



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **94-01484**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **09.03.1993**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate: **09.03.1992 US 07/848 433;**

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 93 / 02127 09.03.1993**

(41) Data publicării cererii:
30.03.1995 BOPI nr. **3/1995**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 93/18171 16.09.1993**

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.01.2001 BOPI nr. **1/2001**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 114978; US 4654465; 4727219

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC., DES MOINES, IOWA, US; WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, PULLMAN, WASHINGTON, US;**

(73) Titular: **PIONEER HI-BRED INTERNATIONAL, INC., DES MOINES, IOWA, US; WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, PULLMAN, WASHINGTON, US;**

(72) Inventatori: **ALBERTSEN C. MARC, WEST DES MOINES, IOWA, US; BEACH LARRY, DES MOINES, IOWA, US; HOWARD A. JOHN, WEST DES MOINES, IOWA, US; HUFFMAN A. GARY, DES MOINES, IOWA, US; TAYLOR LOVERINE, PULLMAN, WASHINGTON, US;**

(74) Mandatar: **CABINET ENPORA S.R.L., BUCUREȘTI**

(54) **PROCEDEU DE REALIZARE A STERILITĂȚII MASculINE
EREDITARE, CONTROLABILE DIN EXTERIOR, LA O PLANTĂ**

(57) **Rezumat:** Invenția de față se referă la un procedeu de realizare a sterilității masculine ereditare, controlabile din exterior, la plante. Procedeul conform invenției constă în: a) selectarea unei gene care determină producerea de flavonoli; b) clonarea genei selectate; c) legarea genei clonate între- secvență

de exprimare, împreună cu un promotor de inducere, responsabil de controlul extern; d) inserția secvenței de exprimare în genomul nuclear; e) inactivarea genei care codifică produsul genic al genei clonate din genomul nuclear nativ, prin neinducerea promotorului.

Revendicări: 6
Figuri: 6

RO 116414 B



Invenția de față se referă la un procedeu de realizare a sterilității masculine ereditare, controlabile din exterior, la plante.

Se cunoaște că, scopul reproducerii plantelor este combinarea într-o singură varietate/hibrid a diverselor trăsături de dorit ale liniilor primare. În ceea ce privește lanurile de cultură, aceste trăsături includ rezistența la boli și insecte, toleranța la căldură și secetă, reducerea timpului de maturare a culturii, producții mai mari la hectar și calitate agronomică mai bună. Pentru recoltarea mecanizată a multor culturi este importantă uniformitatea unor caracteristici ale plantelor, cum ar fi, stabilirea germinației și a densității, viteza de creștere, maturarea și mărimea fructului.

Lanurile de cultură sunt reproduse prin tehnici care valorifică metoda de polenizare a plantelor. O plantă este polenizată direct dacă polenul de la o floare este transferat la aceeași floare sau la o alta de pe aceeași plantă. O plantă este polenizată încrucișat dacă polenul provine de la o floare de pe o plantă diferită.

Plantele care au fost polenizate direct și al căror tip a fost selectat de-a lungul mai multor generații devin homozigote la aproape toate locusurile genelor și produc o populație uniformă de descendenți de reproducere veritabili. O încrucișare între două linii homozigote produce o populație uniformă de plante hibrida care pot fi heterozigote pentru multe locusuri genice. Încrucișarea a două plante, heterozigote fiecare la un număr de locusuri genice va produce o populație de plante hibride diferite genetic și care nu va fi uniformă.

Plantele de porumb (*Zea mays* L) pot fi reproduse prin tehnici de polenizare, atât directă, cât și încrucișată. Porumbul are inflorescențe masculine localizate pe spic, și inflorescențe femele, localizate pe știulete, ambele pe aceeași plantă. Polenizarea naturală survine la porumb atunci când vântul poartă polenul din spic pe mătasea care iese în afară pe la vârful știuleților incipienti.

Dezvoltarea hibrizilor de porumb necesită dezvoltarea liniilor naturale homozigote, încrucișarea acestor linii și evaluarea indivizilor rezultați. Reproducerea de origine și selecția recurentă sunt doar două din metodele de reproducere folosite pentru a dezvolta liniile naturale din populații. Programele de reproducere combină trăsăturile de dorit de la două sau mai multe linii naturale sau de la diferite surse pe bază largă, în fonduri comune de reproducere, de la care se dezvoltă noi linii naturale prin autoselectarea fenotipurilor dorite. Indivizii rezultați sunt încrucișați cu alte linii naturale, iar hibrizii rezultați din aceste încrucișări sunt evaluați pentru a determina care dintre ei are potențial comercial.

Reproducerea de origine începe cu încrucișarea a două genotipuri, fiecare dintre ele putând avea una sau mai multe caracteristici dorite, care lipsesc la cealaltă sau le completează pe ale celeilalte. Dacă cei doi genitori originali nu prezintă toate caracteristicile dorite, pot fi incluse în reproducerea de origine alte surse. Prin procedeu de reproducere de origine, sunt autoselectate plante superioare, în generații succesive. În generațiile moștenite, starea de heterozigot cedează în fața liniilor homozigote, ca urmare a polenizării directe și a selecției. De regulă, prin procedeu de reproducere de origine se lucrează cu cinci sau mai multe generații de autoselecție:

$F_1 \rightarrow F_2; F_2 \rightarrow F_3; F_3 \rightarrow F_4; F_4 \rightarrow F_5; \text{etc.}$

O varietate de porumb hibrid reprezintă încrucișarea a două linii naturale, fiecare dintre ele putând avea una sau mai multe caracteristici dorite, care îi lipsesc celeilalte sau se completează pe ale celeilalte. Descendentul hibrid al primei generații

este desemnat F_1 . În dezvoltarea hibridilor sunt căutate doar plantele hibride F_1 . Hibridul F_1 este mai viguros decât genitorii săi naturali. Această vigoare a hibridului sau heterozis, se poate manifesta în multe feluri, inclusiv sub formă de creștere vegetativă sporită și producție la hectar mai mare.

50

Dezvoltarea unei varietăți de porumb hibrid implică trei etape: (1) selecția plantelor superioare din variate fonduri genetice de embrioni; (2) autoselectarea plantelor superioare pe durata câtorva generații, pentru a produce o serie de linii naturale care, deși diferă una de cealaltă, fiecare specie se ajustează și ele sunt uniforme în grad înalt; și (3) încrucișarea liniilor naturale selectate cu linii naturale neînrudite pentru a produce descendentul hibrid (F_1). În cursul procesului de reproducere vigoarea liniilor scade. Vigoarea se reface atunci când două linii naturale neînrudite sunt încrucișate pentru a produce descendentul hibrid (F_1). O consecință importantă a stării de homozigot și a omogenității liniilor naturale este faptul că hibridul dintre oricare doi indivizi va fi întotdeauna același. În momentul în care au fost identificați indivizii care dau cel mai bun hibrid, sămânța hibridă poate fi reproducă fără încetare, atâta timp, cât omogenitatea genitorilor naturali este menținută.

55

60

Un hibrid de încrucișare unică este produs atunci când două linii naturale sunt încrucișate pentru a produce descendentul F_1 . Un hibrid de încrucișare dublă este produs din patru linii naturale, încrucișate în perechi ($A \times B$ și $C \times D$), iar apoi cei doi hibridi F_1 sunt din nou încrucișați ($(A \times B) \times (C \times D)$). Cea mai mare parte din vigoarea demonstrată de hibridii F_1 se pierde în generația următoare (F_2). Ca urmare, sămânța din varietățile hibride nu este folosită în stocul de plantare. De asemenea, este foarte important, în producerea seminței hibride, să se evite polenizarea directă și producerea și vânzarea seminței naturale utilizatorilor finali.

65

70

Sămânța de porumb hibrid poate fi produsă prin desprinderea manuală a spicelor. Rânduri alternative de două varietăți naturale de porumb sunt plantate într-un lan, iar spicele purtătoare de polen sunt îndepărtate de pe unul din indivizi (planta feminină). Cu condiția ca să existe o izolare suficientă față de surse străine de polen de porumb, știuleții individului de la care s-au prelevat spicele se vor fertiliza doar cu polen de la celălalt individ (planta masculină), iar sămânța care rezultă este astfel hibridă și va forma plante hibride. Din nefericire, procesul de prelevare manuală a spicelor nu oferă siguranță totală. Se poate întâmpla ca uneori o furtună să împrăștie plantele feminine, astfel, încât să nu fie prelevate toate spicele plantei. În altă situație, planta feminină poate scutura în mod obișnuit polenul, iar unele plante feminine vor fi polenizate direct. Aceasta va determina recoltarea seminței plantei feminine împreună cu sămânța hibridă ce se produce în mod normal.

75

80

Ca alternativă, prelevarea spicelor plantei feminine se poate face mecanic. Prelevarea mecanică a spicelor este aproape la fel de sigură ca și prelevarea manuală, dar este mai rapidă și mai ieftină. Cu toate acestea, majoritatea utilajelor de prelevare a spicelor produc mai multe pagube asupra plantelor, decât prelevarea manuală. Prin urmare, nici o metodă de prelevare a spicelor nu este în prezent pe deplin satisfăcătoare și continuă să persiste nevoia de alternative care să mai reducă cheltuielile de producție și să elimine polenizarea directă în cursul producerii seminței hibride.

85

90

Procesul laborios al prelevării spicelor poate fi evitat prin folosirea de indivizi cu citoplasmă sterilă pentru partea masculină (CMS). Plantele din tipul CMS sunt sterile

95 pentru partea masculină, ca urmare a factorilor citoplasmatici rezultați din opunerea genomului citoplasmatic celui nuclear. Astfel, această caracteristică este moștenită exclusiv prin intermediul genitorului feminin, întrucât, doar partea feminină furnizează citoplasmă seminței fertilizate. Plantele CMS sunt fertilizate cu polen de la alt individ care nu este steril pentru partea masculină. Polenul de la cel de-al doilea individ poate sau nu contribui cu gene care fac plantele hibride fertile pentru partea masculină. De regulă, sămânța de la porumbul obișnuit, cu spice prelevate și sămânța produsă din CMS a aceluiasi hibrid trebuie amestecate pentru a se asigura că, încărcături adecvate de polen sunt disponibile pentru fertilizare atunci când plantele hibride sunt crescute.

105 Pot fi și alte dezavantaje ale CMS. Unul este o asociere, observată în timp, dintre o variantă specifică a CMS și susceptibilitatea la anumite boli ale culturilor. Această problemă a dus la renunțarea virtuală a folosirii acestei variante a CMS pentru producerea porumbului hibrid. În plus: CMS are uneori o asociere negativă cu performanța agronomică, în mod special, în zona calității tulpinii, a vigorii precoce a răsadului și a producției la hectar. În sfârșit, CMS demonstrează ocazional un potențial de afectare a sterilității în anumite medii, făcând liniile CMS nepotrivite pentru producția seminței hibride.

110 O altă formă de sterilitate, sterilitatea masculină genetică, este descrisă în brevetele **US 4654465** și **4727219** de Brar și alții. Totuși, acest tip de sterilitate masculină genetică solicită menținerea unor multiple gene mutante în poziții separate în cadrul genomului și necesită un sistem complex de markeri pentru urmărirea genelor și pentru ca folosirea sistemului să fie convenabilă.

120 La speciile cu polenizare directă, cum ar fi, soia și bumbacul, organele masculine și feminine sunt juxtapuse din punct de vedere anatomic. În timpul polenizării naturale, polenul de la organele de reproducere masculine ale unei anumite flori polenizează organele de reproducere feminine ale aceleiași flori. Acest lucru se întâmplă în mod opus la speciile cu polenizare încrucișată, cum ar fi, porumbul, la care polenul de pe spicul unei plante polenizează, de regulă mătasea știuletelui altei plante, prin dispersare de către vânt. Aceasta se poate întâmpla cu ușurință datorită separării organelor de reproducere masculine și feminine. Producția de hibridi în cadrul culturilor cu polenizare directă poate fi dificilă datorită alăturării organelor de reproducere masculine și feminine. Dificultăți fizice de realizare a producției de hibridi la o cultură cu polenizare directă i se adaugă o cantitate de heterozis în hibrid, adeseori prea mică pentru a justifica cheltuielile suplimentare necesare producerii seminței hibride. O formă valoroasă de sterilitate masculină ar oferi ocazia unei reproduceri îmbunătățite a plantelor hibride și producții la hectar mai mari pentru aceste specii.

130 Cercetătorii au dorit să înțeleagă procesul dezvoltării polenului și al fertilizării la porumb și alte plante. Fertilizarea începe cu germinarea polenului matur pe suprafața stigmatului și cu producerea unei tube care penetrează țesutul stilului. La angiosperme, tuba pentru polen care se dezvoltă este un conduct pentru transportul celor două celule spermatice la sacul embrionar, unde se unesc cu oul și celulele centrale, pentru a forma zigotul, respectiv endosperma (E.G.Cutter, 1978, Plant anatomy, Part 1, "Experiment și interpretare", E.Arnold, Edes., Addison Wesley, London, cap.6). Dezvoltarea polenului are loc în anteră, iar la maturitate fiecare grăunte este un spor multicelular ce conține rezultatul, atât al exprimării genei

sporofitice, cu origine în stratul intern al peretelui anterei (tapetum), cât și al exprimării genei haploide din celula vegetativă a fiecărui grăunte. (J.P.Nascarenhas, 1990, Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.41: 317; J.P.Mascarenhas, 1989, Plant Cell 1: 657). Deși, procesul de microsporogeneză este bine documentat din punct de vedere histologic, se știu puține despre factorii moleculari și biochimici implicați în funcțiile polenului după dispersare.

140

Flavonoizii reprezintă o clasă abundentă de metaboliți specifici plantelor cu masă moleculară mică (-300) și care au în comun o structură cu 15 atomi de carbon. Modificarea structurii de bază produce o serie mare de compuși, clasificați în funcție de starea de oxidare și tipul de substituție al diferitelor inele. Unele clase sunt reprezentate de pigmenți (de exemplu, antocianine, calcone și flavonoli și flavone specifice), iar altele de compuși absorbantți de ultraviolete necolorați. Antocianinele, în mod special, pelargonina, cianidina și delfinidina sunt răspunzătoare de culorile plantelor, roșu, albastru, respectiv, violet. Alți flavonoizi pigmentați, calcone, ca și unii flavonoli și flavone sunt galbeni și contribuie semnificativ la florile colorate galben, sidef sau crem. Flavonoizii din polen au fost identificați în câteva specii, unde realizează o culoare galbenă specifică polenului și pot reprezenta un procent mare (2 - 5%) din greutatea substanței uscate (R.Zerbak, M.Bokel, H.Greiger, DHess, 1989, Phytochemistry 28: 897 R.Wierininann și K.Vieth, 1983 Protoplasma 118:2830). Este dovedit că grăuntele de polen este un mediu special pentru biosinteza și/sau acumularea flavonoizilor întrucât diferite specii de plante au tipuri unice de flavonoizi în polenul lor (O.Ceska și E.D.Styles, 1984, Phytochemistry 23: 1822).

145

150

155

160

În literatură au fost citate în trecut plante având pigmentarea flavonoidă modificată. De exemplu, a fost izolat și descris în trecut un mutant de porumb ce produce polen nefuncțional alb mai degrabă decât galben (Col E.H., Mc Cormick S.M. și Modena S.A., 1981, "Polenul alb la porumb" J Hered 72: 318-320). Mutantul de polen alb scutură cantități normale de polen nepigmentat care germinează pe mătasea știuletelui, dar după majoritatea polenizărilor nu apare sămânță. Condiția este determinată sporofitic de către exprimarea mutațiilor recesive stabile la nivelul celor două gene pentru calconă-sintază (CHS) ale porumbului, C_2 și Whp. Recent a fost comunicată introducerea, mediată de *Agrobacterium*, a unei transgene CHS într-o tulpină de petunie naturală pigmentată, în scopul supresării exprimării genei (genelor) CHS endogene, obținându-se corole de floare la care lipsește complet pigmentarea flavonoidă (Napoli C., Lemieux C. Și Jorgensen R., 1990. "Introducerea unei gene himerice pentru calconă -sintază în petunia, cu producerea unei CO-represiuni reversibile a genelor omologe în *trans*," Plant Cell 2: 279-289). Transgena CHS este deci supresată la aceste plante, iar termenul de co-supresare a fost folosit pentru descrierea acestui fenomen (Jorgensen R., 1990, "Exprimarea genică alterată la plante datorită interacției *trans* între genele omologe", Trends Biotech 8: 340-344). Transgena integrată acționează ca un inhibitor dominant nelegat al genei (genelor) CHS endogene și duce la blocarea completă a producerii de pigmenți flavonoizi vizibili, nu doar în petalele florii ci și în organele de reproducere.

165

170

175

180

Blocarea exprimării genei CHS nu determină doar deficiențe de pigmentare flavonoidă, ci și plante ce nu sunt fertile (Col, și colab., 1981; Taylor, și colab., 1992, "Fertilitatea masculină condițională la petunia cu deficit de calconă-sintetază", J.Hered., 83: 11-17). Ar fi de dorit în foarte mare măsură să existe posibilitatea de

185 a controla fertilitatea într-o manieră în care plantele pot fi efectiv determinate să prezinte sterilitate sau fertilitate masculină după dorință.

Invenția de față se referă la un procedeu de realizare a sterilității masculine ereditare, controlabile din exterior, la plante care costă în

- a) selectarea unei gene care determină producerea de flavonoli;
- 190 b) clonarea genei selectate;
- c) legarea genei clonate într-o secvență de exprimare, împreună cu un promotor de inducere, responsabil de controlul extern;
- d) inserția secvenței de exprimare în genomul nuclear;
- e) inactivarea genei care codifică produsul genic al genei clonate din genomul
- 195 nuclear nativ, prin neinducerea promotorului.

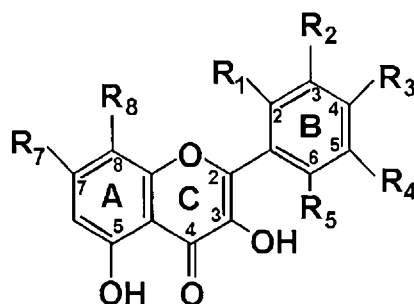
S-a descoperit că plantele la care activitatea flavononă 3 - hidroxilazei (F3H) a fost slăbită, în așa fel, încât să producă o deficiență de flavonol, aceste plante deci, sunt condițional sterile masculin (CMF), iar fertilitatea masculină poate fi recuperată sau refăcută prin realizarea unor condiții în care polenul plantelor să fie pus în contact

200 cu flavonoli de refacere a fertilității. Activitatea F3H poate fi slăbită direct sau indirect, de exemplu, prin blocarea producerii F3H la plante, prin inactivarea F3H natural produs de plante sau prin slăbirea activității unei enzime precursoră, cum ar fi, calconă-sintetaza (CHS) din lanțul biosintezei flavonolice. Deși plantele cu deficit de F3H produc polen viabil, germinarea polenului și creșterea tubei sunt reduse sever,

205 atât *in vivo*, cât și *in vitro*, rezultând plante direct sterile. Cu toate acestea, prin realizarea condițiilor în care polenul plantei să vină în contact cu flavonoli de refacere a fertilității, completa germinare a polenului și capacitatea de creștere a tubei pot fi refăcute. Condițiile adecvate de refacere a fertilității includ orice situație în care flavonolii necesari sunt puși în dispoziția polenului plantelor, cum ar fi, de exemplu, îndepărtarea

210 condiției de slăbire a activității F3H, refacerea producerii F3H, la plante și altele. În mod alternativ, fertilitatea plantelor poate fi salvată sau refăcută prin punerea în contact a polenului plantelor cu o cantitate de flavonol de refacere a fertilității care acționează în sensul sporirii germinării și/sau a creșterii tubei polenului. Flavonolii de refacere a fertilității utili includ compuși cu formula:

215



220

în care: $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7$ și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau alcoxil având 1 - 3 atomi de carbon. În mod particular, flavonolii preferați sunt galangina, kaempferol, izoramnetina, quercetina și morina.

225

Se prezintă, în continuare, descrierea detaliată a invenției, în legătură și cu fig. 1...6, care reprezintă:

230

- fig. 1, reprezentare schematică a influenței sporofitice (liniile diagonale) asupra dezvoltării microsporilor, la plantele heterozigote pentru calconă-sintetază (CHS). Lipsa funcționării CHS în sporofit este indicată printr-un fond alb (fig. 1 A), iar prezența funcționării CHS, printr-un fond negru (fig. 1B);

- fig.2A și 2B, reprezentări fotografice ale polenului germinat *in vitro* de la linia naturală V26 de petunia (fig.2A) și planta cu deficit de CHS O2425.1, unde polenul de pe anterele recent dehiscențe a fost suspendat într-un mediu lichid și fotografiat după creșterea la temperatura camerei, timp de 6 h. Linia (măsura) din fig.2A reprezintă 25 μ M. Săgețile din fig.2B indică tubele de polen ce urmează să germineze;

235

- fig.3, reprezentări fotografice de secțiuni transversale prin antere identice din punct de vedere al dezvoltării de la linia naturală V26 de petunia (coloana din stânga) și planta cu deficit de CHS O2425.1 (coloana din dreapta), care au fost culese, fixate, incluse, secționate transversal și colorate cu albastru-toluidină, așa cum este descris în exemplul 3. Fig. 3A arată secțiuni prin natera întreagă imediat după dehiscență, atunci când anterele cu deficit de CHS sunt gălbui și ofilite. Măsura din fig. 3A reprezintă 200 μ M. Fig. 3B arată secțiuni prin anteră la, 48 h, după dehiscență, când anterele transgenice sunt umflate și albe. Fig. 3C arată secțiuni prin antere ca cele din fig. 3A, dar la mărimea reprezentărilor, din fig. 3B. Măsura din fig. 3B reprezintă 50 μ M. Fig. 3D reprezintă polenul matur la dehiscență. În fig. 3, P reprezintă polenul; E-endoteliul; S-stamine și C-cuticula;

240

245

- fig.4, reprezentare fotografică a refacerii germinării polenului și a creșterii tubei la polenul de petunia cu deficit de CMS, folosind flavonolul de refacere a fertilității, Kaempferol. Polenul a fost adunat de pe antere condițional fertile masculin, suspendat în mediu de germinare, cu adăugare de Kaempferol (K +, fig. 4C) sau DMSO (K-, fig. 4B) până la concentrația finală, de 1 μ M. Regiunile reprezentative de polen sunt fotografiate, după 4 h de incubare. Germinarea și creșterea tubei observate la polenul cu CMF salvată de Kaempferol (fig. 4C) nu este diferită de tipul sălbatic V26 de control (C, fig. 4A), care a primit doar DMSO. Polenul cu CMF nesuplimentată (fig. 4B) prezintă, la unele grăuncioare, umflarea porului germinativ, dar nici o tubă de polen nu se conturează;

250

255

- fig.5, profil HPLC al extractelor metanolice de stigmat de la tipul sălbatic V26 (fig. 5A) și de stigmat CMF (fig. 5B). Se produce absorbția la 360 nm a 100 μ l soluție de extracte preparate din 150 stigmat și fracționate în ingredient metanol - apă pe coloană C 18 cu fază reversă. Inserția, din fig. 5A este spectrul UV/vizibil a picului la 33,17 min și este identic cu cel produs de un standard Kaempferol autentic. Un profil HPLC și un spectru UV/vizibil al unui extract hidrolizat acid de stigmat V26 indică faptul că pic-urile cele mai mari la timpii de retenție 7,43; 10,10; 13,46 și 16,65 sunt glicozizii de Kaempferol și quercetină;

260

265

- fig.6, reprezentare grafică a frecvenței germinării polenului, în funcție de concentrația în creștere de aglicon flavonol, unde miricetina (triunghiuri goale) și 3 - hidroxi flavona (triunghiuri pline) au fost adăugate mediului de germinare (GM) la concentrațiile finale indicate, iar germinarea a fost măsurată, după 4 h de incubare. Frecvența medie a germinării măsurate în trei experimente separate este reprezentată grafic cu eroarea standard a mediei (SEM). Valorile SEM < 1,4 nu sunt vizibile. Frecvența germinării polenului de la tipul sălbatic de control V26 este, de regulă 75%, iar polenul cu CMF nesalvată, tratată cu DMSO produce o polenizare, între 1 - 2%.

270

Invenția de față diferă de abordările clasice ale sterilității masculine în reproducerea plantelor și producția de semințe prin aceea că este folosit un promotor de inducere pentru a regla exprimarea unei gene cunoscute a fi critică în microsporigeneză, adică în producerea polenului. Prima etapă în aplicarea acestei invenții este

275

deci selectarea unei gene de care este dependentă microsporogeneza. Unul din tipurile de gene considerate esențiale pentru microsporogeneză sunt cele care
280 afectează producerea de flavonoli.

Gene selectată este clonată, promotorul său nativ este eliberat, iar gena modificată este inserată într-o secvență de exprimare cu un promotor de inducere reactiv la control extern. De preferință, promotorul este unul care răspunde la aplicarea pe
285 plantă a unei substanțe chimice nefitotoxice specifice.

Folosind transformarea și substituția genei, gena "critică" este inactivată în genomul plantei și înlocuită cu gena obținută prin inginerie genetică și încorporată în secvența de exprimare împreună cu promotorul de inducere.

Această invenție este unică prin faptul că promotorul de inducere este folosit pentru a induce fertilitatea și nu sterilitatea. În această invenție secvențele de promotor ale genei selectate sunt îndepărtate, astfel, încât gena nu este transcrisă, iar
290 planta este sterilă masculin. Atunci când se dorește creșterea plantei sterile masculin, fertilitatea masculină este refăcută prin inducerea exprimării genei esențiale. În alcătuirea preferată acest lucru este îndeplinit prin tratarea plantelor sterile masculin în curs de creștere, cu o substanță chimică nefitotoxică specifică.

Se va lua în considerare faptul că sterilitatea masculină poate fi determinată prin modalitatea în care "gena critică" este "represată" și necesită substanța chimică pentru exprimare, sau prin modalitatea în care gena critică este activă", iar tratamentul chimic este necesar pentru producerea sterilității. Ce de-a doua metodă este descrisă în **WO 89/10396** de Mariani și colab., pe baza cererii internaționale
295 **PCT/EP 89/00495**.

Inducția prin tratament chimic a promotorului de inducere va fi dependentă de factori diverși asociați tratamentului chimic în sine lui de variate condiții de mediu la momentul tratamentului. Dacă genele critice erau normal active pentru a fi inactivate prin tratament chimic, eșecul tratamentului va duce la polenizarea directă, producerea
305 și vânzarea plantei naturale mai degrabă decât a seminței hibride. Regula privitoare la sămânță, ce guvernează vânzarea seminței hibride, presupune un grad înalt de puritate a semințelor, în așa fel încât, procentul de semințe care nu corespund specificației hibridului să fie menținut foarte scăzut. Din cauză că o plantă de porumb poate produce peste șase milioane de grăuncioare de polen, chiar și un insucces limitat al
310 tratamentului poate duce la un procent ridicat de polenizare directă. Din aceste motive invenția de față este aplicată, în așa fel, încât gena este normal "represată", iar trăsătura corespunzătoare nu este exprimată, astfel, încât în condiții normale nu se poate produce polenizarea directă. În plus, având gena esențială normal "represată", tratamentul chimic nu este necesar pentru producerea seminței hibride pe scară
315 largă, astfel, încât folosirea substanței chimice (și cheltuiala asociată) este redusă la minimum, iar riscul de eșec al tratamentului este prezent doar în producerea pe scară limitată și atent controlată a seminței genitoare când polenizarea directă este dorită. Întrucât eșecul tratamentului într-un asemenea caz duce la subproducție de polen și pentru că polenul este produs în mod normal peste necesar în cantitate mare, procesul din această invenție, pentru producerea seminței genitoare, va suporta o frecvență a insuccesului tratamentului, de 70 - 80% cu efecte minime asupra producerii
320 seminței genitoare.

Identificarea genelor esențiale pentru fertilitatea masculină

Procedurile de identificare și clonare a unei gene pentru sterilitate masculină sunt aceleași cu cele cunoscute în domeniu, folosite pentru clonarea altor gene. Metoda preferată este marcarea transpozonilor (elemente transpozabile), pentru că majoritatea situațiilor de sterilitate masculină genetică la porumb sunt rezultatul mutațiilor genei recesive. Tehnicile de clonare, ce necesită cunoașterea secvenței de proteine a produsului de translație a genei pentru sterilitate masculină, nu pot fi folosite în invenția de față pentru că nu este cunoscut încă produsul genic al genelor pentru sterilitate masculină.

325

330

Procedura de marcarea a genelor de porumb cu elemente transpozabile este cunoscută, așa cum a fost revăzută, de H.P. Doring, "Marcarea genelor cu elemente transpozabile de porumb. O vedere de ansamblu", Maydica 34 (1989): 73 - 88 și descrisă în brevetul **US 4732856** al lui Federoff ("Elementele transpozabile și proces de folosire a acestora"), ale căror descrieri sunt încorporate aici în totalitate.

335

Una din metodele prin care se realizează acest lucru este încrucișarea unui soi de porumb care poartă elemente transpozabile active și o alelă dominantă a genei țintă implicate în microsporogeneză, cu un soi normal de porumb care nu poartă elemente transpozabile. Gena specifică ce marchează eficiența poate fi și, de preferat, este mărită prin poziționarea elementului transpozabil în apropierea locusului genei țintă. Urmașii încrucișărilor sunt autoselecțaiți și apoi testați pentru cele mai folositoare mutații. Fenotipurile preferate sunt plante ce nu conturează antere și cele ce nu produc polen. Cele mai preferate sunt fenotipurile care nu conturează antere pentru că acest fenotip poate fi testat vizual prin observare înainte de vremea polenizării. Aceste plante sterile masculin reprezintă situații mutative în care un element transpozabil a fost excizat din locul său original și a fost transportat la un locus ce poartă o genă esențială pentru dezvoltarea polenului. Odată elementul transpozabil transpus într-un asemenea locus, gena este inactivată. Ulterior se va comporta ca o genă recesivă și va duce la sterilitate masculină. Aceste plante mutante pot fi încrucișate cu tulpini de testare pentru elementul transpozabil, pentru a confirma dacă elementul este încă prezent.

340

345

350

Odată ce a fost confirmată transpunerea elementului transpozabil dorit în gena țintă, clonele genomice care hibridizează pe elementul transpozabil. Secvențele adiacente elementului ale clonelor sunt apoi folosite ca probe în hibridizarea Southern cu ADN genomic din soiuri ce poartă acela mutantă, alela de revenire și alela tipului sălbatic. ADN-urile ce dezvăluie diferențele de mărime așteptate (reflectând prezența sau absența elementului transpozabil) poartă gena țintă modificată după dorință.

355

În practică, frecvența cu care poate fi țintit un locus particular cu un element transpozabil variază, între 10^5 - 10^6 . Totuși, 100000 de plante de porumb pot fi crescute cu ușurință pe o suprafață mai mică de 10 pogoane. În plus, în anumite circumstanțe frecvența mutațiilor induse de elemente poate fi crescută. De exemplu, elementul transpozabil particular ce se folosește pentru marcarea genei poate fi legat la gena ce urmează a fi marcată de către element. Pentru două sisteme diferite de elemente transpozabile, Ac și Spm/En, transpunerea elementelor se produce, de preferință, pe locurile de pe cromozom în care elementele au fost localizate înainte de transpunere. În mod alternativ diferite elemente transpozabile au diferite frecvențe de inducere a mutațiilor. De exemplu, elementul transpozabil numit Mutator (Mu) este

360

365

capabil să inducă mutații noi cu o frecvență, de 30 - 50 ori mai mare decât frecvența în plantele de control. În plus, rata inducției mutațiilor poate fi influențată de sexul genitorului purtător al elementului. Marcarea transpozonilor poate fi realizată cu ușurință, chiar dacă nu poate fi estimat care din încrucișările reciproce va da cea mai mare rată a mutațiilor.

Până în prezent au fost clonate cel puțin șapte elemente transpozabile de porumb diferite. Acestea sunt Ac, Spm/En, Mu, Tz 86, Bsl, rDt și Mpi 1. Oricare din ele poate fi folosit pentru a clona gene în care se găsește un element transpozabil.

O persoană ce posedă cunoștințe în domeniu va avea în vedere faptul că aceasta este doar, un exemplu, de modalitate de localizare a astfel de gene și faptul că sunt bine cunoscute și alte procedee.

Se cunoaște deja o colecție de gene mutante, ce a fost descrisă de Albertsen și alții "Citologie de dezvoltare a 13 locusuri pentru sterilitate masculină genetică la porumb", Can.J.Genet.Cytol.23: 195 - 208, 1981, încorporat aici prin referință. Acestea sunt cunoscute ca gene pentru sterilitate masculină (ms). Ele afectează dezvoltarea doar a polenului; nu au nici un efect asupra dezvoltării organelor feminine. Aceste gene întrerup microsporogeneza în etapele specifice ale dezvoltării polenului, făcând planta sterilă pentru partea masculină.

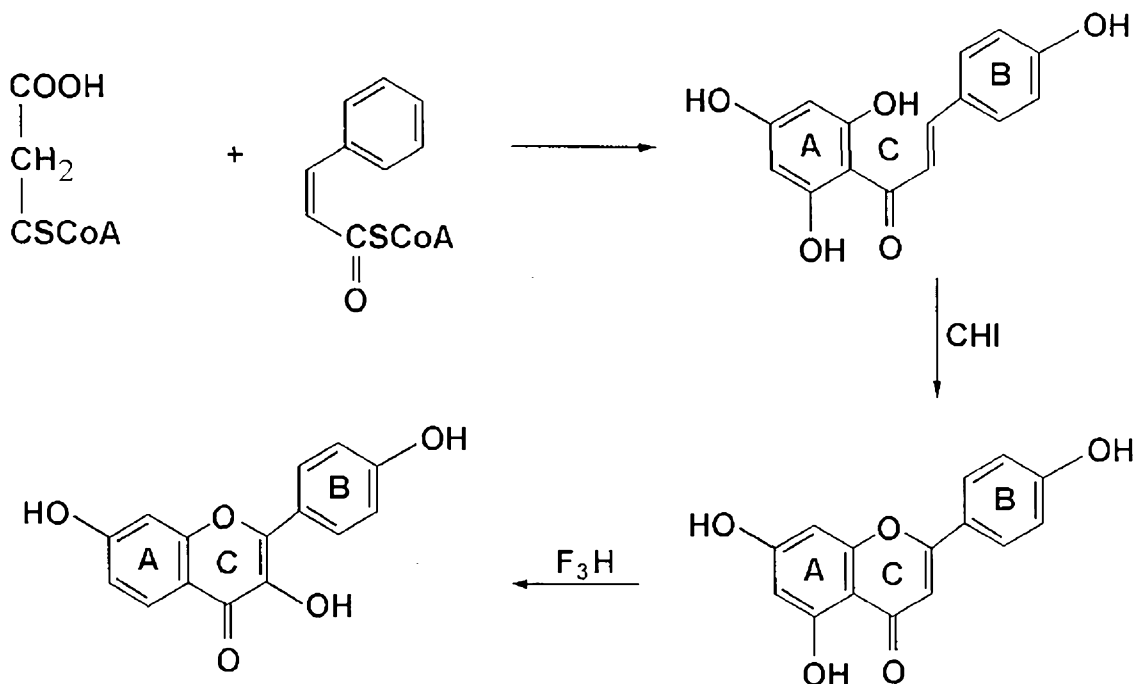
Odată clonată gena mutantă provenind din oricare din sursele anterioare, ea este folosită drept sondă pentru clonarea alelei tipului sălbatic. Acest lucru este posibil pentru că gena clonată este foarte asemănătoare cu alela tipului sălbatic și ca urmare, hibridizează cu ea. Odată clonată și identificată gena normală, este identificată regiunea din genă cunoscută drept regiune de promotor. Această regiune este implicată în inițierea transcripției acestei gene.

Genele esențiale pentru dezvoltarea polenului pot fi, de asemenea, identificate fără folosirea intermediară a mutațiilor, prin izolarea ARN mesagere ce sunt prezente doar în timpul dezvoltării polenului și prin construirea unui ADNc, care poate fi utilizat pentru sondarea fișierului genomic în căutarea genei corespunzătoare.

Descoperirea surprinzătoare ce a urmat a fost aceea că flavonolii, și anume unii dintre ei, pot afecta funcțiunile polenului și pot controla fertilitatea și sterilitatea prin producerea ori lipsa lor.

Fertilitatea unei plante cu deficit de flavonoid și condițional fertilă masculin (CMF) este refăcută prin punerea în contact a polenului plantei cu flavonoli de refacere a fertilității, ce sunt eficienți în intensificarea germinării polenului plantei. Într-un exemplu ilustrativ, condițiile adecvate se pot obține prin punerea în contact a polenului plantei cu o cantitate de flavonol de refacere a fertilității cu eficiență în creșterea germinării și a tubei polenului plantei. Așa cum a fost folosit în invenția de față, termenul de plantă cu deficit de flavonoid și condițional fertilă masculin sau CMF este desemnat să includă plante la care activitatea calconă-sintetazei (CHS) sau flavononă-3-hidroxilazei (F3H) a fost diminuată, natural sau transgenetic, pentru a întrerupe producția naturală de flavonoizi în plantă. În consecință, plantele cu deficit de flavonoid și condițional fertile masculin vor fi tipic lipsite de pigment, rezultând o corelație albă sau palidă și vor fi tipic autosterile. Deși invenția va fi descrisă în cele ce urmează cu amănunte, cu referire la petunii și porumb cu CMT, și alte plante cu CMF pot fi utilizate în mod similar în realizarea invenției.

În calea naturală de biosinteză a flavonolilor, calconă-sintetaza (CHS) leagă trei molecule de malonil-CoA și o moleculă de p-cumaroil pentru a forma calcononarin-
genina, care trece spontan (în proporție redusă) sau prin intervenția calconă-flavonon-
izomerazei (OHI) în naringenină. În etapa următoare a căii, F_3H catalizează adăugarea unei
grupări hidroxil la carbonul din poziția 3 a inelului C pentru a forma un flavonol necesar
pentru acțiunea de refacere a fertilității, conform invenției, de față. Calea generală
poate fi reprezentată în felul următor:



F_3H este enzima de limitare a vitezei de reacție în producerea flavonolilor și a fost
clonată anterior, din *Antirrhinum majus* (Martin, C., Prescott, a., Nackay, S., Bartlett,
J. Și Vrijlandt, E., 1991 "Controlul biosintezei la florile de *Antirrhinum majus*", The
Plant J., 1:37-39). Întrucât compușii de agliconi de flavonol sunt necesari pentru
fertilitatea masculină, cum s-a descris aici, un promotor de inducere, ce controlează
activitatea F_3H de hidroxilare, poate fi folosit în realizarea invenției.

Reducerea funcției masculine la plantele cărora le lipsesc flavonoizii ca urmare
a unui deficit de activitate a CHS, CHI sau F_3H duce la modificări de mică dimensiune
în dezvoltarea polenului până aproape de dehiscență, atunci când morfologia anterei
deviază de la normal, în culoare, formă și mărime. La dehiscență polenul rămâne
aglutinat în anteră, iar când este privit la microscop, o proporție semnificativă de
grăuncioare dintr-un loc apare mai ofilită decât în mod normal. Deși este produs și
dispersat polen viabil, germinarea polenului și creșterea tubei sunt mult diminuate,
atât *in vivo*, cât și *in vitro*. În plus față de sterilitatea masculină funcțională, plantele
cu deficit de flavonoli demonstrează unele aspecte de auto-incompatibilitate, așa cum
este arătat de faptul că polenul poate fi parțial recuperat de stigmatul plantelor din
tipul sălbatic, dar nu și de stigmatul plantelor cu deficit de flavonoli. Deși sunt
evidente elemente, atât de sterilitate masculină, cât și auto-incompatibilitate,
trăsăturile prezentate de polenul plantelor cu deficit de flavonoli constituie clar o stare
unică, desemnată în această descriere drept fertilitate masculină condițională. (CMF).

460

Plantele cărora le lipsește CHS (și deci le lipsesc flavonoizii) arată normal cu excepția a două trăsături: (1) lipsa unei pigmentări flavonoide și (2) producția de polen slab, complet dependent, pentru a funcționa, de pistiluri sălbatice (stigmat + stil).

465

În timp ce plantele cu deficit de CHS prezintă o lipsă de pigmentare flavonoidă și o scădere a funcțiunilor polenului, sunt evidente anumite diferențe și între speciile de plante. Polenul alb de porumb germinază pe mătasea știuletelui și produce o tubă de polen a cărei creștere este oprită în stil. În plus polenul mutant de porumb germinază *in vitro* și produce o tubă aproape la fel de lungă ca și polenul tipului sălbatic. În contrast cu el, polenul de la petunia cu deficit de CHS nu penetrează stigmatul și nici nu produce tubă, nici *in vivo*, nici *in vitro*. Această diferență dintre porumb și petunie poate fi explicată pe baza diferențelor fiziologice dintre polenul tricolular (porumb) și cel bicelular (petunia). Polenul bicelular are o proporție redusă a respirației când dispersează, formează a doua celulă spermatică după dispersare, poate rămâne pe stigmat câteva ore înainte de germinare și are viteză inițială de creștere a tubei de polen redusă. Prin comparație, polenul tricolular suferă cea de-a doua diviziune mitotică înainte de anteză, are o viteză crescută de respirație când dispersează, germinază în câteva minute după contactul cu suprafața stigmatului și are o viteză inițială de creștere a tubei mare. Deoarece, polenul tricolular este stabilizat să crească repede după dispersare, tuba polenului alb de porumb crește până la o lungime semnificativă înainte ca orice mecanism ce oprește creșterea tubei să acționeze.

480

485

La plantele cu înflorire în generații alternative, sporofitul diploid produce spori haploizi care cresc și se divid mitotic, producând gametofitul. O parte din ciclul de viață al gametofitului se desfășoară în timp ce sporul de polen care se dezvoltă se află în contact intim cu țesutul sporofitic înconjurător. Acest aranjament are potențial de interacțiuni diploid-haploid. În plantele heterozigote această interacțiune ar include, deci comunicarea haploid-haploid dintre cele două tipuri de gametofiți, așa cum este reprezentat, în fig. 1. Faptul că sterilitatea masculină la petunia cu deficit de flavonoid descrisă aici este dominantă genetic, în timp ce sterilitatea masculină a polenului alb de porumb este recesivă genetic, conduce la o concluzie interesantă privind care dintre gametofit sau sporofit este răspunzător de efect. La porumb, sterilitatea masculină este exprimată doar la plante homozigote recesive pentru ambele gene CHS, *c2* și *Whp*. Heterozigoții cu un singur exemplar funcțional *C2* sau *Whp* produc grăuncioare de polen galbene, fertile în proporție, de 100% (Coc, și alții., 1981). Astfel, în heterozigot, sporofitul CHS pozitiv sau 50% din gametofiții CHS pozitivi influențează exprimarea fertilității în gametofiții CHS negativi. La petunia transgenică sterilitatea masculină este asimilată ca o trăsătură dominantă, iar polenul produs de plantele heterozigote este steril masculin în proporție, de 100%. (În acest caz, sterilitatea este determinată, fie de inhibarea gametofiților CHS pozitiv de către gametofiții CHS supresați, fie de deficitul CHS în sporofitul transgenic (fig. 1). Bazele fiziologice ale deficitelor de CHS ce produc sterilitate masculină par să fie aceleași la porumb și la petunia, iar la ambele specii sporofitul este cel care determină fenotipul steril, mai mult decât gametofitul. Deci, fertilitatea masculină condițională asociată deficitului de CHS la petunia și porumb are o bază fiziologică comună.

490

495

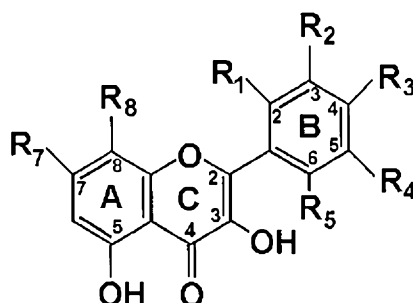
500

505

Controlul fertilității prin reglarea producției de flavonol este evident prin faptul că, s-a descoperit că este posibilă exploatarea producției de polen steril condițional,

de la plantele cu deficit de CHS, pentru a pune bazele unui test *in vitro* de recuperare a polenului. Prin incubarea polenului transgenic în soluție de germinare cu supliment de flavonoizi purificați sau extracte de plante și testarea pentru frecvența sporită de germinare și creșterea tubei de polen, pot fi identificați compuși specifici solicitați de funcționarea polenului. În acest fel s-a determinat faptul că familia largă a compușilor flavonoizi, în general, nu este egal eficientă în restabilirea fertilității la plantele CMF, ci mai degrabă un grup specific de agliconi flavonoizi de restabilire a fertilității este eficient în acest scop.

În aplicarea acestei invenții poate fi folosit orice flavonol care este eficient în susținerea germinării polenului. S-a descoperit totuși că majoritatea membrilor familiei relativ mari de flavonoizi sunt ineficienți în acest scop. Flavonolii cu eficiență deosebită în restabilirea fertilității pot fi identificați și folosiți la refacerea fertilității plantelor aflate în stare de CMF autosterile. Într-o alcătuire preferată a invenției, flavonolul de refacere a fertilității este un compus cu formula:



în care: $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7$ și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau alcooxil având 1 - 3 atomi de carbon. De preferat, ca maximum doi dintre radicalii R_1-R_5 să fie hidroxil sau metoxi și restul radicalilor;

R_1-R_5 să fie hidrogen, iar R_7 și R_8 să fie hidrogen, hidroxil sau metoxi. În cazul de față compușii flavonolici de refacere a fertilității în mod particular preferați și reprezentativi pentru invenție includ galangina, kaempferol, izoramnetin, quercetina și morina, care au structura chimică generală prezentată anterior, cu următorii substituenți:

Tabelul 1

FLAVONOL	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
Galangina	H	H	H	H	H	OH	H
Kaempferol	H	H	OH	H	H	OH	H
Izoramnetin	H	OCH ₃	OH	H	H	OH	H
Quercetina	H	OH	OH	H	H	OH	H
Morina	OH	H	OH	H	H	OH	H

Alți flavonoli utili în aplicarea invenției pot fi rapid determinați folosind procedeele de testare *in vitro* a recuperării polenului, prezentate anterior.

Cele pomenite anterior pot fi mai bine înțelese în raport cu exemplele următoare care sunt prezentate în scop ilustrativ și nu în sensul limitării.

550

Exemplul 1. *Fertilitatea petuniilor cu deficite de calconă-sintetază*

555

560

565

Petunia transgenică și cea naturală V26 au fost păstrate pentru o fotoperioadă de 16/8 într-o incintă de sticlă cu adaos de lumină de halogenură metalică la o intensitate de 300 - 600 $\mu\text{Mol.m}^{-2} \text{ s}^{-2}$. Linia naturală V26 este o linie pigmentată de *Petunia hybrida* care poate produce flavonoli în majoritatea țesuturilor plantelor, inclusiv în polen, antere și filamente, pistil (stigmat + stil) și este complet auto-compatibilă. Materialul transgenic analizat a constatat în doi regeneratori independenți transformați, 21838 și 21841 (Napoli C., Lemieux C., și Jorgensen R., 1990, "Introducerea unei gene himerice pentru calconă-sintetază la petunia determină co-represia reversibilă a genelor omologe la trans-indivizi", *Plant Cell* 2: 279 - 289) și indivizi din cea de-a doua generație de încrucișare inversă (BC_2) cu linia genitoare V26 (numerele populațiilor 2425 - 2435). Inserția de ADH-T în acești transformanți conține secvențe de ADNc pentru CHS legate de un promotor viral, acesta la rândul lui legat de o genă pentru neomicin-fosfotransformază II ca marker selectabil (Napoli și alții 1990). Încrucișările s-au realizat prin emascularea florilor, cu 24 h, înainte de aplicarea polenului. Toate florile transgenice utilizate pentru încrucișări au demonstrat lipsa unor semne vizibile de pigmentare. Donatorii de polen au fost aleși dintre plantele cu 2 - 3 antere dehiscente sau prin prelevare de fragmente de antere umflate predehiscente, așa cum s-a arătat.

570

575

580

585

590

Plantele de petunia transgenice 218.38 și 218.41 erau flori de culoare alb-pur după introducerea unei copii suplimentare a genei CHS. Atunci când s-a examinat expresia CHS în petalele transgenice, s-a detectat în ARNm o inducție de 50 de ori în comparație cu genitorul V26 netransformat sau reversanții somatici, atât la genele CHS endogene, cât și la cele introduse. Linia naturală V26 produce pigmenți de antocianină purpurii, în frunze, stem, pediculi, stiluri și filamente ale anterei, precum și calcone galbene în anterele în curs de dezvoltare. Prin comparație, plantele transformate nu au pigmenți flavonoizi detectabili în niciunul din aceste țesuturi. Lipsa pigmentului vizibil a fost confirmată prin analiza HPLC a extractelor metanolice, așa cum este descris în exemplul 6. În mod normal, chiar înainte de dispersare, anterele petuniei, pline cu polen matur, suferă desicarea. La dehiscență, atunci când capsula anterei se fisurează longitudinal, de-a lungul stomiumului, starea de deshidratare a țesutului determină cele două margini ale lobului anterei să se răsucească înapoi una față de cealaltă, expunând grăuncioarele de polen. Inspectarea atentă a plantelor transgenice nepigmentate relevă faptul că în cele 48 h dinaintea dehiscenței, anterele se deshidratează, scăzând în medie cu 40% în lungime și își schimbă culoarea de la alb-crem la gălbui. Prin comparație, anterele liniei genitoare V26 netransformate scad prin deshidratare doar cu aproximativ 15% și nu suferă o schimbare de culoare, rămânând galbene de-a lungul acestei perioade. O variație largă a frecvenței anterelor dehiscente se produce, între 0 - 100%, având frecvența maximă asociată cu umiditatea relativă cea mai scăzută. Deși dehiscența poate fi puțin amânată față de genitorul V26, anterele cu deficit CHS se deschid pentru a expune cantități normale de polen care nu este atât de deschis la culoare și de friabil ca polenul V26 și rămâne aglutinat în capsula anterei.

595

Nu au rezultat semințe din numeroasele încercări de polenizare directă a descendentului cu deficit de flavonoid al 218.41, ce au folosit fie (i) polen din anterele deshidratate, gălbui, dehiscente, fie (ii) fragmente de polen recoltate de pe antere

albe, umflate, predehiscente (a se vedea tabelul 2, coloana 5, "Încrucișări directe transgenice: 0 semințe/păstaie". Încrucișările directe ale liniei genitoare V26 produc în medie 225 semințe/păstaie. Acest lucru se extinde la aproximativ 17000 semințe posibile în cele 75 încrucișări directe ale petunii transgenice care s-au realizat. Toate plantele enumerate în tabelul 2 au fost testate pentru fertilitate feminină prin polenizarea stigmatelor cu polen de la linia naturală V26. În toate cazurile, s-au produs păstăi cu setul normal de semințe, arătând că plantele cu deficit CHS sunt fertile feminine. Încrucișarea reciprocă cu polenul transgenic cu deficit de flavonoid pe stigmatele V26, a dus la producerea unor cantități variabile de semințe, așa cum apare în tabelul 2:

Tabelul 2

*Producția de semințe din încrucișările cu polen transgenic
Număr de polenizări*

Polen transgenic V26 x				Încrucișări directe transgenice
Genitori de polen	0 semințe per păstaie	1-150 semințe per păstaie	>1-150 semințe per păstaie	0 semințe per păstaie
O2425.1 *	0	2	0	8
O2430.5	0	5	3	6
O2430.6	2	1	0	6
O2430.8	ND	ND	ND	6
O2432.2	ND	ND	ND	6
O2435.1	0	1	1	6
O2435.2	1	4	1	8
O2435.3	0	1	1	7
J2425.1 *	0	1	0	1
J2428.1	ND	ND	ND	6
J2431.2	2	3	0	6
J2432.3 *	3	0	0	7
J2430.5 *	3	2	0	2

* Florile de pe alte ramuri ale acestei plante au avut puțin pigment roșu purpuriu în corolă.

* Cel puțin 4 flori de pe fiecare plantă enumerată au fost polenizate cu polen V26 și toate au avut păstăi cu set complet de semințe.

Număr mediu de păstaie = 225

Din 36 încrucișări ce au inclus 10 plante transgenice diferite drept genitori masculini, 11 dintre ele nu au produs păstăi, 20 au produs păstăi cu mai puțin de 150 semințe/păstaie, iar 6 au produs păstăi cu mai mult de 150 semințe/păstaie.

Aceasta revine în medie la aproximativ 60 semințe/păstaie, adică o reducere cu 70% a setului de semințe. Aceste rezultate indică faptul că polenul de la plantele cu deficit de flavonoizi este nefuncțional pe stigmatele cu deficit de flavonoizi dar, în același timp este parțial funcțional pe stigmatele tipului sălbatic, comportare pe care am denumit-o în această descriere fertilitate masculină condițională (CMF). Variația largă a numărului de semințe din set pentru o polenizare la aceste rezultate ale încrucișărilor este posibilă datorită unor factori de mediu înconjurător și/sau de dezvoltare.

Este puțin probabil ca CMP să se datoreze inserției ADN-T într-o genă necesară fertilității masculine întrucât doi transformanți independenți, 218.38 și 218.41, prezintă, ambii, aceleași caracteristici: o lipsă completă de pigmentare flavonoidă și fenotipuri dominante de sterilitate masculină identice. O dovadă suplimentară pentru această concluzie se obține din observațiile lui Napoli și alții (1990), în care regeneratorii transformați revin uneori din punct de vedere somatic la plante pigmentate intens dar reținând transgenul, ceea ce arată că prezența transgenului singur nu suprimă exprimarea CHS endogenă.

Data fiind similitudinea cu polenul de porumb, CMF la petunia pare a fi determinată de un deficit de flavonoizi, cum ar fi, cel produs de suprimarea exprimării genei CHS sau F₃H.

Exemplul 2. Germinarea polenului și creșterea tubei

In vitro germinarea a fost realizată pe polen proaspăt, așa cum este descris în Mulcahy GB și Mulcahy DL, 1988 "Efectul mediilor îmbogățite asupra creșterii *in vitro* a polenului bi - și trinucleat", Plant Science 55: 213 - 216 (în această lucrare citat uneori ca "mediu germinativ" sau "GM"). Polenul unei singure antere a fost plasat într-un microtitru împreună, cu 50 μ l de mediu, balansat la temperatura camerei, timp, de 6 - 8 h și fotografiat cu film tehnic universal Kodak.

In vivo creșterea tubei de polen a fost măsurată, la 48 h, după polenizare, așa cum este descris de Herrero M. și Dickinson H.G., 1979, "Incompatibilitatea polen-pistil la hibridii de petunia: modificările pistilului după încrucișări intraspecifice compatibile și incompatibile", J.Cell.Sci., 36:1-18. Au fost vizualizate dopuri de caloză prin epifluorescență generată de excitarea la 355-425 nm (D cub) și suprimarea lungimii de undă de 460 nm de la un Aristoplan Loitz. Probele au fost fotografiate cu film Ektrachrome T 160 și s-au făcut copii de la un internegativ.

Viabilitatea polenului a fost determinată prin metoda fluorocromatică (PCR) (Hezlop-Harrison J. și Heslop-Harrison Y. 1970, "Evaluarea viabilității polenului prin fluorescență indusă enzimatic; Hidroliza intracelulară a diacetatului de fluoresceină", Stain Technol 45: 115-120), prin incubarea polenului proaspăt dehiscent într-o soluție de acetat de carboxifluoresceină (1 mM) în mediul de germinare. Epifluorescența a fost vizualizată în modul descris anterior.

Producerea de caloză

Tubele polenului de petunia perforază, în mod normal, stigmatul la aproximativ o oră după germinare (Herrero și Dickinson 1980) și crește în jos prin țesutul etilului, pentru a depune cele două celule spermatice în sacul embrionar. Caloza este un polimer polizaharidic cu legături glicozidice β (1-3), material, care, în mod normal se depune la intervale regulate sub formă de dopuri de-a lungul tubei de polen care crește. Caloza se vizualizează grație fluorescenței sale caracteristice, după colorarea cu albastru de anilină decolorat (Currier 1957; Eschrich și Currier 1964).

Germinarea și creșterea tubelor de polen la încrucișările directe ale florilor cu deficit de CHS și la încrucișările inverse ale acelorași plante cu polen V26, au fost ulterior examinate. Pistilurile au fost culese, la 48 h după polenizare, colorate cu albastru de anilină decolorat și examinate prin microscopie cu fluorescență. Un tip ordonat al depunerilor de caloză a fost observat de-a lungul stilului în trituratele de pistiluri cu deficit de flavonoizi polenizate cu V26. Pe de altă parte, nu s-a observat caloză în pistilurile petuniilor polenizate direct, chiar dacă în stigmat se găseau cantități serioase de polen.

Morfologia polenului și germinarea

S-a realizat o examinare microscopică a polenului proaspăt dispersat de plantele cu deficit de flavonoizi, din exemplul 1 și nu s-a observat nici o modificare evidentă. Polenul petuniei germinează imediat și produce o tubă, atunci când este incubat într-un mediu lichid simplu. Polenul germinat de la fiecare familie BC2 (2425 - 2435) de polen V26 a fost comparat *in vitro*. Aspectul tipic este prezentat în figura 2. Așa cum s-a arătat, după 6 h de creștere multe grăuncioare de polen mutant au germinat, lucru observat prin umflarea pronunțată în jurul unuia din porii germinativi (săgețile, în fig. 2), dar, doar maximum 2% din grăuncioarele de polen de la plantele cu deficit CHS produc o tubă cu lungime nedeterminată. Dintre grăuncioarele de polen care produc tube măsurabile, lungimea este sub 20% din lungimea tubelor de polen V26 crescute în condiții identice.

Pentru a se determina dacă polenul produs și dispersat de plantele cu deficit de flavonoizi a fost viabil, deci capabil de germinare și de creștere a tubei de polen, s-a realizat o analiză fluorocromatică (PCR) pentru viabilitate a polenului transgenic și V26 proaspăt dispersat. Acest test depinde de aportul unui compus de diacetat de fluoresceină în grăunciorul de polen și conversia ulterioară la fluoresceină de către enzimele intracelulare. Fluoresceina are o polaritate mare și rămâne sechestrată, cel mai probabil în citoplasma celulei vegetative, unde este vizualizată prin microscopie fluorescentă. Polenul natural V26 constă într-o proporție mare (până la 40%) de grăuncioare anormal de mici, PCR negative cărora le lipsește complet orice caracteristică internă. Câteva grăuncioare de acest tip pot fi văzute, în fig. 2A, inclusiv, cele două din centrul fotografiei. Această populație nu germinează niciodată și sunt cel mai probabil grăuncioare oprite în evoluție. Din grăuncioarele rămase (60%), aproape toate au fost pozitive la testul FCR, indicând prezența de membrane plasmactice intacte și esteraze citoplasmactice active. Polenul anterelor mutante reține marea proporție de grăuncioare deshidratate, oprite în evoluții. Dintre grăuncioarele cu aspect normal rămase, peste 90% au fost FCR pozitive. Faptul că majoritatea polenului produs de plantele cu deficit de flavonoizi a fost viabil și metabolic activ indică faptul că sunt necesare anumite aspecte ale activității flavonoizilor pentru o germinare și o creștere a tubei de polen normale.

Exemplul 3. Observații microscopice asupra dezvoltării anterei

Pentru a determina dacă lipsa de activitate flavonoidă în cursul microsporogenezii a alterat arhitectura celulară a grăuncioarelor de polen sau a țesuturilor anterei pe cale de dezvoltare, a fost comparată dezvoltarea polenului la planta V26 și la planta cu deficit de flavonoizi O2425.1. S-au recoltat antere în lungime cuprinsă, între 0,1 - 6 cm, de la o serie de muguri de petunia aflați în diferite etape ale dezvoltării, s-au fixat, în 2% paraformaldehidă, 1,25% gluteraldehidă, la pH = 7,2, înglobate

în rășină Spurr's, apoi s-au secționat la 1 μ M și s-au colorat cu albastru de toluidină. S-au făcut microfotografii cu film tehnic universal Kodak. Din punct de vedere histologic, acestea prezintă toate etapele microsporogenezei, de la cel mai precoce semn de diferențiere a țesutului arheosporului până la antera pre-dehiscentă plină cu polen matur. S-a acordat o atenție deosebită dezvoltării și dezintegrării ulterioare a tapetumului, întrucât, se presupune că, acest țesut este sursa flavonoizilor din polen. În nici una din etape antera transgenică și microsporii pe cale de dezvoltare nu au prezentat diferențe histologice majore față de V26. S-au făcut secțiuni suplimentare prin anterele cu deficit de flavonoizi în cursul trecerii de la starea hidratată și albă la starea deshidratată, gălbuie, și comparate cu etapele similare la V26 (fig. 3). Înaintea dehiscenței, celulele stratului endotelial se extind în mod normal în sens radial, se îngroașă și depun un material presupus a fi implicat în mecanismul ruperii anterei (Cutter, E.g., 1978, "Anatomia plantei: Experiment și interpretare, Partea I", Celles and Tissues, 2nd Ed., London: Arnold). Acest strat nu este continuu, lipsind în zona ce înconjoară stomium-ul. Secțiunile prin auterele deshidratate, gălbui, nu prezintă anormalități majore la nivelul stratului endotelial, stomium-ului sau cuticulei ce înconjoară antera. Cu toate acestea, atunci când este comparat cu polerul V26 (fig. 3, coloana "V26"), s-a observat prezența unei proporții mai mari de grăuncioare ofilite, lipsite de caracteristici interne la nivelul loculelor plantelor transgenice, iar grăuncioarele mai mari sunt mai heterogene din punct de vedere al mărimii formei și intensității colorației (fig. 3C și 3D). Heterogenitatea prezentată în fig. 3C și 3D poate fi o explicație pentru faptul că polenul este dispersat într-o stare mult mai deshidratată, decât în mod normal, iar când este pus într-un mediu lichid de germinare, se rehidratează până la starea normală.

Exemplul 4. *Extracte de flavonoizi de petunia*

Analiza extractelor de polen de petunia au identificat flavonoizii majori ca fiind 3-O-glicozici de quercetin și kaempferol, 4,2', 4', 6'-tetrahidroxicalconă și un dihidroflavonol, taxifolina (Zerback, R., Bokel, M., Gieger, H. și Hess, D., 1989, Phytochemistry 28: 897-899; Zerback, R., Dresser, K., și Hess, D., 1989, Plant Science 62: 83-91; De Vlaning, P. și Koh, K.F.F., 1970, Phytochemistry 15: 348-349). Polenul de porumb conține, cel puțin 10 glicozizi de kaempferol, quercetin și izoramnetin (Ceska, O., și Styles., E.D., Phytochemistry 23: 1822-1823). Extractele apoase din tipul sălbatic și cel natural de petunia linia V26 au fost obținute prin macerarea stigmatelor cu pensete sau agitarea unei suspensii de polen în mediu PEG 4000, (W.Johnen, W.M., Lush, A.E. Clarrke, 1989, Plant Cell 1: 501), menționat de acum înainte ca GM, centrifugarea timp, de 5 min, într-o microcentrifugă și adăugarea de părți din supernatant direct la o suspensie de polen CMF în GM într-o placă cu microorificii de 96. Extracti cu metanol a urmat același protocol cu excepția faptului că extractul a fost uscat în vid și resuspendat în GM înainte de adăugarea suspensiei de polen. Experimentul de recuperare inițială a obținut o proporție a germinării de 33%, folosind 20 μ l (o cincime din volumul total) dintr-un extract apos preparat din zece stigmat V26. Ca probă de control, s-au preparat, în același mod, extracte de stigmat și polen de la plantele CMF. În testele de germinare a polenului doar extractele de stigmat și polen de V26 au fost capabile să restabilească germinarea și creșterea tubei la polenul cu deficit de flavonoizi.

Extractele de polen și stigmatate de la tipul sălbatic și CMF au fost analizate după cum urmează. Stigmatatele și polenul au fost extrase, întâi cu 50% metanol, apoi cu 100% metanol, apoi extractele au fost amestecate și concentrate. S-au produs agliconi prin hidroliză acidă: extractul a fost amestecat V/V cu 4N HCl închis ermetic într-un balon de 2 ml și hidrolizat în baie de apă fiartă, timp de 40 min. Probe identice au fost injectate într-o coloană C18 cu fază reversă (Phenomenex Spherisorb 50DS 2 250 x 4,6 mm). Solventul A a fost acid acetic 5%, iar solventul B, acid acetic 5% în 30% acetonitril. Fiecare trecere a constat într-un gradient izocatic de 6 min (20% B) urmat de un gradient linear de 20 min, la 20% B și încheiat izocratic, la 95% B, timp, de 14 min. Viteza de curgere a solventului a fost 0,5 ml/min, la temperatura camerei. Detectia s-a făcut cu un detector cu sistem de fotodiode Hewlett Packard Model 1040 A, la 360 nm. Kaempferolul a fost detectat în extractele de stigmat din tipul sălbatic la 60 ng sigma, iar quercetinul la nivele mult mai mici. Extractele identice dintr-un amestec de 150 sigmate CMF sau 500 antere CMF nu au produs nici un "pic", dând un spectru tipic de flavonol.

775

780

785

Tratarea extractului de stigmatate din tipul sălbatic cu enzime proteolitice, căldură și trecerea prin membrane de dimensionare a moleculelor demonstrează faptul că structura compusului activ a fost o moleculă mică neproteinică. Greutatea moleculară a compusului activ a fost apreciată prin trecerea extractului printr-un filtru cu pori corespunzători greutatei moleculare de 3000 daltoni (Centricon-30, Amicon) și stabilirea dacă substanța cu activitate de refacere a polenului a trecut prin filtru. Extractele apoase de stigmatate și polen V26 au fost tratate cu 0,025 unități de papaină, timp de 30 min, la 37°C, într-un volum de reacție de 100 μ l. Activitatea enzimatică a fost verificată prin tratarea BSA (0,5 mg/ml) în aceleași condiții și prin examinarea produselor de digestie, în gel de electroforeză, cu SDS - poliacrilamidă (PAGE). Nici proteaza, nici tratamentul termic (100°C, 5 min) nu au înlăturat capacitatea extractelor de a reface germinarea polenului și creșterea tubei la CMF.

790

795

Coroborate, aceste rezultate indică faptul că flavonoizii prezenți în polenul tipului sălbatic joacă un rol în germinarea polenului și faptul că stigmatatele tipului sălbatic conțin compuși similari care pot compensa lipsa flavonoizilor din polenul CMF.

800

Exemplul 5. Recuperarea prin flavonoli a fertilității CMF

Refacerea biochimică a polenului cu deficit de flavonoizi, din exemplul 1 a fost realizată prin adăugarea unei concentrații mici (1 μ M) de kaempferol, un aglicon flavonolic, la o suspensie de polen CMF în mediu de germinare (GM). Așa cum se arată, în fig. 4, de-a lungul unei perioade de creștere, de 12 h s-au făcut comparații membru cu membru, confirmându-se faptul că germinarea a început simultan, iar creșterea tubei s-a produs în aceeași proporție și până la aceeași lungime la polenul CMF recuperat (K⁺) față de polenul V26 tipul sălbatic, care nu a primit supliment de flavonol (C). Recuperarea a fost aproape completă, polenul cu supliment de flavonoizi a prezentat o frecvență a germinării de 80% față de polenul V26. Polenul CMF la care s-a adăugat doar solventul DMSO (K⁻) nu a prezentat o germinare semnificativă (1-2%), iar tubele de polen dacă au germinat puțin, nu au progresat niciodată mai mult de două diametre de grăuncior de polen.

805

810

Pentru a confirma faptul că extractele de stigmatate din tipul sălbatic, care sunt capabile să recupereze germinarea polenului și creșterea tubei, conțin kaempferol, extractul nehidrolizat a fost fracționat prin HPLC și analizat prin spectroscopie de

815

absorbție UV/radiații vizibile. Un "pic" având un timp de retenție și spectre tipice pentru flavonoli (maximum de absorbție, în jurul a 260 și 360 nm) a fost detectat în extractul de stigmat de V26 (fig. 5A și insertia). Acest "pic" putativ al kaempferolului a fost selectat, evaporat până la uscare, resuspendat în DMSO și adăugat mediilor GM *in vitro*, unde s-a obținut o germinare și un răspuns de creștere a tubei complete din partea polenului CMF. Repetarea cromatografiei acestei fracțiuni active cu un standard de kaempferol autentic, a confirmat puritatea și identitatea lui. Din această analiză a 150 stigmat, cantitatea de kaempferol într-un stigmat de V26 s-a determinat a fi de 60 ng/stigmat. Considerând un volum al stigmatului de V26, de 34 μ l (dezlocuirea de volum), concentrația de flavonoli în stigmatul de V26 este, de aproximativ 6 μ M, nivel ce este capabil să determine un răspuns de germinare puternic. O analiză identică a extractelor dintr-un amestec de 150 stigmat CMF sau din 500 antere CMF nu a obținut "pic"-uri de spectru tipic pentru flavonoizi (a se vedea, fig. 5B). Extractele de polen și antere V26 nu produc o cromatogramă similară cu aceea prezentată, în fig. 5, iar "pic"-ul eluent având un timp de retenție și spectru UV/radiații vizibile ce indică kaempferolul, atunci când a fost adăugat la CMF în GM a stimulat din plin germinarea polenului. Această analiză confirmă că kaempferolul este prezent în polenul și anterele tipului sălbatic.

Caracteristicile structurale necesare pentru activitatea de recuperare a polenului

Extractele de polen și stigmat din tipul sălbatic de petunia conțin alți compuși, alături de kaempferol, care pot și ei stimula germinarea polenului și creșterea tubei (a se vedea fig. 5A). De aceea au fost testate, pentru activitatea de recuperare a polenului, compuși reprezentativi din toate clasele mari de flavonoizi: flavone, flavonone, flavonoli, izoflavonoizi, calcone, antocianine și catechine după cum urmează. Grăuncioarele de polen de petunia au fost suspendate în mediu de germinare (GM) PEG 4000 la o densitate de $1 - 2 \times 10^4$ /ml iar părți alicote de 100 μ l din suspensie au fost puse în orificiile unei plăci cu 96 microorificii și incubate, la temperatura camerei, sub agitare, la 150 rot/min. Alte suplimente au fost adăugate direct în GM, înainte de punerea polenului. Soluțiile de bază de flavonoizi și alte substanțe chimice s-au realizat direct în dimetilsulfoxid (DMSO) și puse în fiecare orificiu până la concentrațiile finale indicate în tabelul 4. Concentrația DMSO menținută constantă, la 1% în fiecare test. Polenul a fost notat ca germinat când tuba a depășit în lungime un diametru de grăuncior de polen. Practic toate grăuncioarele care germinează produc o tubă mai lungă decât 5 diametre de grăuncior de polen. Petunia V26, așa cum s-a descris în exemplul 1, produce două tipuri de polen matur, aproximativ 25% din grăuncioare sunt mici, fără caracteristici interne și nu germinează niciodată *in vitro*. De aceea, germinarea completă survine la V26, atunci când 75% din totalul grăuncioarelor de polen au germinat.

Polenul de petunia CMF din exemplul 1 menține aceeași proporție. În majoritatea experimentelor de recuperare frecvența maximă a germinării este de 89% din grăuncioarele viabile. După 4 h de incubare s-au notat minimum 1000 grăuncioare de polen în fiecare test. Concentrațiile cele mai mici ale compușilor testați, necesare pentru obținerea unui răspuns de germinare sunt prezentate în tabelul 3 ce urmează, în care NR indică lipsa răspunsului. Compușii care produc germinare, sub 20%, la 10 μ M sunt indicați drept > 100 M.

Pe lângă compușii enumerați în tabelul 3, au fost testați și nu au produs răspuns substanțe neflavonoide ca acid *p*-cumarinic, acid salicilic, hidrochinonă, acid clorogenic, acid dihidroascorbic, acid naftilftalmic (NPA), acid 1-naftalen acetic (NAA), acid indol - 3 acetic (IAA), acid giberelic (GA 3).

Tabelul 3

Compusul	Concentrația pentru răspuns (M)
Flavonoli	
Galangina	1
Kaempferol	1
Isoramnnetină	1
Quercetină	10
Morină	10
Myricetină	100
Fisetină	100
3-hidroxi flavonă	>100
Dihydroflavonoli	
Taxifolină	>100
Flavone	
Flavonă	NR
7-hidroxi flavonă	NR
Apigenină	NR
Luteolină	NR
Flavonone	
Flavononă	NR
Naringenină	NR
Eriodictiol	

Așa cum se poate vedea din tabelul 3, flavonolii agliconi au recuperat cu succes frecvența maximă a germinării și capacitatea de creștere a tubei ale polenului CMF, dar, printre alte clase de flavonoizi doar cele foarte asemănătoare, dihidroflavonoliitaxifolina, au produs un răspuns modest (18%), la 100 μ M (fig. 4). În plus, au fost testate câteva clase de compuși neflavonoizi, ca acizi fenolici, antioxidanți și reglatori de creștere a plantelor, dar nici unul nu a fost capabil să refacă germinarea polenului. Deci, capacitatea de recuperare a funcției polenului la concentrații relevante din punct de vedere fiziologic pare a fi determinată de flavonoli.

900 Din gama flavonoizi testați au fost identificate cinci cerințe structurale generale pentru germinarea polenului și creșterea tubei. Există o necesitate absolută de o grupare hidroxil nesubstituită la C₃ și de o grupare ceto - în poziția 4 în ciclul C de atomi de carbon. Un răspuns maximal depinde de o legătură nesaturată C₂ și C₃ în ciclul C de atomi de carbon și de gradul de substituie a grupurilor hidroxil din ciclurile A și B.

905 Mai interesant de remarcat este că, flavonolii glicozilați în poziția 3-hidroxil sunt inactivi deși sunt de departe cei mai abundenți flavonoli din țesuturile vegetale, inclusiv din polenul și stigmatul petunii. Nu s-a obținut germinarea polenului la testarea cu querciten-3-o-glucozid și rutină (quercetin-3-o-rhamnoglucosid), la concentrații până la 100 μM. Necesitatea unei grupări ceto - la poziția 4 în ciclul C este indicată de faptul

910 că catechina, care nu are grupare cet-, este inactivă. O comparare a eficiențelor relative ale taxifolinei (~ 18%, la 100 μM) arată că o dublă legătură, între C₂ și C₃ din ciclul C crește răspunsul, de aproape 30 ori. O comparare a quercetinei cu fisetina sau 3 - hidroxiflavona arată că fiecare grupare hidroxil în plus, fie în poziția 5, fie în poziția 7 a ciclului A crește răspunsul, de aproximativ 10 ori. Această creștere poate

915 depinde în mare măsură de efectul stabilizator al interacțiunii dintre gruparea hidroxil 5 și gruparea adiacentă ceto în ciclul C.

În sfârșit, substituțiile hidroxil în ciclul B nu sunt necesare pentru activitatea completă; și de fapt, creșterea numărului de grupări determină scăderea activității a se compara kaempferolul cu quercetina și muricetina). Această diferență poate fi datorată unui aport scăzut sau unor legături nespecifice crescute, cauzate de natura polară dăunătoare a flavonolilor cu grupări hidroxil numeroase.

920

S-au citat câțiva flavonoizi inactivi care antagonizează inducția flavonoizilor activi dată de genele modulatorie în sistemul legumei Rhizobium Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. Și Rolfe, B.G., 1987, EMBO 6: 1173-1179; Peters.,

925 N.K. și Long, S.K., 1988, Plant Physiology 88: 396 - 400). Compușii inactivi în recuperarea funcției polenului au fost testați pentru capacitatea lor de a antagoniza acțiunea agliconilor flavonoli, după cum urmează. Polenul CMF, așa cum s-a descris în exemplul 1, în GM, a fost pus în contact cu compuși inactivi, la concentrații, de 1 și 10 μM, timp de 30 min, înainte de a adăuga kaempferol la 1 μM. Experimentul a fost,

930 de asemenea, efectuat prin adăugarea simultană, în suspensia de polen, a compusului inactiv și a kaempferolului în raport de 1:1 sau 10:1. Frecvența germinării polenului a fost estimată, după 4 h de incubare și nu s-a depistat acțiunea de antagonizare, în nici una din combinațiile testate. Au fost testați următorii compuși inactivi: apigenina, calconă, eriotictiol, flavone, flavonone, euteolină, naringenină, catechină, acid clorogenic, acid *p* - cumarinic, hidrochinonă și acid salicilic.

935

Exemplul 6. Efectele UV

Parțial, datorită capacităților lor de a absorbi lumina UV, se postulează că flavonoizii funcționează drept protectori de UV la plante (W.Jahnen și K.Hahlbroch, 1988, Planta 173:453). Pentru a determina dacă lipsa germinării la polenul cu deficit

940 de flavonoizi s-a datorat efectelor UV, s-au efectuat experimente de germinare la întuneric, cu 3 variante. Polenul a fost adunat de la (1) flori care au fost adunate și păstrate (în apă) la întuneric complet, timp de 24 h sau de la (2) flori proaspăt culese. Din aceste două surse s-au preparat suspensii de polen în GM cu sau fără flavonoli, lucrând într-o cameră obscură cu lumină roșie de siguranță. A treia variantă a presupus prepararea suspensiei de polen de la flori proaspăt adunate, lucrând la lumină,

945

dar adăugând soluția de flavonoli la întuneric. Toate probele au fost învelite în folie și incubate, după cum s-a descris în exemplul 5. Nu a existat un efect decelabil al luminii asupra frecvenței germinării, atât pentru V26 de control, cât și pentru polenul cu deficit de flavonoizi, cu sau fără adaos de flavonoli.

Pentru a determina dacă lumina UV a afectat fertilizările directe, plantele mature au fost crescute timp de câteva săptămâni sub un filtru, de 610 nm, așa cum este descris în L.P. Taylor și W.R. Briggs, 1990, Plant Cell 2: 115. Mugurii de petunia au avut nevoie de aproximativ 2 săptămâni pentru a se forma și matura, de aceea, doar acei muguri formați după ce plantele au fost puse sub filtru, au fost testați, iar cei care nu au fost expuși la lumină sub 610 nm au fost fertilizați direct. Nu s-a produs formarea de semințe în nici una din încercările de încrucișare, dar toate încrucișările directe ale V26 de control, efectuate în aceleași condiții, au format păstăi cu set întreg de semințe.

Exemplul 7. Efectul timpului de expunere la flavonoli

Durata expunerii la flavonoizi, necesară pentru germinare completă și creștere la maximum a tubei, a fost determinată prin variații de timp, în care germinarea polenului s-a produs în prezența flavonolilor. O concentrație de kaempferol calculată pentru a determina o recuperare aproape maximală și totuși, ușor de îndepărtat prin spălare (0,5 μ M concentrație finală) a fost adăugată într-o placă Petri de 60 x 15 mm ce conține o suspensie rezultată a fost centrifugată continuu, la 150 rot./min. La momentele indicate în tabelul 4, au fost luate părți alicote, de 400 μ l centrifugate, spălate, în 1 ml GM pentru a îndepărta kaempferolul, recentrifugate, resuspendate, în 400 μ l GM și împărțite în două. O parte alicotă, de 100 μ l a fost din nou îmbogățită, cu 0,5 μ M kaempferol (control), iar cealaltă a fost lăsată să continue creșterea fără expunere suplimentară la flavonoli (tratată). Creșterea a fost lăsată să se producă într-un timp total, de 4 h, de la momentul formării suspensiei originale, apoi frecvența germinării și lungimea tubei au fost estimate, atât în germinarea de control, cât și în cea tratată. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4:

Tabelul 4

Polen tratat		Control	
Timp de expunere (min)	Germinare (%) [*]	Lungimea tubei ^{**}	Germinare (%) [*]
0	3,7 ± 1,5	2x	48,3 ± 25,7
10	6,6 ± 2,7	2x	55,5 ± 8,6
20	15,7 ± 9,2	2-3x	47,9 ± 7,0
30	13,8 ± 1,7	2-3x	44,4 ± 3,7
60	38,9 ± 2,9	3x	48,4 ± 1,3
120	47,3 ± 3,6	>5x	47,7 ± 2,2

^{*} medie ± SEM, n = 3

^{**} raportată la diametrul grăunciorului de polen.

Cum se vede în tabelul 4, a fost depistată o creștere măsurabilă a germinării la un timp de expunere, de cel puțin 10 min (Tabelul 1). Un timp de expunere, între 1-2 h a fost necesar pentru frecvența maximală a germinării și lungimea maximă a tubei.

Exemplul 8. Recuperarea fertilității in vivo

Capacitatea de a reface fertilitatea directă la petunia CMF, prin furnizarea de agliconi flavonolici polenului, în momentul polenizării, a fost testată prin evaluarea fertilizărilor reușite rezultate din încrucișările directe ale petuniei CMF, realizate în prezența suplimentului de flavonoli. Înaintea polenizării directe, agliconii flavonolici au fost administrați (i) direct pe stigmat sau (ii) în amestec cu polenul proaspăt recoltat. Cea mai reușită tehnică, apreciată prin cantitatea de semințe în set complet, a necesitat aplicarea flavonolului pe stigmat, la 12-16 h, înainte de polenizarea directă. S-au realizat 47 de încrucișări directe cu adaos de kaempferol sau quercetină și aproape 60% (27 din 47) au produs păstăi cu semințe. Numărul de semințe pe păstaie a variat între 31 și 287, iar testele de germinare > 90% din semințele unei singure păstăi au fost viabile. Nici una din încrucișările directe realizate fără adaos de flavonoli (>30 încercări) nu a produs semințe în set.

Caracteristica CMF dominantă prezentată de petunia cu deficit de flavonoizi este strâns legată de o a doua genă dominantă ce conferă rezistență la kanamicină (KAN) (Napoli, C., Lemieux, C. și Jergensen, R., 1990, "Introducerea unei gene himerice pentru calconă-sintetază în petuna produce o co-represie reversibilă a genelor omologe la trans-", *Plant Cell* 2: 279 - 289). Markerul KAN a fost utilizat pentru a testa segregarea caracterului CMF în semințele produse prin încrucișarea directă a plantelor cu deficit de flavonoizi în prezența adaosului de flavonol. Semințele proaspăt culese au fost sterilizate la suprafață în înălbitor 20%, spălate cu apă sterilă și înmuiate, timp, de 30 min, în 100 ppm soluție GA 3, înainte de aplicarea lor pe plăcile de germinare (1 x MS, 3 mM MES !pH = 5,6], 1 x B5 amestec de vitamine, 3% sucroză și 0,2% agent de solidificare), care conțin 100 μ g/ml kanamicină. După creșterea, la 23°C, suplimentat cu o fotoperioadă de 16/8 h, rezistența la kanamicină a fost apreciată prin testarea răsadurilor sensibile la kanamicină. În tabelul 5, P- valoarea reprezintă nivelul semnificativ observat pentru un grad de libertate al testului Chi pătrat.

Tabelul 5

Răsaduri

Păstaie	Total	KAN	KAN	P(3:1)
1	75	58	17	0,74
2	65	50	15	0,83
3	81	59	22	0,75

Semințele germinate în prezența a 100 μ g/ml kanamicină au segregat în proporție de 3:1 pentru rezistență KAN:sensibilitate KAN, așa cum era de așteptat pentru o trăsătură heterozigotă dominantă, așa cum este prezentat în tabelul 5.

Exemplul 9. Testarea în cultură

Testarea în cultură s-a efectuat folosind un mutant de porumb cu deficit de flavonoizi natural apărut, cu polen alb, lipsit de activitate flavonoidă, care produce polen alb, nefuncțional și este autosterilă (H.H.Coo, S.M.MoCormick, S.A. Modena, 1981, *J.Hered.* 72:318). S-au efectuat în total 45 de încrucișări directe, în prezența

unui adaos de flavonoizi, toate (100%) producând știuleți compleți, în același timp încrucișările directe (45 încercări) făcute fără adaos de flavonoizi au prezentat seturi de semințe la mai puțin de 1% decât normal. Plantele de porumb cu polen alb folosite au avut mutații recesive stabile la C₂ iar Whp a pătruns într-un fond natural W23. Plantele cu polen alb (C2/c 2 Whp/Whp) au fost menținute prin încrucișarea cu polen de la plante izogenice care purtau un singur exemplar funcțional al CHS (C2/o2 whp/whp). Plantele au fost sterile masculin în încrucișările directe și reciproce și nu au produs pigmenți flavonoizi vizibili în nici un țesut, inclusiv polen și semințe. Tehnici genetice de cultură standard au fost folosite pentru a se asigura că mătasea plantelor cu polen alb nu este atinsă de polen de contaminare. În plus, blocul de polen alb a fost înconjurat cu o varietate de bob pigmentat, astfel, încât să poată fi recunoscut imediat orice boabe de contaminare. Polenul alb mutant, de la 50 - 100 plante, a fost colectat din săculeții spicului, amestecat și împărțit în două. O parte, a fost folosită, ca atare, pentru încrucișări, iar cealaltă parte, amestecată în proporții, de aproximativ 20:1 cu flavonoizi uscați (fie quercetină, fie kaempferol, fie un amestec 50:50 al celor două). Mătasea preparată a plantelor cu polen alb a fost polenizată cu polenul alb, atât cel netratat, cât și cel cu supliment de flavonoizi, și, apoi, adunată imediat. Știuleții maturi au fost recoltați, la 45 zile după polenizare. Încrucișările cu polen alb formează de obicei aproximativ 200 de boabe pe știulete, iar acest număr a fost obținut cu regularitate în încrucișările directe completate biochimic. S-a efectuat un total de 45 încrucișări directe, în prezența adaosului de flavonoli și toate (100%) au produs știuleți compleți; în același timp încrucișările directe (45 de încercări) făcute fără adaos de flavonoli au prezentat set de semințe în mai puțin de 1% față de normal.

Experimentele anterioare confirmă că flavonoizii sunt necesari pentru funcția polenului, după cum urmează: (i) metanolul și extractele apoase de stigmat și polen din tipul sălbatic pot reface complet germinarea și creșterea tubei la polenul cu deficit de flavonoizi; (ii) aceste extracte conțin aceiași flavonoli, care sunt activi în testul de recuperare a fertilității *in vitro* descris anterior; (iii) capacitatea de a recupera germinarea polenului și de a reface complet creșterea tubei *in vitro*, ca și obținerea de semințe în set complet *in vivo* este restrânsă la o clasă specifică de flavonoizi, agliconii flavonoli; (iv) concentrația eficientă de flavonoli variază în funcție de caracteristicile structurale, dar câțiva compuși prezintă o eficiență deosebită la nivele sub 10 μ M, relativ apropiat de concentrațiile fiziologice ale acestor compuși.

Flavonoizii sunt produși teoretic de toate clasele de plante, de la mușchi hepatici, mușchi frunzoși și ferigi până la gimnosperme și angiosperme. Observațiile anterioare asupra flavonoizilor au folosit deseori țesut uscat de frunză sau rădăcină de la specii erbacee; în consecință, nu avem un indicator bun despre cât de răspândită este prezența flavonoizilor de polen. Prezența lor ubicuitară în țesuturile plantelor și faptul că flavonoizii au fost identificați în extractele de polen de la câteva specii foarte diferite, ar argumenta faptul că flavonoizii reprezintă un constituent universal al polenului. Majoritatea flavonolilor vegetali apar la speciile 3-O-glicozilate (J.B. Harborne și C.a. Williams, 1988, în "Flavonoizii, progrese în cercetare începând din 1980" J.B. Harborne, Eds. (Chapman and Hall, London) cap. 7, 8), aceasta fiind forma predominantă în polenul de petunia (O. Ceska și E.D. Styles, 1984, *Phytochemistry* 23:1822). Doar forma de aglicon poate recupera funcția polenului, lucru care sugerează, atât faptul că, în mod normal sunt prezente nivele nedecelate de agliconi, cât

și faptul că este necesară activitatea glicozidazei pentru a produce agliconii ceruți de fertilizare.

Polenul prezintă calea naturală de acces pentru manipularea procesului de fertilizare. Pierderea exprimării flavonoide, concretizată în plantele CMF, acționează ca un gametostatic natural și nu ca un gametocid. Funcția masculină completă poate fi refăcută prin aplicarea externă de flavonoizi asupra polenului cu deficit de flavonoizi. Pe lângă identificarea unui factor implicat în fertilizarea înaltă a plantelor, un beneficiu semnificativ este dezvoltarea unui sistem reversibil de sterilitate masculină pentru producerea de semințe hibride.

Prin legarea unei gene ce afectează producția la flavonoli de un promotor de inducere, conform cu invenția descrisă aici, sterilitatea poate fi controlată. O astfel de genă deja cunoscută implică genomul CHS, c2 și Whp descrise de Coe, și alții., Supra, încorporat aici prin referință. Ca alternativă, gena F_3H poate fi izolată prin generarea unei probe de hibridizare folosind primeri oligonucleotidici PCR (a se vedea Saiki, R.K., 1990 supra) pe baza secvenței F_3H de *Antirrhinum* publicată.

Deci folosind o genă care controlează producerea de flavonoli după cum s-a descris aici se poate controla sterilitatea.

În general, conform invenției descrise aici, o genă care reglează producerea de flavonoli poate fi încorporată în plantă împreună cu un promotor necesar, care este promotor de inducere. Planta va fi sterilă întrucât flavonolul implicat nu este produs, iar când promotorul este indus, planta va fi fertilă. Gena nativă care produce flavonoli este o plantă normal fertilă care poate fi inactivată prin oricare din procedeele descrise mai jos, cum ar fi, încrucișarea reversă sau recombinația omoloagă.

Promotori de inducere

În realizarea acestei invenții, regiunea de promotor este îndepărtată dintr-o genă clonată, responsabilă de fertilitatea masculină și este înlocuită cu un promotor care răspunde doar la un stimul extern specific. Deci, gena nu va fi transcrisă decât ca răspuns la stimulul extern. Atâta vreme cât gena nu este transcrisă, produsul ei genic - care este necesar pentru întregirea dezvoltării polenului - nu este produs. Aceasta produce un accident în una sau mai multe din căile biochimice/fiziologice ale dezvoltării polenului, lucru ce produce sterilitate masculină. Planta poate deveni fertilă doar sub stimulare specifică, ce activează promotorul selectat.

Un exemplu de sistem de promotori de răspuns, care poate fi folosit în realizarea acestei invenții este sistemul glutathion-S-transferazei (GST) la porumb. GST reprezintă o familie de enzime ce pot detoxifica numeroși compuși hidrofobi electrofili, care sunt folosiți adesea drept erbicide înainte de răsărire (Wiegand, și alții., "ARN mesager care codifică o glutathion-S-transferază răspunzătoare de toleranța porumbului la erbicide este indus în ceea ce privește răspunsul său pentru un tratament mai sigur". *Plant Molecular Biology* 7:235 - 243, 1986). S-a descoperit că tratând semințele de porumb cu GST crește toleranța porumbului la erbicide. Studiile au arătat că GST sunt implicate direct în determinarea acestei toleranțe crescute. Această secțiune este mediată în primul rând de un produs de transcripție ARNm specific, de 1,1 Kb. Pe scurt, porumbul are o genă inactivă cu apariție naturală deja prezentă, ce poate răspunde la GTS și care poate fi indusă pentru a forma un produs genic. Această genă a fost deja identificată și clonată. Astfel, într-o alcătuire a acestei invenții, promotorul este îndepărtat din gena cu răspuns la GTS și atașat la gena

fertilității masculine, cărei, anterior, i-a fost îndepărtat promotorul nativ. Această genă prelucrată este combinația dintre un promotor care răspunde la un stimul chimic extern și o genă care este răspunzătoare pentru dezvoltarea în bune condiții a polenului fertil.

1130

Introducerea genei

În stadiul tehnicii se cunosc câteva procedee de transfer al ADN clonat la porumb. Acestea includ aportul ADN de către protoplaștii de porumb, facilitat prin electroporație (Rhodes și alții., "Plante de porumb transformate genetic pornind de la protoplaști", Science, vol.240 (8 aprilie 1988); tratamentul protoplaștilor de porumb cu polietilenglicol (Lyznik și alții., "Co-transformarea stabilă a protoplaștilor de porumb cu gene GUSA și Neo", Plant Molecular Biology 13: 151 - 161m 1989); și bombardarea celulelor de porumb cu microproiectile încărcate cu ADN (Klein, și alții., "Transformarea genetică a celulelor de porumb prin bombardarea cu particule", Plant Physiol. (1989) 91, 440 - 444) și Klein, și alții., "Factori care influențează trecerea ADN în celulele de Zea Mays prin microproiectile cu viteză mare", Bio/Technology, vol.6, mai 1988), toate incorporate prin referință.

1135

1140

Fiecare din aceste tehnici are avantaje și dezavantaje. În fiecare dintre ele, ADN de la un plasmid este prelucrat genetic, astfel, încât conține nu numai gena de interes, dar și gene-marker selectabile și eligibile. O genă marker selectabilă este folosită pentru a alege doar acele celule care au exemplare integrate din plasmid (construcția este astfel încât gena de interes și genele selectabile și eligibile sunt transferate ca un întreg. Genele eligibile prezintă alt element de identificare pentru cultivarea în bune condiții doar a acelor celule care poartă genele de interes. O genă-marker selectabilă folosită de obicei este neomicin - fosfotransferază II (NPT II). Această genă transmite rezistența la kanamicină, compus ce poate fi adăugat direct în mediile de creștere pe care sunt cultivate celulele. Celulele vegetale sunt, în mod normal sensibile la kanamicină și, drept rezultat, mor. Prezența genei NPT II învinge efectele kanamicinei și fiecare celulă având această genă rămâne viabilă. Altă genă - marker selectabilă care poate fi folosită în realizarea acestei invenții este gena care conferă rezistență la erbicidul glufozinat (Basta). O genă eligibilă de regulă folosită este gena β -glucuronidazei. Prezența acestei gene este pusă în evidență printr-o reacție histochimică, în care o probă de celule transformate putativ este tratată cu o soluție pentru test GUS. După o incubare adecvată, celulele care conțin gena GUS devin albastre. O altă genă eligibilă este un activator de transcripție pentru biosinteza antocianinei, așa cum este descris în cererea aferentă a lui Bowen și alții., U.S.S.N. 387739, depusă la 1 august 1989. Această genă determină sinteza pigmentului antocianină. Celulele transformate cu un plasmid care conține această genă devin roșii. De preferat, ca plasmidul să conțină, atât genele - marker selectabile, cât și pe cele eligibile.

1145

1150

1155

1160

1165

Plasmidul care conține una sau mai multe gene de acest fel este introdus, atât în protoplaștii de porumb, cât și în celulele calusului, prin oricare din tehnicile menționate anterior. Dacă gena - marker este selectabilă, doar acele celule care au incorporat setul ADN vor supraviețui selecției cu agentul fitotoxic adecvat. Odată, celulele corespunzătoare identificate și transmise, plantele vor fi regenerate. Descendentul plantelor transformate trebuie testat pentru a se asigura că setul ADN s-a integrat în mod corespunzător în genomul plantei.

1170

Va fi acceptat imediat de către cei cu experiență în domeniu, faptul că gena nativă a fertilității va putea să se exprime în cursul procedurii descris. Un alt procedeu de inactivare a genei native este acela binecunoscut care folosește tehnicile încrucișării reverse, în exemplul 9 fiind descris un tip de astfel de procedeu.

Ca o alternativă specifică, gena care codifică F_3H , CHI sau CHS la o plantă poate fi îndepărtată, blocată sau să i se diminueze funcționarea în alt mod, pentru a împiedica exprimarea enzimei F_3H la plantă. Alături de blocarea sintezei F_3H *in vivo*, este evident că activitatea F_3H poate fi blocată prin mijloace care interacționează direct cu F_3H , pentru a opri sau diminua activitatea sa hidroxilazică. În plus, producerea de flavonoli poate fi perturbată prin blocarea activității CHI ; totuși această alternativă este mai puțin preferată întrucât, convertirea calcononaringeninei la naringenină se produce spontan, în porție mică, în lipsa CHI . Aceasta este doar una din variatele alcătuirii în conformitate cu scopul invenției descrise.

Selectia sterilității și refacerea fertilității

După introducerea genei într-o plantă, sunt selectate tipurile de plante corespunzătoare, adică cele sterile masculine. Acestea sunt sterile masculine deoarece gena fertilității masculine, izolată și clonată, pe care plantele o dețin, nu are propriul său promotor nativ și deci, nu realizează produsul genic care este esențial pentru dezvoltarea polenului în condiții bune. De aceea, gena prelucrată funcționează ca o alelă recesivă mutantă a genei native. În biotehnologia obișnuită a plantelor, odată identificat genotipul dorit, după transformare și regenerare, plantele sunt autoselectate pentru a reface acel genotip. Cu toate acestea, în realizarea acestei invenții, genotipul dorit nu poate fi autoselectat la prima generație deoarece este steril masculin. Pentru a obține descendent, trebuie indusă fertilitatea prin stropirea plantelor cu un compus care induce transcripția genei prin activarea promotorului alterat. În cazul promotorilor GST, compusul de inducere GST este de tip N,N - dialil - 2,2 - dicloroacetamidă. Promotorul atașat la gena fertilității masculine răspunde la această substanță chimică și determină inițierea transcrierii genei. Odată ce se produce aceasta, produsul genic normal este realizat de către genă și este indus un anumit nivel de fertilitate masculină. Polenul de la această plantă este apoi folosit pentru realizarea polenizării genotipului original selectat.

Odată terminată izolarea și transmiterea genotipului dorit, lucrul este mai ușor. Doar indivizii folosiți ca genitori feminini în încrucișările hibride sunt transformați în variante sterile masculine. Odată transformați, cantitatea de semințe sterile masculine/fertile feminine trebuie crescută. Aceasta se înfăptuiește prin plantarea într-o zonă izolată (departe de alt polen de porumb) și stropirea cu o substanță chimică la care promotorul răspunde. Stropirea determină promotorul să inițieze transcrierea genei atașată lui. Aceasta va produce un anumit grad de fertilitate. Un avantaj particular al acestui sistem, în comparație cu sisteme de felul celui publicat, în **WO 89/10396** al lui Mariani și alții, (bazat pe cererea internațională **PCT/EP 89/00495**), în care se induce sterilitatea, este acela că tratamentul nu trebuie să fie 100% eficient, pentru că, în mod normal o plantă de porumb produce mult mai mult polen decât este de fapt necesar pentru fertilizarea întregii cantități de mătase valabilă. De aceea, chiar refacerea redusă a fertilității va fi eficientă pentru obținerea nivelurilor acceptabile de creștere a semințelor. În același timp, polenizarea directă nu are loc în producerea semințelor hibride, pentru că plantele din această invenție

sunt sterile masculin în mod normal și trebuie tratate pentru a deveni fertile. În sistemele în care este indusă sterilitatea, acest mecanism trebuie să fie 100% eficient pentru a evita polenizarea directă în producerea seminței hibride.

1220

Toate semințele culese continuă să fie homozigote și sterile întrucât fertilitatea este refăcută doar într-o singură generație genitoare, prin tratamentul cu substanța chimică inductoare a fertilității. Această sămânță este apoi folosită ca genitor feminin într-o cultură de producție de hibrizi. Deoarece plantele sunt sterile masculin, nu trebuie să li se îndepărteze spicele. Toate plantele hibride produse din acest fel de sămânță sunt fertile masculin, pentru că descendentul moștenește o genă modificată de la genitorul feminin și o genă normală de la genitorul masculin. Se realizează o producție de polen normal.

1225

1230

Revendicări

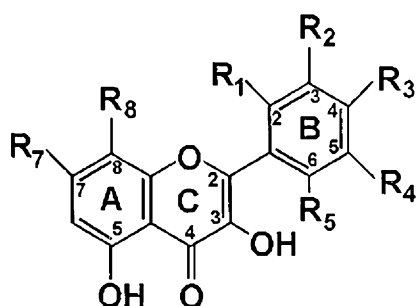
1. Procedeu de realizare a sterilității masculine ereditare, controlabile din exterior, la plante, **caracterizat prin aceea că**, constă în:

- a) selectarea unei gene care determină producerea de flavonoli;
- b) clonarea genei selectate;
- c) legarea genei clonate într-o secvență de exprimare, împreună cu un promotor de inducere, responsabil de controlul extern;
- d) inserția secvenței de exprimare în genomul nuclear;
- e) inactivarea genei care codifică produsul genic al genei clonate din genomul nuclear nativ, prin neinducerea promotorului.

1235

1240

2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** flavonolul este un compus cu structura chimică corespunzătoare formulei generale:



1245

1250

în care: $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_7$ și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau alcooxil cu 1-3 atomi de carbon.

3. Procedeu, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** nu mai mult de doi radicali dintre R_1 - R_5 sunt hidroxil sau metoxi, restul radicalilor dintre R_1 - R_5 sunt hidrogen și radicalii R_7 și R_8 sunt hidrogen, hidroxil sau metoxi.

1255

4. Procedeu, conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** flavonolul este ales dintre galangină, kaempferol, izoramnetin, qercitină sau morină.

5. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** este folosit în reproducerea unei plante care are sterilitate masculină ereditară, controlabilă din exterior, prin readucerea plantei la fertilitate masculină inducând promotorul genei introduse și realizând polenizarea în mod obișnuit.

1260

1265 6. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** este folosit
1270 pentru producerea semințelor hibride prin plantarea în juxtapoziție de polenizare
încrucișată a unei semințe dintr-o linie genitoare masculină cu fertilitate masculină și
a unei alte semințe dintr-o linie genitoare feminină cu sterilitate masculină, dezvoltarea
plantelor în condiții care nu induc exprimarea genei, polenizarea încrucișată a plantei
feminine sterile masculin cu polen de la planta masculină fertilă masculin și culegerea
semințelor hibride de la planta feminină sterilă masculin.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**

Examinator: **biochim. Crețu Adina**

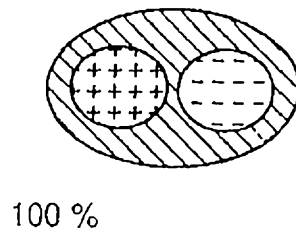


Fig. 1A

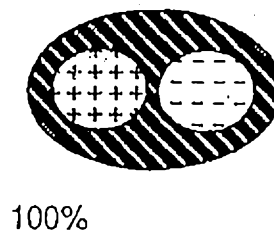


Fig. 1B



Fig. 2A

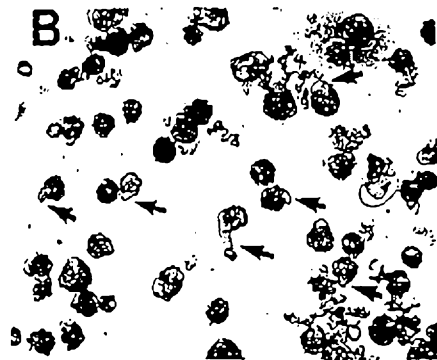


Fig. 2B

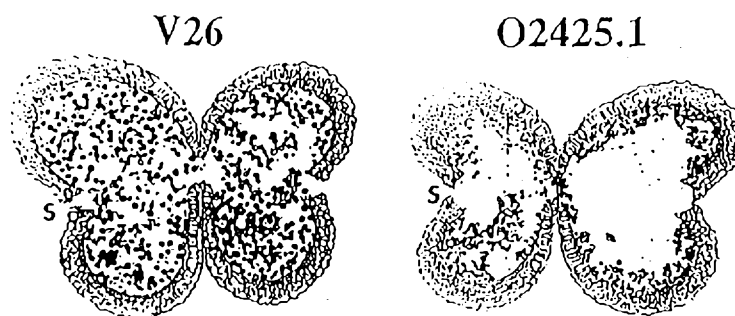


Fig. 3A

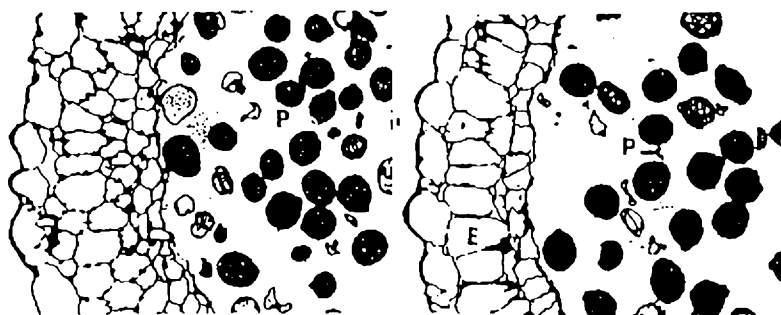


Fig. 3B

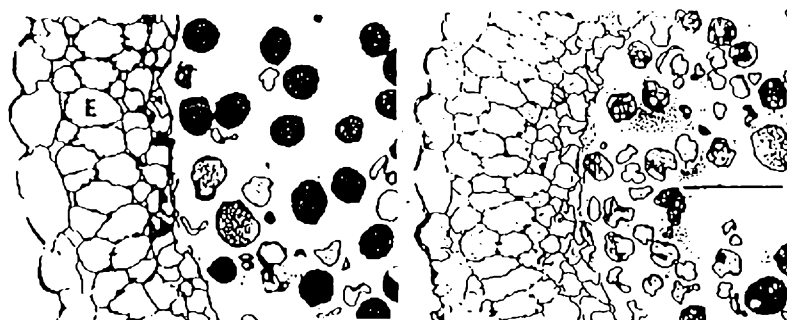


Fig. 3C

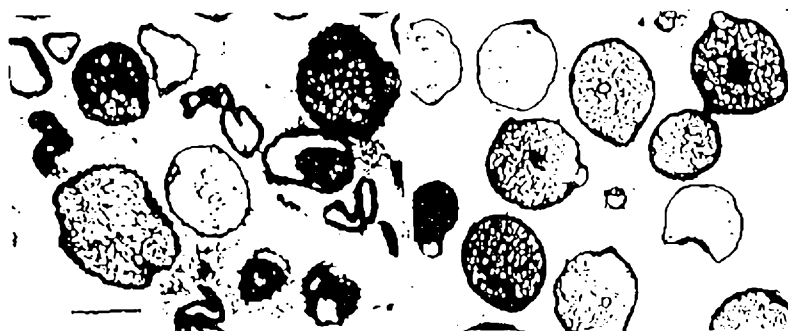


Fig. 3D

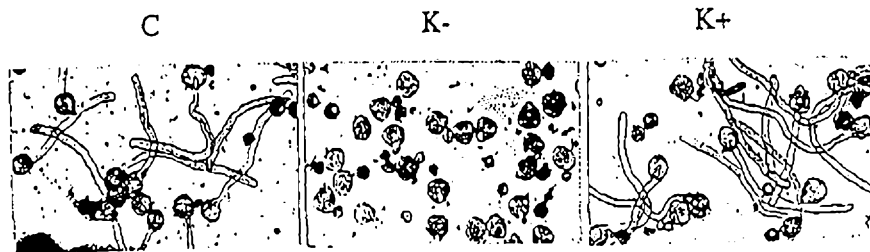


Fig. 4

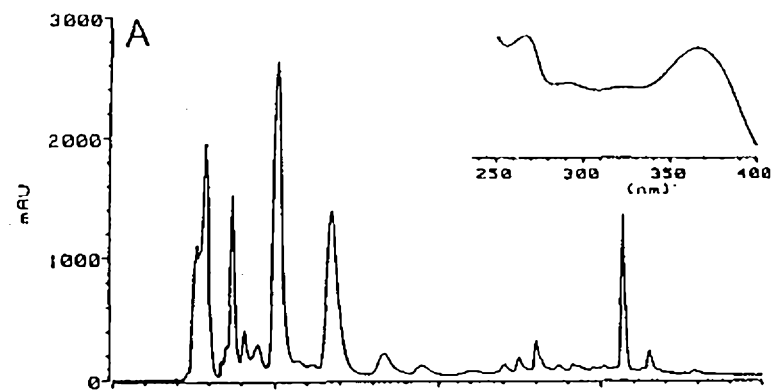


Fig. 5A

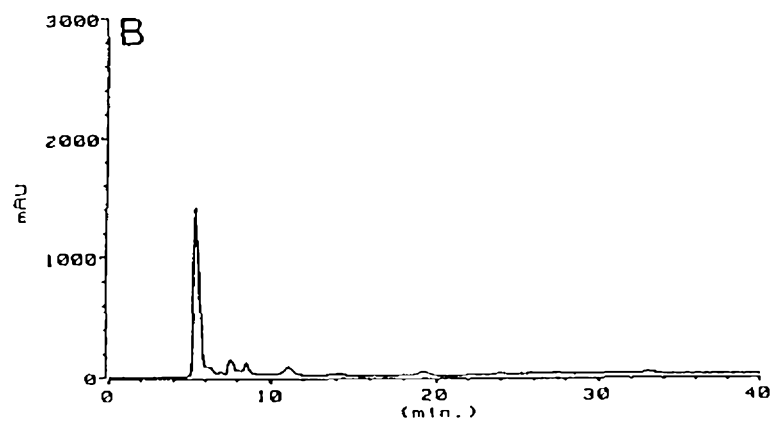


Fig. 5B

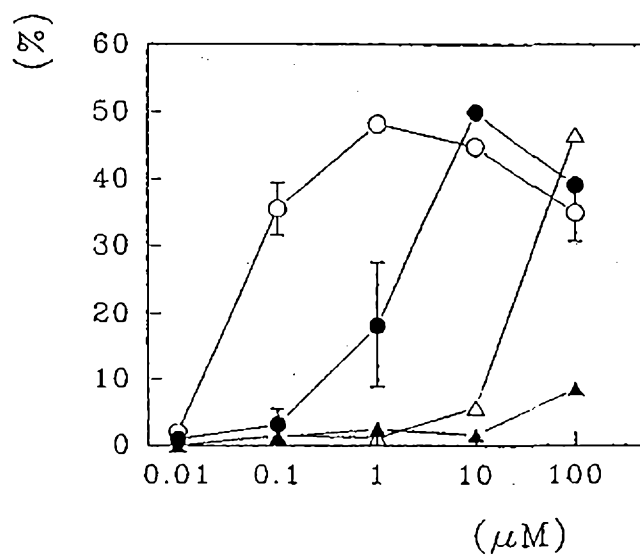


Fig. 6