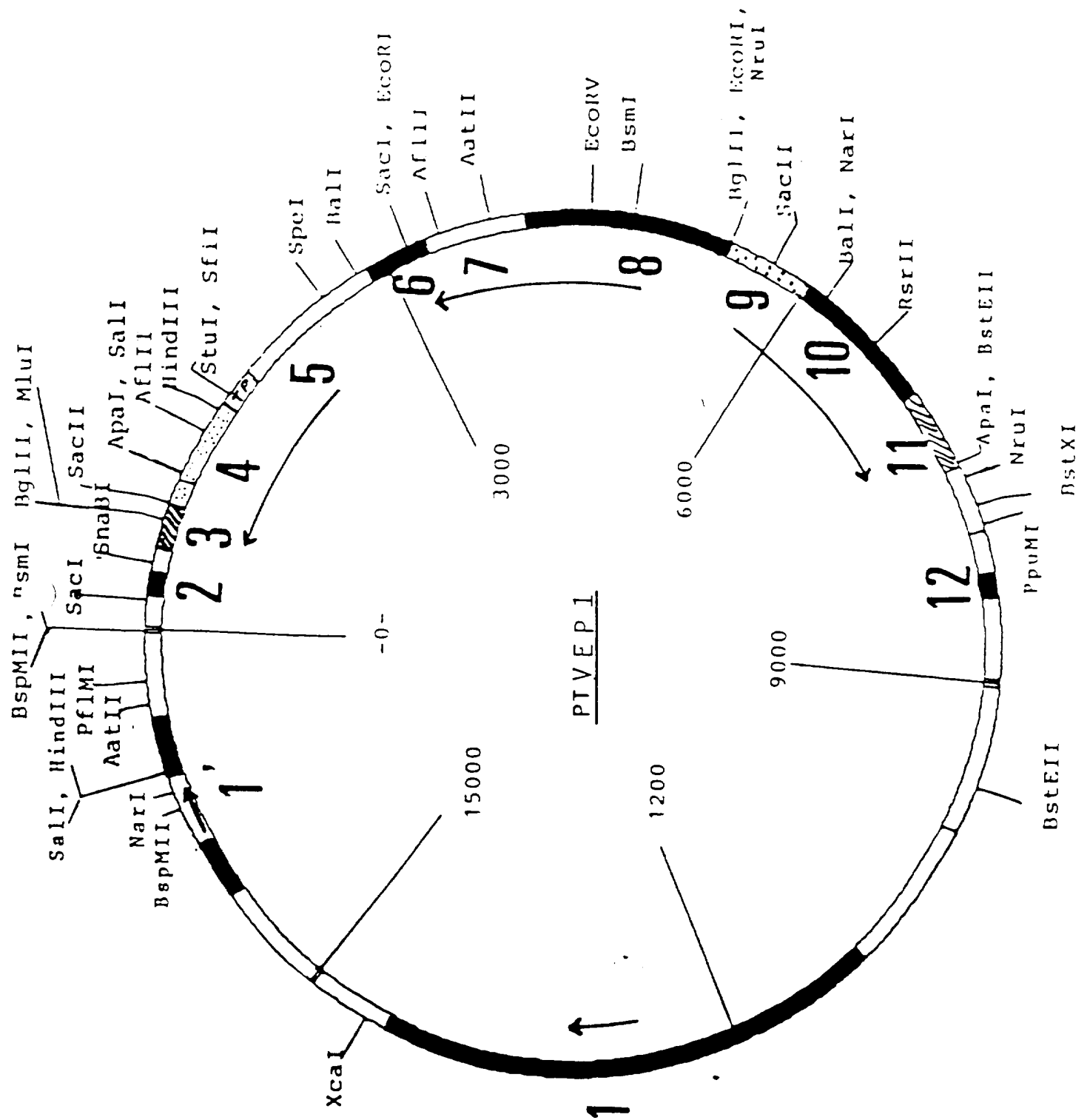


FIGURA	9 B
1 :	PVS1 ORI
2 :	EXTREMIDADE DIREITA
3 :	EXTREMIDADE 3'DE T7
4 :	SFR
5 :	PSSUARA
6 :	EXTREMIDADE 3'DE NOS
7 :	PROTEINA ACTIVA DA PAPAINA
8 :	PTA29
9 :	PROMOTOR NOS
10 :	NPTII
11 :	EXTREMIDADE 3'DE OCS
12 :	EXTREMIDADE ESQUERDA
1' :	B-LACTAMASE COM INSERÇÃO

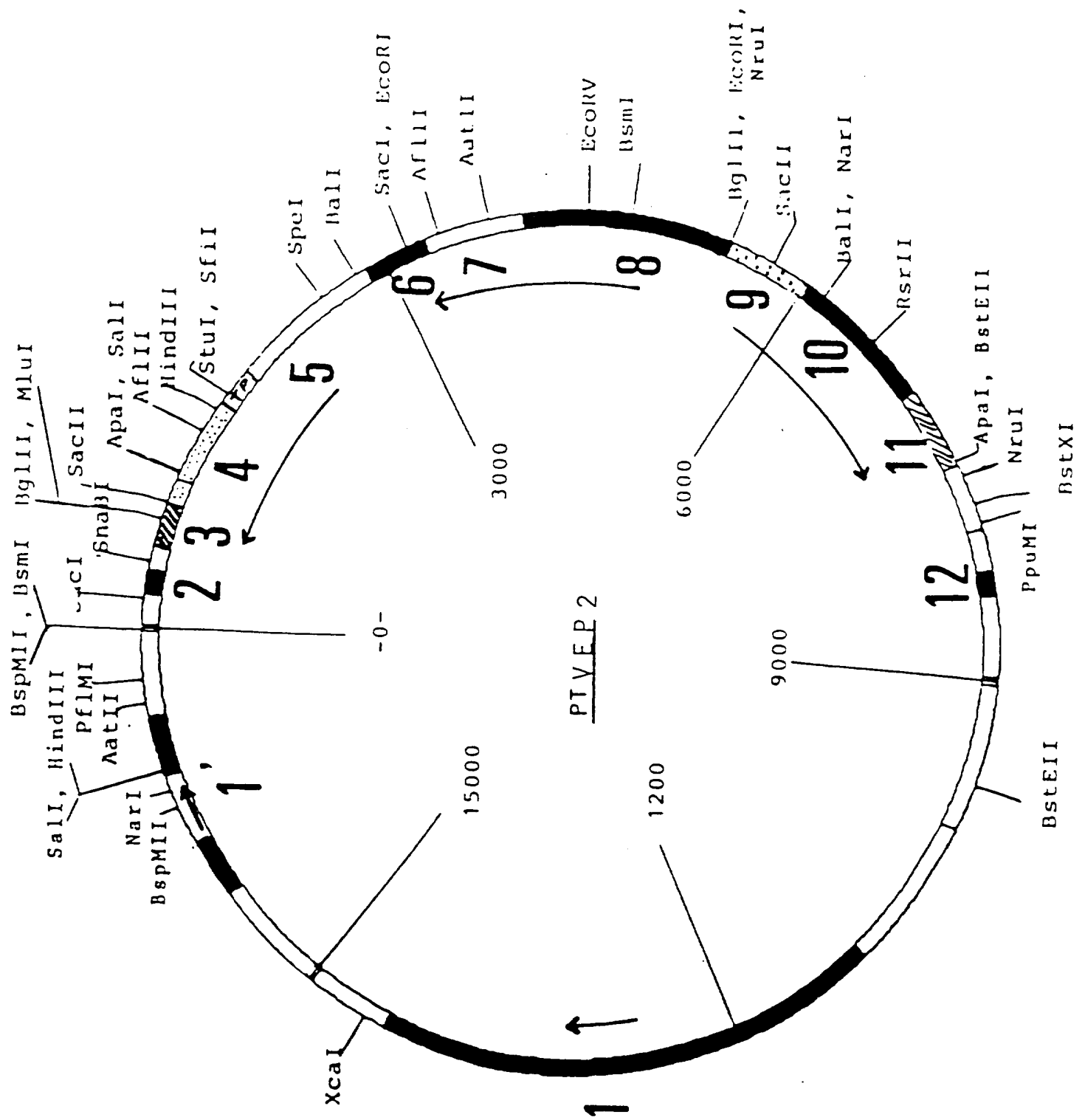


FIGURA 10 A

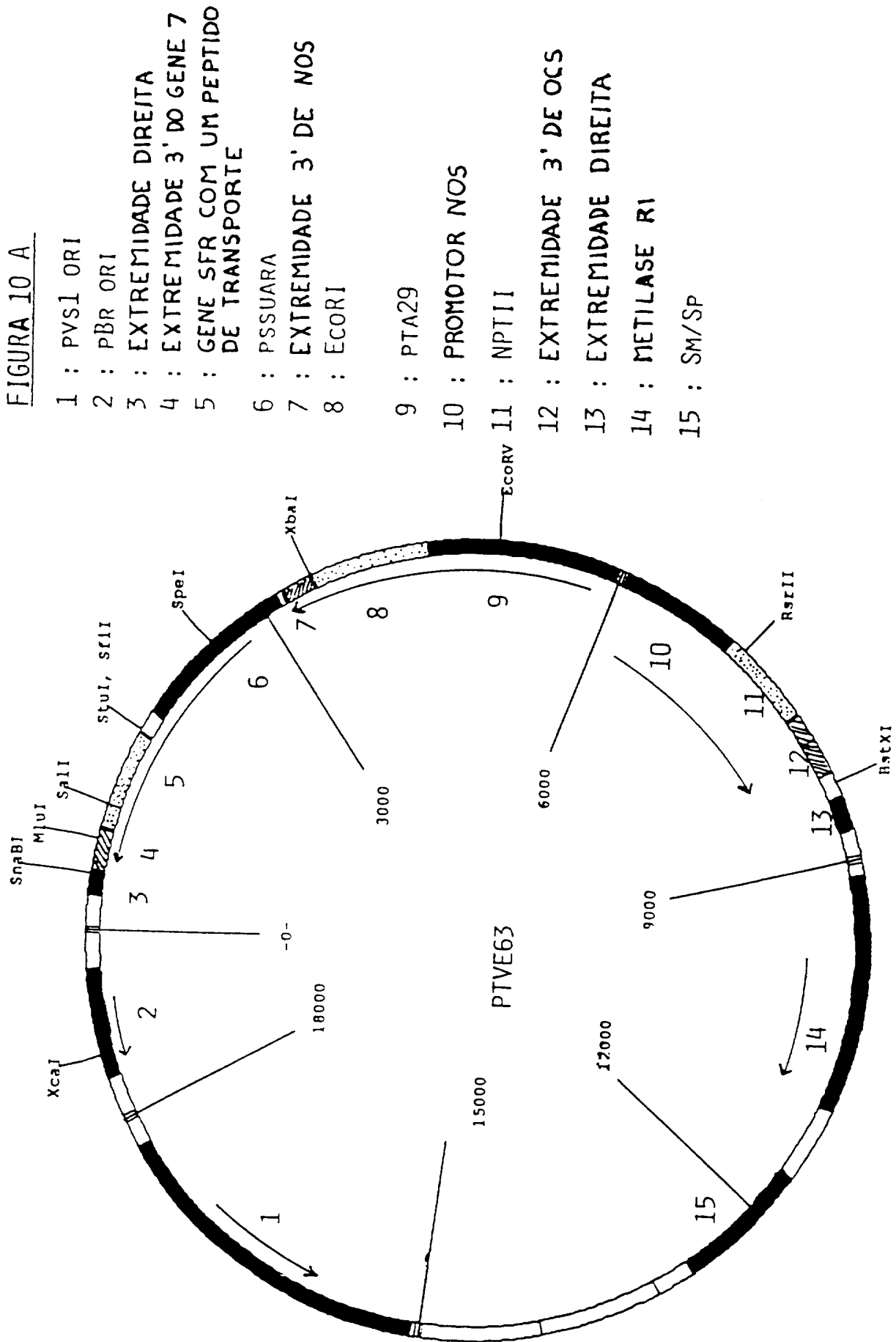
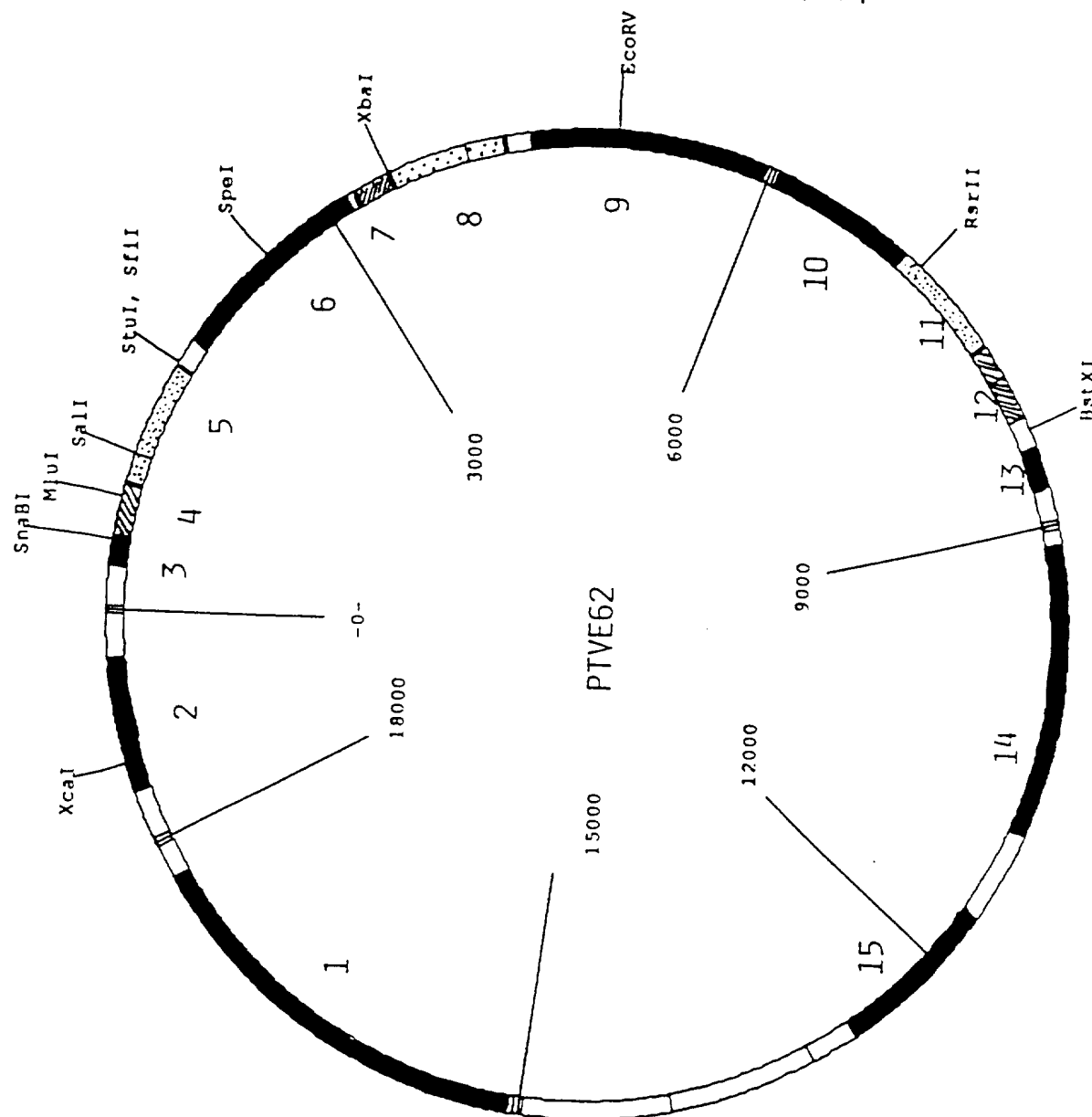
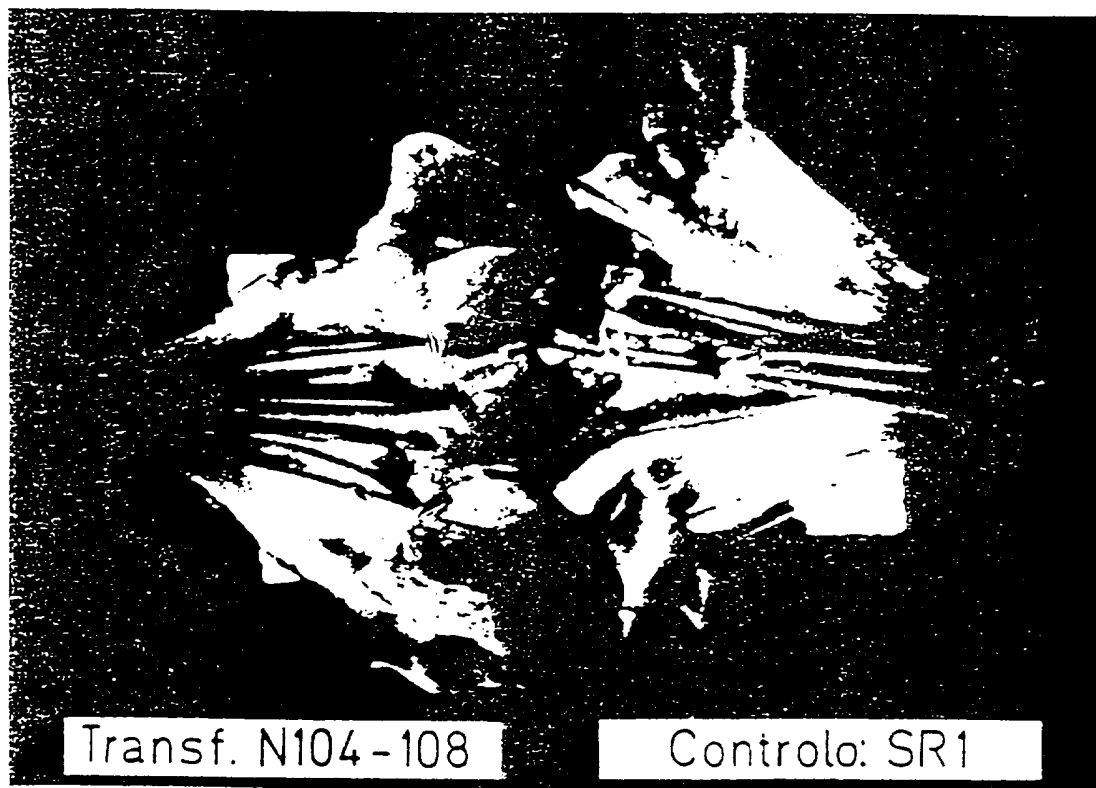


FIGURA 10 B

- 1 : PVSL ORI
- 2 : PBR ORI
- 3 : EXTREMIDADE DIREITA
- 4 : EXTREMIDADE 3' DO GENE 7
- 5 : GENE SFR COM UM PEPTIDO
DE TRANSPORTE
- 6 : PSSUARA
- 7 : EXTREMIDADE 3' DE NOS
- 8 : EcoRI
- 9 : PTA29
- 10 : PROMOTOR NOS
- 11 : NPTII
- 12 : EXTREMIDADE 3' DE OCS
- 13 : EXTREMIDADE ESQUERDA
- 14 : METILASE RI
- 15 : SM/SP





SRI TRANSFORMADO

SRI DE CONTROLO

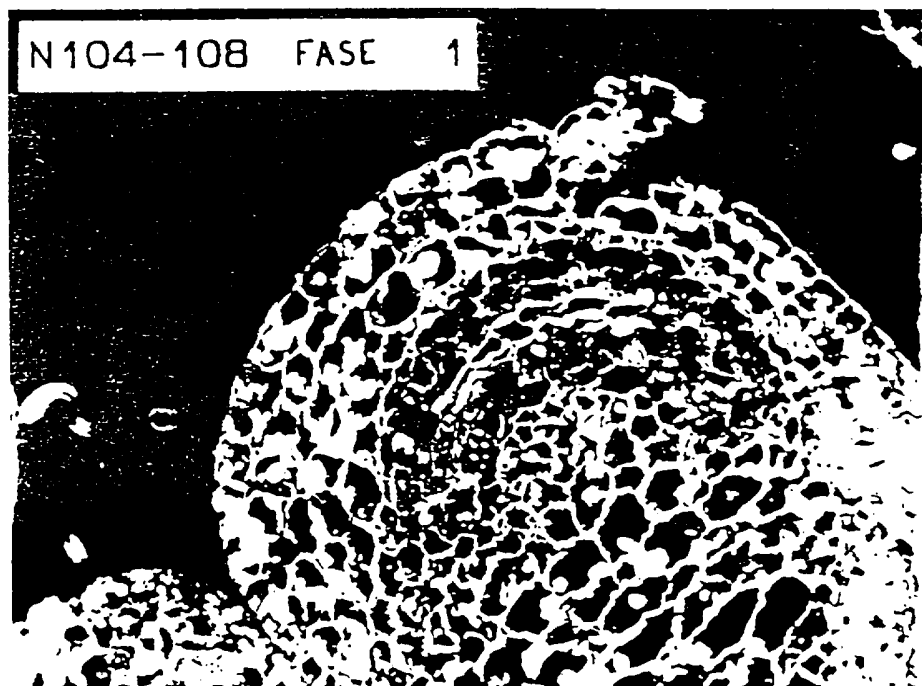
SR1 FASE 1



SR1 FASE 1
SECCÃO TRANSVERSAL DE UMA
ANTENA EM QUE SE OBSERVA
UM ESPESSO TAPETUM EM REDOR
DO SACO POLÍNICO

FASE DO PÓLEN: FORMA TETRAÉDRICA
X 250 d.f.

N104-108 FASE 1



2 N104-108 FASE 1
SECCÃO TRANSVERSAL DE UMA
ANTENA EM QUE SE OBSERVA
UMA FINA CAMADA DE TAPETUM,
NÃO EXISTINDO SACO POLÍNICO
NEM PÓLEN VISÍVEL
X 250 d.f.

Fig. 12