



H U 0 0 0 2 1 5 4 9 4 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁGMAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**SZABADALMI  
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**215 494 B**

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 00801  
(22) A bejelentés napja: 1991. 09. 20.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
90/11670 1990. 09. 21. FR  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/FR 91/00741  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/05251

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>**C 12 N 15/29**

A 01 H 5/00

C 12 N 5/04

(40) A közzététel napja: 1994. 12. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1999. 01. 28.

(72) Feltalálók:

Bonhomme, Sandrine, Párizs (FR)  
Budar, Françoise, Limours (FR)  
Lancelin, Dominique, Buc (FR)  
Pelletier, Georges, Bures/Yvette (FR)

(73) Szabadalmas:

Institut National de la Recherche Agronomique  
(INRA), Párizs (FR)

(74) Képviseelő:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54) **Eljárás hímsterilitást adó DNS-szekvencia, ilyen szekvenciát tartalmazó mitochondriális genom, sejtmaggenom, mitochondrium és növény, valamint a hibridek előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgyát eljárások képezik *Brassica*-nemzetségbe tartozó növénynek citoplazmatikus hímsterilitást és nőivarú termékenységgel kompatibilis morfológiát biztosító rekombináns növényi sejtmaggenomok vagy mitochondriális genomok előállítására. A találmány tárgyát képezik ezenfelül eljárások citoplazmatikusan hímsteril, de más, nemkívánatos tulajdonságoktól men-

tes, *Brassica*-nemzetségbe tartozó növények előállítására, továbbá olyan hibrid növények előállítására, amelyek egyik szülője a találmány szerinti növény.

A találmány szerinti megoldás alkalmas agronómiai szempontból jelentős fajok előnyös tulajdonságú hibridjeinek kifejlesztésére.

HU 215 494 B

A találmány tárgyát eljárások képezik *Brassica*-nemzetségbe tartozó növények citoplazmatikus hímsterilitást és nőivarú termékenységgel kompatibilis morfológiát biztosító rekombináns növényi sejtmaggenomok vagy mitokondriális genomok előállítására. A találmány tárgyát képezik ezenfelül eljárások citoplazmatikusan hímsteril, de más, nemkívánatos tulajdonságoktól mentes, *Brassica*-nemzetségbe tartozó növények előállítására, továbbá olyan hibrid növények előállítására, amelyek egyik szülője a találmány szerinti növény.

A találmány szerinti megoldás igen előnyösen alkalmazható agronómiai szempontból jelentős fajok előnyös tulajdonságú hibridjeinek kifejlesztésére.

A találmány főleg olyan, a *Cruciferae*-családba tartozó növényekre vonatkozik, amelyekben a sejtek citoplazmája hímsterilitásért és a jó agronómiai jellemzőkért felelős nukleotidszekvenciákat hordozó sejtstruktúrát tartalmaz.

Citoplazmatikus hímsterilitási rendszer alkalmazásával meg lehet könnyíteni, illetve lehetővé lehet tenni növények hibrid változatainak kifejlesztését. A hibrideket két szülői populáció keresztezésével lehet előállítani, amelyek közül egyik a hím, másik a női szerepet játssza. Amikor egyforma minőségű hibrid változatokat szándékozunk előállítani szexuális keresztezéssel, önmegtermékenyítő fajok között, az egyik akadály, amellyel találkozunk, a növény önbeporzó képessége. A hímsterilitási rendszerek lehetővé teszik, hogy olyan nőivarú növényeket kapjunk, amelyek nem képesek önmegtermékenyítésre, és amelyekből beporzás után a magvak, amelyek mind hibridek, munkaigényes módszerek alkalmazása – mint például a virágok kasztrálása – nélkül, közvetlenül begyűjthetők.

A hímsterilitás genetikai determinánsai közé tartoznak azok, amelyeket a citoplazma hordoz. Mindegyik szexuálisan előállított generációnál ezeket kizárólag az anya adja tovább. Egy citoplazmatikus hímsterilitási rendszerrel (CMS) tehát mindegyik generációnál az utódok 100%-a hímsteril. Ezeket a genetikai determinánsokat a mitokondrium genomja hordozza.

A *Cruciferae*-családba tartozó növényeknél egy alkalmas citoplazmatikus hímsterilitási rendszert az alábbi jellemzők határoznak meg:

1) A hímsterilitásnak totálisnak kell lennie, azaz nem képződhet virágpor, függetlenül a tenyésztési körülményektől, és függetlenül attól a sejtvonaltól, amelyet nőivarú szülőként akarunk alkalmazni. Ahol nem ez a helyzet, ott az ilyen nőivarú sejtekből nyert magvak részben önbeporzásból származnak, és ennek következtében nem az F1 hibrid típusba tartoznak.

2) Ezeknek a magvaknak a termelését a természetes virágporhordozók kihasználásával kell elvégezni, azaz ezeknek a fajoknak az esetében a Hymenoptera, Diptera és a szél segítségével. A virágport a beporzó növényekről el kell juttatni a hímsteril (nőivarú) növényekre. Valójában csak a rovarok képesek ezt a transzportot végrehajtani egy adott távolságon belül a *Cruciferae*-családba tartozó növényeknél. A nőivarú növényeknek ennek következtében elég vonzóknak kell lenniük ahhoz, hogy vonzzák azokat a rovarokat, amelyek jönnek

és nektárt gyűjtenek bennük. A virágok morfológiájának kényszeríteni kell a rovarokat arra, hogy a potrohuk elvileg érintkezésbe kerüljön a bibeszájjal. A gyakorlatban ez olyan helyzetet eredményez, amelyben a virág-szirmok alapjának egy bizonyos csövet kell létrehoznia a bibe alapja körül.

3) A nőivarú szervek (bibe) morfológiájának azonosnak kell lennie a termékeny növény azonos szerveinek morfológiájával, különösen fontos, hogy virágoként csupán egyetlen, egyenes vonalú bibe legyen. A hímsterilitás gyakran eredményezi a portokok feminizálódását, amelyek így pszeudobibékké alakulnak át, sőt eredményezheti a nektártartók teljes virágokká történő átalakulását is. Néha az ilyen növény bibéje vagy bibéi is deformáltak. Mindezen elváltozások nem teszik lehetővé a jó magtermést, és ezt bizonyos fokig a nőivarú sterilitás ekvivalensének tekinthetjük.

4) Az F1-hibrid változatok termeléséhez azokban a fajokban, amelyekből ezeket a magvakat gyűjtjük, mint például repce- és mustárfajokból, lényeges, hogy a hibrid hím szülője teljes egészében kiküszöbölje a hímsteril citoplazma hatását, hogy a hibrid növények könnyen beporzódhassanak.

A *Cruciferae*-családnál hímsteril citoplazmát vagy CMS-t első esetben Ogura írta le [Ogura, H., Mem, Fac. Agric. Kagoshima Univ. 6 39–78, (1968)] a *Raphanus sativus* gyökerében. Bannerot és munkatársai [Bannerot és mtsai., Proc. Eucarpia Meeting *Cruciferae*, 25, 52–54 (1974); Bannerot és mtsai., *Eucarpia Cruciferae News.*, 2–16 (1977)] átvitték az Ogura citoplazmát káposztafélékbe (*Brassicae*) és így citoplazmatikus hímsterilitással bíró növényeket kaptak. Ezen a növényeknek az agronómiai tulajdonságai nem voltak kielégítőek (klorózis alacsony hőmérsékleten, gyenge nőivarú termékenység), gyenge termést eredményeztek, ezért nem voltak alkalmasak arra, hogy kereskedelmi forgalomba kerüljenek.

A keresztes virágúaknál (*Cruciferae*) ennek a klorózisnak az elkerülésére egy és ugyanazon nemzetségbe tartozó nukleáris és kloroplasztgenomokat ugyanabban a sejtben kell kombinálni. Tehát azok a *Brassica*-nemzetségbe tartozó növények, amelyek *Brassica*-növények kloroplaszt genomját tartalmazzák, már nem mutatnak kloróvizist. Ha a teljes Ogura mitokondriális genomot tartalmazzák, akkor teljes citoplazmatikus hímsterilitást mutatnak, de a virágoknak aberráns morfológiájuk lesz, és ez lehetetlenné teszi, hogy egy természetes vektor beporozza őket.

Emellett azoknál a fajtáknál, amelyeknél a magvak az érdekesek, az a megfelelő, ha a hímtermékenységet helyreállítjuk azoknál a hibrid változatoknál, amelyek kereskedelmi forgalomba kerülnek, helyreállító géneként ismert sejtmaggének segítségével.

Nehéz helyreállítani a hímsterilitást egy olyan növényben, amely a teljes Ogura mitokondriális genomot tartalmazza, mivel számos helyreállító gén egyidejű részvételét kell biztosítani. Célul tűztük ki egy alkalmas hímsterilitási rendszer előállítását, oly módon, hogy eltávolítjuk azokat a géneket, amelyek az Ogura citoplazma nemkívánatos tulajdonságaiért felelősek, miközben

megmarad a hímsterilitás, amely hatékony, és könnyen helyreállítható.

A találmány tárgyát tehát egy eljárás képezi *Brassica*-nemzetségbe tartozó növénynek CMS fenotípust és nőivarú termékenységgel kompatibilis morfológiát biztosító rekombináns növényi sejtmaggenom vagy mitokondriális genom előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy, az 1. ábrán bemutatott szekvencia 928–1568. nukleotidjainak megfelelő szekvenciával legalább 90%-ban homológ szekvenciát tartalmazó *Ogura* sterilitási szekvenciát juttatunk be a növénybe és

b) igazoljuk egy – *cox1*-próbbával végzett hibridizációval kimutatható – *BglII*-emésztéssel kapható, 10,7 kb hosszúságú vagy egy *NruI*-emésztéssel kapható, 11 kb hosszúságú fragmens által hordozott nemkívánatos szekvencia, és/vagy egy – formilmetionin-transzfer-RNA-próbbával végzett hibridizációval kimutatható – *SallI*-emésztéssel kapható, 5,1 kb hosszúságú vagy *NruI*-emésztéssel kapható, 15 kb hosszúságú vagy *BglII*-emésztéssel kapható, 18,5 kb hosszúságú fragmens által hordozott szekvencia hiányát.

Az alábbiakban ismertetjük azokat az ábrákat, amelyekre hivatkozunk:

1. ábra: Az *Ogura* retek mitokondriális DNS-fragmens nukleotidszekvenciája, amely a CMS-jellemzőt hordozza.

2. ábra: Az 1. ábrán közölt mitokondriális DNS-fragmens restrikciós térképe.

3. ábra: A mitokondriális DNS elektroforézise *BglII* (3a) és *NruI* (3b) restrikciós enzimekkel végzett emésztés után. A megfigyelt csíkok a *Cox1* próbával végzett hibridizálásnak felelnek meg [Hiesel R., Shobel W., Schuster W. and Brennicke A., EMBO J., 6, 29–34 (1987)].

4. ábra: A mitokondriális DNS elektroforézise *SallI* restrikciós enzimmal végzett emésztés után. A megfigyelt csíkok egy olyan próbával végzett hibridizálásnak felelnek meg, amelyet az 1. ábrán közölt szekvenciában a 389-es és 1199-es nukleotidok határolnak.

5. ábra: Különböző citoplazmatikus genomot hordozó káposztanövények termései.

6. ábra: A mitokondriális RNS elektroforézise. A megfigyelt csíkok egy olyan próbával végzett hibridizálásnak felelnek meg, amely egy, az ORF B-nek nevezett szekvencia egy részét hordozó *EcoRI*–*BamHI* fragmens.

Az *Ogura* sterilitási DNS-t az 1. ábrán látható szekvencia 1-es és 2428-as nukleotidjai által határolt szekvenciaként határozzuk meg. Ezt egy átírt szekvencia hordozza, amelynek 3' és 5' végeit a 2. ábrán szaggatott vonal köti össze, és amelyet csak hímsteril növényben lehet megfigyelni. Az ORF B egy nyitott leolvasási keretnek felel meg; ezt az elnevezést azon az alapon adtuk, hogy a Brennicke által megfigyelt szekvenciával homológiát mutat. A 2. ábrán a két formil-metionin transzfer RNS-gén közül az egyiknek megfelelő szekvenciát árnyékolva mutatjuk. Az 1. ábrán látható nukleotidszekvencia 928-as és 2273 nukleotidjai által határolt DNS-szekvencia egy olyan transzkriptumnak felel

meg, amely molekuláris hibridizálással láthatóvá tehető (1.4), amint az a 6. ábrán látható. Ezen a 6. ábrán mind-egyik luk megfelel egy termékeny (F) vagy hímsteril (S) növénynek. Csak a hímsteril növények szintetizálnak egy kb 1400 bázis hosszúságú transzkriptumot. Ez a transzkriptum az 1. ábrán látható szekvencia 928-as nukleotidjánál ( $\pm 10$  bázis) kezdődik, és a 2273-as pozícióban ( $\pm 5$  bázis) végződik. (A növényi mitokondriumokban a transzkripció iniciációja és a terminációja különböző pozíciókban történhet.)

A jelen találmány tárgyát képezi előnyösen egy eljárás citoplazma előállítására, amely citoplazma olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely legalább 90%-os homológiát mutat az 1. ábrán látható szekvencia 928-as és 2273-as nukleotidjai által határolt szekvenciával, amely a CMS-jellemzőt kódolja vagy olyan citoplazmára vonatkozik, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely legalább 90%-os homológiát mutat az 1. ábrán látható szekvencia 928-as és 1569-es nukleotidjai által határolt szekvenciával, és RNS-sé íródik át, a CMS-jellemzőt kódolja, és az alábbiakkal jellemezhető:

– olyan kloroplasztokat tartalmaz, amelyek ugyanahhoz a fajhoz tartoznak, vagy más fajhoz tartoznak, de kompatibilisek az adott sejtmaggenommal,

– nem tartalmazza az *Ogura* mitokondriális genom alábbi fragmensei egyikét, azok egy részét vagy egyiket sem:

– a transláció iniciációjához használt két formil-metionin transzfer-RNS-gén közül egyet hordoz,

– a *Cox1* gént hordozza, amely a citokrom-oxidáz 1-es alegységét kódolja.

Ezeknek a fragmenseknek a hiánya (ezeket nevezük „nemkívánatos szekvenciáknak”) szükséges ahhoz, hogy olyan mitokondriális genomokat kapjunk, amelyek jó minőségű hímsterilitásnak felelnek meg, és megfelelnek az előzőekben a 4. pontban említett jellemzőnek.

Előnyösen, a találmány tárgya eljárás *Brassica*-nemzetségbe tartozó növénynek CMS fenotípust és nőivarú termékenységgel kompatibilis morfológiát biztosító rekombináns növényi sejtmaggenom vagy mitokondriális genom előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy, az 1. ábrán bemutatott szekvencia 928–1568. nukleotidjainak megfelelő szekvenciával legalább 90%-ban homológ szekvenciát tartalmazó *Ogura* sterilitási szekvenciát juttatunk be növénybe, és

b) igazoljuk egy – *cox1*-próbbával végzett hibridizációval kimutatható – *BglII*-emésztéssel kapható, 10,7 kb hosszúságú vagy egy *NruI*-emésztéssel kapható, 11 kb hosszúságú fragmens által hordozott nemkívánatos szekvencia, és/vagy egy – 1. ábrán bemutatott, 373–1179. nukleotidoknak megfelelő formilmetionin-transzfer-RNA-próbbával végzett hibridizációval kimutatható – *SallI*-emésztéssel kapható, 5,1 kb hosszúságú vagy *NruI*-emésztéssel kapható, 15 kb hosszúságú vagy *BglII*-emésztéssel kapható, 18,5 kb hosszúságú fragmens által hordozott szekvencia hiányát.

A találmány tárgya továbbá rekombináns növényi sejtmag vagy mitokondriális genom, amely egy *Ogura* sterilitási DNS-szekvenciát tartalmaz:

a) ezt egy olyan DNS-szekvencia hordozza, amelyet az 1. ábrán bemutatott szekvencia 928-as és 2273-as nukleotidjai határolnak, vagy

b) legalább 90%-os homológiával rendelkezik az a) pontban említett szekvenciával,

és ha jelen van egy növény citoplazmájában, akkor az említett növényben hímsterilitást hoz létre.

A találmány szerinti sejtmag vagy mitokondriális genom továbbá azzal jellemezhető, hogy az említett rekombináns mitokondriális genom mentes az Ogura genom alábbi fragmenseitől vagy azok részeitől:

– az a fragmens, amely a transláció iniciációjához használt két formilmetionin transzfer RNS-gén egyikét hordozza,

– az a fragmens, amely a Cox1 gént hordozza, amely a citokróm-oxidáz 1-es alegységét kódolja, vagy amely genomban az említett fragmensek inaktívak.

Közelebbről, a találmány szerinti eljárással előállított rekombináns mitokondriális genom az alábbiakkal jellemezhető:

1) Egyrészt azzal, hogy nem tartalmaz egy körülbelül 10,7 kb méretű, BglI restriktív enzimmel végzett emésztés után kapható fragmenst, vagy egy körülbelül 11 kb méretű fragmenst, amely NruI restriktív enzimmel végzett emésztés után kapható, amely fragmensek a Cox1 gént hordozzák. Ezt mutatjuk be a 3. ábrán, molekuláris hibridizálás alkalmazásával, Cox1 szekvenciát tartalmazó próba felhasználásával.

2) Másrészt azzal, hogy nem tartalmaz egy körülbelül 5,1 kb méretű, SalI restriktív enzimmel végzett emésztés után kapható fragmenst, vagy egy körülbelül 15 kb méretű fragmenst, amely NruI restriktív enzimmel végzett emésztés után kapható, vagy egy körülbelül 18,5 kb méretű, BglI restriktív enzimmel végzett emésztés után kapható fragmenst, amely fragmensek a két formilmetionin-transzfer RNS-t kódoló gén egyikét hordozzák.

Ezt igazoljuk a 4. ábrán látható módon molekuláris hibridizálással, egy olyan próbát alkalmazva, amely az 1. ábrán közölt szekvencia 389–1199. nukleotidjainak felel meg.

A 3. és 4. ábrán a számokkal jelzett genotípusok olyan növényeknek felelnek meg, amelyek egy megfelelő citoplazmatikus hímsterilitási rendszert hordoznak.

Genotípusok	Kloroplasztok	Mitokondriumok
B. n	B. napus	B. napus
27	B. napus	B. napus/Ogura
OGU	R. sativus (OGU)	R. sativus (OGU)
9, 17, 21, 24, 27c	B. oleracea	B. oleracea/Ogura
B. o	B. oleracea	B. oleracea

Emellett egy jó minőségű CMS-jellemző megléte szükségessé teszi egy olyan DNS-szekvencia jelenlétét, amely az emésztett nukleinsavak DNS/DNS hibridizálásával azonosítható. A jelen találmány tárgya tehát egy olyan DNS-szekvencia, amit meg lehetett határozni, és amelyet az jellemez, hogy egy olyan szekvenciát tartal-

maz, amelyből NcoI restriktív enzimmel végzett emésztésre egy 2,5 kb méretű fragmens, NruI restriktív enzimmel végzett emésztésre egy 6,8 kb méretű fragmens, és SalI restriktív enzimmel végzett emésztésre egy 4,4 kb méretű fragmens keletkezik.

Ezt a szekvenciát úgy is azonosítani lehet, hogy a hímsteril növények össz-RNS-ével végzünk hibridizációt. Így egy körülbelül 1400 bp méretű transzkriptumot lehet azonosítani. Ez azokból a növényekből, amelyekben a termékenység helyreállt, hiányzik.

A „nemkívánatos” nukleotidszekvenciák és a találmány szerinti, Ogura sterilitáshoz „szükséges” nukleotidszekvenciák meghatározása lehetővé teszi, hogy egy, a sejtmaggenommal kompatibilis kloroplasztokat, és jó minőségű mitokondriumokat hordozó növényi anyagot lehessen szelektálni szakember számára jól ismert DNS hibridizációs technikákkal anélkül, hogy várnunk kellene a növény felnövekedésére, illetve a virágok és gyümölcsök megjelenésére. Tehát egy nagyon hatékony eszköz áll a felhasználó rendelkezésére olyan növények szelektálására, amelyek jó agronómiai tulajdonságú hímsteril citoplazmával rendelkeznek.

A találmány tárgya továbbá eljárás egy olyan mitokondrium előállítására, amit az jellemez, hogy tartalmaz egy nukleotidszekvenciát, amely az 1. ábrán látható nukleotidszekvencia 928-as és 2273-as nukleotidjai által határolt szakasz szekvenciájával legalább 90%-os homológiát mutat, és Ogura citoplazmatikus hímsterilitást kódol; vagy egy más lehetőség szerint a mitokondrium egy olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amelynek szekvenciája az 1. ábrán látható szekvencia 928-as és 1569-es nukleotidjai által határolt szakasz szekvenciájával azonos, vagy ezzel a szekvenciával 90%-os homológiát mutat, és amely RNS-sé íródik át a hímsteril növények mitokondriumaiban. Ez a DNS emellett rendelkezhet az előzőekben meghatározott jellemzőkkel, előnyösen azzal, hogy a nemkívánatos szekvenciákat nem tartalmazza.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy *Cruciferae* citoplazma, amely egy „Ogura sterilitási” DNS-szekvenciát tartalmaz; ez a citoplazma emellett tartalmaz ugyanahhoz a fajhoz vagy más fajhoz tartozó kloroplasztokat, de amelyek kompatibilisek a sejtmaggenomjával.

Az Ogura sterilitási szekvenciát az alábbiak jellemzik:

a) az 1. ábrán bemutatott 2428 bázispár méretű DNS-szekvencia hordozza,

b) az 1. ábrán bemutatott nukleotid-szekvencia 928. és 2273. nukleotidjai határolják, és megfelel egy, a 2. ábrán szaggatott vonallal jelzett transzkriptumnak, és molekuláris hibridizációval lehet láthatóvá tenni (1.4), amint azt a 6. ábra mutatja,

c) legalább 90%-os homológiával rendelkezik a b) pontban említett szekvenciával, és ha egy növény mitokondriális genomjában jelen van, akkor az említett növénynek citoplazmatikus hímsterilitást biztosít, vagy

d) az 1. ábrán bemutatott szekvencia 928-as és 1569-es nukleotidjai által határolt szekvencia hordozza, és a steril növények mitokondriumaiban RNS-sé íródik át, vagy

e) legalább 90%-os homológiával rendelkezik a d) pontban leírt szekvenciával, és a steril növények mitokondriumaiban RNS-sé íródik át.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy *Cruciferae*-családba tartozó hímsteril növény előállítására, azzal jellemezve, hogy olyan növényt hozunk létre, amely ugyanahhoz a fajhoz tartozó kloroplasztokat és sejtmagot tartalmaz, illetve a kettő egymással kompatibilis, továbbá olyan mitokondriumokat tartalmaz, amelyek az előzőekben meghatározott CMS-jellemzőt hordozó genomot hordoznak.

Előnyösen, a jelen találmány vonatkozik továbbá egy *Brassica*-nemzetségbe tartozó hímsteril növény előállítására is, amely növény *Brassica* kloroplasztokat és sejtmagot tartalmaz, valamint olyan mitokondriumokat, amelyek az előzőekben meghatározott CMS-jellemzőt hordozó genommal rendelkeznek.

Ennek a mitokondriális genomnak számos, a szóban forgó *Brassica* fajnak megfelelő gént is hordoznia kell. Ezt az *Ogura* genom és a *Brassica* genom kombinációjával érhetjük el.

Előnyösen, a jelen találmány tárgya eljárás egy, a *Brassica napus* fajba tartozó hímsteril növény előállítására, azzal jellemezve, hogy olyan növényt hozunk létre, amelynek *Brassica* sejtmagja van, a citoplazmájában *Brassica* kloroplasztok találhatóak, valamint hímsteril mitokondriumok, amelyek a jelen találmány szerinti, az előzőekben meghatározott DNS-t hordoznak; ezek a mitokondriumok emellett a *Brassica napus* mitokondriális génjeinek többségét is hordozzák (18S, Atp9, Atp6, CoxII, ndh1, cob). A *Brassica napus* lehet colza, canola és swede.

A jelen találmány tárgya továbbá eljárás egy, a *Brassica oleracea* fajba tartozó hímsteril növény előállítására, amely növény *Brassica* sejtmagot tartalmaz, a citoplazmájában *Brassica* kloroplasztok vannak, valamint olyan mitokondriumok, amelyek az előzőekben definiált CMS-jellemzőt kódoló DNS-szekvenciát hordoznak.

A *Brassica oleracea* körébe tartoznak a különböző típusú káposzták: fejeskáposzta, a kelbimbó, a karalábé, a brokkoli, a kelkáposzta és a karfiol.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá eljárás egy *Brassica campestris* fajhoz tartozó hímsteril növény előállítására, azzal jellemezve, hogy olyan növényt állítunk elő, amely *Brassica* sejtmagot tartalmaz, a citoplazmájában olyan *Brassica* kloroplasztokat tartalmaz, amelyek kompatibilisek a nukleáris genommal, valamint olyan mitokondriumokat, amelyek az előzőekben meghatározott CMS-jellemzőt kódoló DNS-szekvenciát hordoznak.

A *Brassica napus* körébe tartozik a repce, a fehérrépa, a Kínai, a Pekingi és a Japán káposzta.

Hasonlóképpen, a jelen találmány tárgyát képezik eljárások a *Brassica juncea*, a *Brassica nigra*, a *Brassica hirta* és a *Brassica carinata* csoportból választott hímsteril növények előállítására, azzal jellemezve, hogy olyan növényeket állítunk elő, amelyek *Brassica* sejtmagot tartalmaznak, és a citoplazmájukban a nukleáris genommal kompatibilis kloroplasztokat tartalmaznak, valamint olyan mitokondriumokat, amelyek az előzőekben meghatározott CMS-jellemzőt kódoló DNS-szekvenciát hordoznak.

A találmány tárgya továbbá egy olyan növény, amely a *Brassica*-nemzetségbe tartozik, és amelynek sejtmaggenomja egy, az előzőekben meghatározott *Ogura* sterilítási

si szekvenciát hordoz, valamint olyan elemeket, amelyek befolyásolják az expresszióját és a transzlációs termékek transzportját a mitokondriumba. Ez a növény előnyösen az alábbi fajok bármelyikébe tartozhat: *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica campestris*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica hirta* és *Brassica carinata*.

Az „*Ogura* sterilítási szekvencia” jelenléte szükséges és elegendő ahhoz, hogy a virágpör teljes hiányát indukáljuk a helyreállító gének távollétében. Ezeknek a növényeknek a beporzását általában a nektár jó termelésének eredménye befolyásolja.

A nőivarú szervek morfológiája normális, és a keletkező termések (becők) normális számú magvakat tartalmaznak. Az 5. ábrán a megfigyelt morfológia látható egy normál kontrollnövény esetén (z), egy olyan növény esetén, amely a teljes *Ogura* genomot valamint *Brassica oleracea* kloroplasztokat tartalmaz, és aberráns morfológiával rendelkezik (z(6)), egy káposztanövény esetében, amely *Brassica napus* kloroplasztokat és olyan hímsteril mitokondriumokat tartalmaz, amelyekben (z(A)) *Brassica napus* gének vannak, valamint olyan növény esetén, amely *Brassica oleracea* kloroplasztokat tartalmaz, és a rekombináns mitokondriumok már nem hordozzák a nemkívánatos szekvenciákat (z (9)) és (z (17)). A növények az alábbi jellemzőkkel rendelkeznek:

Genotípus	Kloroplasztok	Mitokondriumok
z	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i>
z (A)	<i>B. napus</i>	<i>B. napus/Ogura</i>
z (6)	<i>B. oleracea</i>	<i>Ogura</i>
z (9)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea/Ogura</i>
z (17)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea/Ogura</i>
A z(A) és z(6) genotípusok nem rendelkeznek megfelelő citoplazmatikus hímsterilitási rendszerrel.		

Ilyen növényeket kaphatunk például protoplaszt fúziós technikával, illetve bármely más módszerrel, amely jó rekombinációt biztosít a kérdéses faj mitokondriális genomja és az *Ogura* mitokondriális genom között (példa a biológiai útra). Az ilyen növényekben a termékenység egyetlen helyreállító gén révén helyreáll, ennek jele RF1, és retékéből származik. Olyan növények esetében, amelyek a nem megfelelő, teljes mitokondriális genomot hordozzák, nem ez a helyzet.

Ilyen növényeket természetes vagy mesterséges szexuális reprodukcióval is előállíthatunk.

A találmány szerinti mitokondriális genomot hordozó növények a mitokondriumba való géntranszferrel is előállíthatók.

Mindegyik esetben ezek a növények megfelelő CMS-rendszerrel rendelkeznek, nevezetesen:

- teljes hímsterilitással
- olyan morfológiával, amely lehetővé teszi a jó beporzást és a jó magtermést, amint azt az 1. és 2. táblázatban bemutattuk.

A jelen találmány tárgya tehát ezenkívül eljárás hibrid növények előállítására, azzal jellemezve, hogy megfelelő CMS-jellemzőkkel rendelkező, a mitokondriális vagy sejtmaggenomjukban az *Ogura* sterilítási szekvenciát

hordozó növényt egy normál növényvel keresztezünk (pl. abban az esetben, ha étkezési vagy állati táplálkozásra alkalmas növény előállítására a célunk), vagy adott esetben (pl. akkor, ha magok begyűjtése a cél) egy olyan növényvel keresztezünk, amely egy, a fertilitást helyreállító gént, az RF1-et hordozza. A találmány vonatkozik továbbá az ezzel a módszerrel kapott hibrid növényekre is.

Általánosságban, a legjobb agronómiai tulajdonságokat olyan hímsteril növényekkel lehet megkapni,

amelyek a sejtmaggal azonos fajhoz tartozó kloroplasztokat hordoznak, és a mitokondriumok egy megfelelő hímsterilitási rendszert hordoznak.

Az 1. táblázatban különböző citoplazmával rendelkező káposzta-vonalak termőképessége látható (a Z9 vagy Z17 megfelelő). A 2. táblázat a különböző citoplazmájú colza vonal termőképességét mutatja (a Fu 27, Fu 58 és Fu 85 genotípusok a megfelelőek).

### 1. táblázat

A z-vonal (savanyúkáposzta) termőképessége különböző citoplazmákkal

Citoplazma		Genotípusok	Betakarított mag
Kloroplasztok	Mitokondriumok		Gramm/növény
B. oleracea	B. oleracea	(z)	53,1
(termékeny kontroll)			
B. napus	Ogura	(zC)	0
B. napus	Ogura/napus	(zA)	22,7
B. oleracea	Ogura	(z6)	9,3
Ogura	Ogura	(z0)	20,1
B. oleracea	Ogura/oleracea	(z9 vagy z17)	91,8

### 2. táblázat

A darmor vonal (téli colza) termőképessége különböző citoplazmákkal

	Termelés (%DARMOR)	Kloroplasztok	Mitokondriumok
DARMOR	100 (35 qx)	B. napus	B. napus
Fu 27	118	B. napus	B. napus/Ogura
Fu 58	120	B. napus	B. napus/Ogura
Fu 77	96	B. campestris	Ogura
Fu 85	114	B. napus	B. napus/Ogura
Fu 118	103	B. napus	B. napus/Ogura
BIENVENU	108		
JET NEUF	89		

\* Termelés

\*\* Hímtermékeny és hímsteril (Fu) DARMOR téli colza

### 2. táblázat (folytatás)

A termelés komponensei (Clermont-Ferrand)

	NSq	W1Sq	NSdP Sq	NSd	W1Sd	TDM	HI	YLD	HT
DARMOR	7183	81,9	9,9	70028	4,31	1077	0,256	31,6	120
BIENVENU	7334	80,7	11,2	81841	3,88	1064	0,269	30,7	109
JET NEUF	7977	87,7	8,6	67291	4,98	1176	0,262	33,3	115
Fu 27 DARMOR	9292	82,8	11,6	106188	4,09	1337	0,293	42,2	122
Fu 58 DARMOR	8617	76,5	11,7	99947	3,65	1228	0,270	36,0	131
Fu 118 DARMOR*	8389	84,6	11,0	92428	4,11	1243	0,276	38,1	132

NSq: a becőtermések száma/m<sup>2</sup>

W1Sq: egy becőtermés súlya (mg)

NSdP Sq: a magok száma/becőtermés

NSd: magok száma/m<sup>2</sup>

W1Sd: egy mag súlya (mg)

TDM: összes szárazanyag (g/m<sup>2</sup>)

HI: begyűjtési index (%)

YLD: termelés (qx/ha)

HT: magasság (cm)

\* Ezek a növények deformált terméseket (becőtermések) tartalmaznak

A jelen találmány tárgya emellett eljárás egy próba előállítására, amely próba legalább 10 boxból álló szekvenciát tartalmaz, előnyösen 15 boxból álló szekvenciát, a szekvenciát az 1. ábrán látható szekvencia 928-as és 1569-es nukleotidjai határolják; az említett próba jelezhető, például radioaktív bázis alkalmazásával, vagy bármely más eszközzel, például fluoreszcenciával. Ez a próba használható a hímsterilitás igazolására, és használható a klónok szelektálására.

A találmány szerinti megoldás néhány jellemzőjét és előnyét az alábbi példák segítségével is megvilágítjuk. A példák célja tehát szemléltetés, és semmiképpen sem a találmány oltalmi körének korlátozása.

### 1. példa

*Az Ogura citoplazmatikus hímsterilitásért felelős DNS-szekvencia kimutatása*

#### (1) Növény

A leírásban a „cybrid” szakkifejezés izolált protoplasztok fúziója után regenerált teljes növényekre vonatkozik. Az előállításnak ez a módja lehetővé teszi, hogy mindkét szülőből származó citoplazmatikus információt összekeverjük a sejtben. A 13. számú cybridet 820 olyan növény közül kaptuk, amelyeket egy Ogura-CMS-t hordozó, triazin-rezisztens B. napus cybrid (a 77. cybrid leszármazottja) [Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chétrit, P., Rémy, R., Rousselle, P. and Renard M., Molecular and General Genetics, 191, 244–250 (1983); Chétrit, P., Mathieu, C., Vedel, F., Pelletier, G. and Primard, C., Theor. Appl. Genet., 69, 361–366 (1985)] és a Brutor eredetű triazin-érzékeny és termékeny változat közötti fúzióval regenerálva állítottunk elő. Triazinrezisztencia-tesztet [Ducruet, J. M. and Gasquez, J., Chemosphere, 8, 691–696 (1978)] végeztünk egy levélmintán minden egyes regenerált növényből, és ez lehetővé tette a kloroplaszt típusának meghatározását (77-es szülőből származó triazin-rezisztens kloroplasztok, vagy Brutor vonalból származó triazin-érzékeny kloroplasztok). A növényeket növesztettük, és a virágzási stádiumban megfigyeltük. A nemszülői kombinációkat mutató növényeket (vagy érzékeny/hímsteril, vagy rezisztens/hímtermékeny növényeket) cybridekként izoláltuk. A 13-as cybrid érzékeny/hímsteril típusú. Az 1. cybrid rezisztens/hímtermékeny típusú.

#### (2) Nukleinsav-izolálás

Az össz-DNS-t négyhetes növényekből izoláltuk, Dellaporta módszerét alkalmazva [Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks J. B., Plant Molecular Biology Rep., 1, 19–21 (1983)]. A mitokondriális DNS-t nyolchetes növények leveleiből vonjuk ki, Vedel és Mathieu közlése alapján [Vedel, F. and Mathieu, C., Analytical Biochemistry, 127, 1–8 (1982)], az alábbi változtatásokkal: a mitokondriumokat nem tisztítjuk szacharóz gradiensen lízis előtt, és a lízist 4%-os szarkozilban végezzük 0,5 mg/ml proteináz K-val (Boehringer Mannheim GmbH), 50 mmol/l TRIS-HCl pH=8, 20 mmol/l EDTA összetételű pufferben. A kicsapás után a mitokondriális DNS-t centrifugálással tisztítjuk etidium-bromid/cézium-klorid gradiensen (1. módszer,

[Vedel, F. and Mathieu, C., Analytical Biochemistry, 127, 1–8 (1982)]) poliallomer centrifugacsövekben.

Az össz-RNS-t levelekből vagy virágrügyekből izoláljuk [Logemann, J., Schell, J. and Willmitzer, L., Analytical Biochemistry, 163, 16–20 (1987)].

A mitokondriális RNS-t nyolchetes karfiolnővényekből izoláltuk Stern és Newton módszerével [Stern, D. B. and Newton, K. J., Methods in Enzymology, 118, 488–496 (1986)].

(3) *A mitokondriális DNS restrikciós enzimes elemzése és agaróz-gélelektroforézise*

Ezeket a műveleteket a Pelletier és munkatársai által leírtak alapján végeztük [Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chétrit, P., Rémy, R., Rousselle, P. and Renard M., Molecular and General Genetics, 191, 244–250 (1983)]. Az össz- vagy mitokondriális RNS-t formaldehidet tartalmazó elektroforézis gélekre vittük, Sambrook és munkatársai által leírtak alapján [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

#### (4) Hibridizálás

A DNS vagy az RNS nylon szűrőlapokra való átvitelét (Hybond-N, Amersham) kapilláris abszorpcióval hajtottuk végre 6xSSC-vel (DNS) illetve 10xSSPE-vel (RNS), az előállítók előírásai szerint. Az előhibridizációt és a hibridizációt az Amersham előírásai szerint végeztük, a multiprimer DNS-jelölő rendszerrel (Amersham) készített próbák felhasználásával, Sephadex G–50 oszlopokon való tisztítás után [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

#### (5) *A mitokondriális DNS klónozása*

A hímsteril (13–7) és revertáns (13–6) cybrid vonalak genomiális könyvtárait EMBL3 lambda fágvektorban készítjük el, a restriktív Escherichia coli Nm539 törzsben tenyésztve [Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poutska, A. and Murray, N., Journal of Molecular Biology, 170, 827–842 (1983)]. Egy µg mitokondriális DNS-ből körülbelül 2,5x104 klónt kaptunk.

A mitokondriális DNS-könyvtárakat megvizsgáltuk és szélesztettük, hogy izolálhassuk a tarfoltokat, amelyeket nylon szűrőlapokra vittünk át [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. A két mitokondriális DNS-könyvtár átvizsgálásához használt hibridizációs próbákat az alábbiak szerint készítettük el: a cms-re specifikus mitokondriális DNS-fragmenst eluáltunk a Gene clean TM-eljárás alkalmazásával (BIO 101 INC.) egy mitokondriális DNS emésztési termékből, amelyet preparatív agaróz géltre vittünk. Az eluált DNS-t azután az előzőekben leírt módon megjelöltük.

A lambda DNS extrahálását, a 2,5 kb méretű NcoI fragmensz szubklónozását a pTrec99a plazmid NcoI hasítási helyére [Amman, E., Ochs, B. and Abel, K–J., Gene, 69, 301–315 (1988)], majd a plazmid-DNS extrahálását Maniatis és munkatársai által leírtak alapján végeztük [Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, NY (1989)]. A rekombináns plazmidokat *Escherichia coli* NM522 törzsbe juttatjuk be [Gough, J. and Murray, N., *Journal of Molecular Biology*, 166, 1–19 (1983)].

(6) *A 13-as cybrid és utódainak vizsgálata*

A 13-as cybrid Brutorral való beporzásakor kapott első generációban, amely 13 növényből áll, 5 teljesen hímsteril (beleértve a 13–2 és 13–7 növényeket), egy hímtermékeny (13–6-os), és 7 majdnem teljesen steril, néhány hímtermékeny virággal.

A 13–6-os termékeny növényt önmagával beporozzuk, majd Brutorral keresztezzük. Mindkét esetben csak termékeny növényeket kapunk (43-as és 42-es).

A 13–7-es hímsteril növény és a Brutor közötti keresztezésből 24 utód teljesen steril, hatnak van néhány steril virága, az eredmény hasonlít ahhoz, amit magával a cybriddel kaptunk. A 13–2-es növényt az RF helyreállító vonallal keresztezzük, amely az *Ogura* hímsterilitás specifikus helyreállító géneire nézve heterozigóta [Chétrit, P., Mathieu, C., Vedel, F., Pelletier, G. and Primard, C., *Theor. Appl. Genet.*, 69, 361–366 (1985)]. Ennek a keresztezésnek az utódjai között 53 hímsteril növény, 37 hímtermékeny növény és 9 olyan növény található, amely majdnem teljesen steril, de van néhány termékeny virágja. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a cybrid család hímsteril növényei tartalmazzák az *Ogura*-cms determinánst, a többi, korábban tanulmányozott, egyszerűbb helyreállítási profillal rendelkező cybridhez hasonlóan [Chétrit, P., Mathieu, C., Vedel, F., Pelletier, G. and Primard, C., *Theor. Appl. Genet.*, 69, 361–366 (1985)].

A vizsgálatnak ebben a stádiumában két lehetőséggel számolhatunk: vagy a 13-as cybrid tartalmaz „hímsteril” és „hímtermékeny” mitokondriális genomok keverékét, és lehetséges mindkét fenotípus további szelekciója, vagy a 13-as cybrid egy instabil szerkezetű rekombináns mitokondriális genomot tartalmaz, amely egy stabilabb „termékeny” konfigurációra revertál, és nem lesz lehetséges egy homogén hímsteril fenotípus fenntartása az egymás után következő generációkban.

A 13–7-es hímsteril növény utódaiból származó hímsteril növényeket vagy hajtások vágásával, vagy Brutorral való szexuális keresztezéssel fejlesztjük tovább. Különböző számú generáció után (1–5) mindkét módszerrel mindegyik család termékeny növényeket ad. Ezzel szemben az így kapott teljesen termékeny növények soha nem adnak ismét steril növényeket.

Ezeknek az eredményeknek a fényében megfontolás tárgyát képezheti, hogy az előzőkben javasolt második magyarázat a helyes, azaz hogy a 13-as cybrid egy instabil mitokondriális genomot tartalmaz, amely elveszti az *Ogura*-cms determinánst a „termékeny” konfigurációhoz vezető folyamat során, anélkül hogy lehetősége lenne egy steril fenotípushoz való visszatérésre.

(7) *Összehasonlítás a hímsteril és a termékeny revertáns utódok mitokondriális DNS-ei között. A hímsteril növényekre specifikus fragmens izolálása*

A mitokondriális DNS-t hímsteril 13–7-es utód és termékeny revertáns (13–6 vagy 13–7 utód) leveleiből

vontuk ki, majd számos restrikciós enzimmel emésztettük, hogy összehasonlítsuk restrikciós profiljukat. A két típus mitokondriális genomjai nagyon hasonlóak, mivel számos különböző enzimmel emésztve nem figyelhető meg különbség a hímsteril mitokondriumok és a termékeny revertánsok mitokondriumának restrikciós profilja között. Azonban egy 6,8 kb méretű restrikciós fragmenst lehetett kimutatni a hímsteril növények NruI restrikciós enzimmel emésztett mitokondriális DNS-ében, és ezt soha nem lehetett megfigyelni a termékeny revertánsok megfelelő profiljában.

A fragmenst (a továbbiakban mint N6,8-at említjük), agarózgélből eluáljuk, jelöljük, majd próbaként használjuk NruI restrikciós enzimmel emésztett mitokondriális DNS-eken: egy erős jel volt megfigyelhető 6,8 kb-nál a 13-as cybrid összes hímsteril utódjában, míg nem volt megfigyelhető ilyen méretű, a próbával hibridizálódó fragmens a termékeny revertánsok mitokondriumainak genomjában. Emellett az N6,8 próba hibridizál egy 6,8 kb méretű fragmensen, amely az *Ogura* mitokondriális DNS NruI emésztéséből származik, viszont nem hibridizál a *B. napus cv Brutor* mitokondriális DNS-ével, jelezve, hogy ez a fragmens *Ogura* eredetű.

Hímsteril növényekből (13–7) származó mitokondriális DNS-kivonatokat tartalmazó lambda-könyvtárat vizsgálunk a jelölt eluált fragmensekkel, és a 8 hibridizálódó klón közül 2 rekombináns fagot izoláltunk, amelyek a teljes N6.8 fragmenst és a szomszédos szekvenciákat tartalmazták. Ennek a régióknak egy részletes restrikciós térképét is elkészítettük. A 13-as cybrid termékeny és steril utódaiból származó mitokondriális DNS restrikciós profiljainak a hibridizációja az N6.8-cal mint próbával lehetővé tette, hogy a hímsteril genotípusért felelős specifikus régió méretét egy 2,5 kb méretű NcoI fragmensre korlátozzuk.

A 2,5 kb méretű NcoI fragmenst megjelöltük, és próbaként használjuk a 13–7 és 13–6 utódok NcoI-gyel emésztett mitokondriális DNS-e vizsgálata során. A hímsteril profilra specifikus 2,5 kb méretű jel mellett számos NcoI fragmens hibridizál mind a termékeny revertáns, mind a hímsteril profilokban; ezeknek a fragmenseknek a mérete 2,2, 10 és 14 kb. Egy 2,7 kb méretű NcoI fragmens erősen hibridizál a termékeny utód mitokondriális genomjában, de nem hibridizál a steril utód mitokondriális genomjában. A hibridizációs profil elemzése ahhoz a következtetéshez vezet, hogy a 2,5 kb méretű NcoI fragmens, jóllehet specifikus a hímsteril mitokondriális DNS-re, olyan szekvenciákat is tartalmaz, amelyek a mitokondriális genomban máshol ismétlődnek (az NcoI emésztés után a 2,2, 10 és 14 kb méretű fragmensekben), és ezek az ismétlődő szekvenciák a termékeny revertánsok mitokondriális DNS-én is jelen vannak, a 2,7 kb méretű specifikus fragmens mellett.

A 13-as cybrid, illetve egy hímsteril vagy termékeny cybrid (más fúziós kísérletekből származik) vagy a Brutor vonal utódjainak leveleiből vagy rügyeiből össz-RNS-t vontunk ki. Northern blot elemzést végzünk, majd a blotokat egy olyan próbával hibridizál-

juk, amely megfelel a 3. példában leírt, az N6.8-at tartalmazó lambda klón inszertjének. Egy fő 1,4 kb méretű transzkriptumot detektálhatunk mindegyik hímsteril hibridben, beleértve a 13–7-es cybridet, miközben ilyen méretű transzkriptum nem figyelhető meg a Brutor vonalban vagy a két termékeny cybridben (ezek nem azonosak a 13-assal). A termékeny növények ezzel szemben egy 1,1 kb méretű transzkriptumot tartalmaznak, amely hibridizál a próbával, de amely nincs jelen vagy csak nagyon alacsony szinten van jelen az összes vizsgált hímsteril cybridben. Számos transzkriptum, amely közös az összes mintában, gyengén hibridizál a próbával a jelzett inszert nagy méretének következtében. Megerősítettük, hogy a mitokondriális transzkriptumok kimutathatók össz-

RNS mintákban, oly módon, hogy ugyanazt a Northern blotot az atpa gén-szekvenciát tartalmazó DNS-fragmenttal hibridizáltuk. Ugyanazt a specifikus 1,4 kb méretű transzkriptumot találjuk meg a karfiolból kivont Ogura mitokondriális RNS-ben, a 2,5 kb méretű NcoI-fragment használva próbaként. Ennek a transzkriptumnak a pontos korlátait a 2,5 kb méretű NcoI-fragment szubklónjait próbaként használva határoztuk meg.

#### (8) Az 1-es cybrid és utódjainak tanulmányozása

Az 1-es cybrid hímtermékeny. Az utódai közül az 1.12 növény termékeny, az 1.18 növény steril. Az 1.12 növény utódai között vannak steril növények (S3) és termékeny növények (RF3). Az 1.18-as növény utódai között vannak steril növények és egy termékeny csoport (RF2). Az S2 és S3 növényeket ugyanaz a virágpor-termékenységet helyreállító sejttaggén állítja helyre, mint a steril 13-as cybridet.

A jelölt 2,5 kb méretű NcoI fragmenttal végzett hibridizáció során az S2 és S3 növények mitokondriális DNS-e nem ad jelet 2,5 kb-nál az NcoI-nyel végzett emésztés során, illetve 6,8 kb-nál, az NruI-nyel végzett emésztés során.

Hasonlóképpen, az össz-RNS-sel végzett hibridizálás (Northern blot) egy olyan próbával, amely megfelel az ORFB-szekvenciáknak, nem ad jelet 1,4 kb-nál, amint az a steril 13-as cybriddel történik. Ezzel szemben az 1. ábrán a 928-as és 1569-es nukleotidokkal határolt szekvenciának megfelelő próba jelet ad a Northern blotban, körülbelül 1,3 kb-nál. Ez a jel hiányzik az RF1, RF2, RF3 vagy Brutor növényekből. Hasonlóképpen, lehetséges ezt a szekvenciát (928–1569) próbaként használni össz-RNS dot-blotolásánál, és ebben az esetben csak a hímsteril növények adnak jelet, azok közül azonban mindegyik.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az S2 és S3 növények, annak ellenére, hogy hímsterilek, nem tartják meg az 1. ábrán bemutatott szekvenciát az eredeti konformációjában, és azt demonstrálják, hogy ebben a szekvenciában a 928-as és 1569-es nukleotidok által határolt rész az, amely az „Ogura sterilitás” specifikus determinánsát hordozza, amely a növényeket hímsterillé teszi, amikor ez a szekvencia átíródik.

Ennek a szekvenciának nincs jelentős homológiája az adatbankokban található szekvenciákkal.

#### 2. példa

##### *Nemkívánatos szekvenciák kimutatása az Ogura mitokondriális genomon*

Egy cybrid-kollekciót állítottunk elő a *B. napus* fajon belül egy Ogura citoplazmát hordozó colza és egy normál colza között végzett protoplaszt-fúzióval. Az előbbi hímsteril és klorofill deficiens alacsony hőmérsékleten, míg az utóbbi normálisan zöld és termékeny. A cybrideket kiválasztottuk a regenerált növények közül, és azokat használtuk, amelyek hímsterilek és normális zöldek voltak.

Azonos módon, egy cybrid kollekciót állítottunk elő a *B. oleracea* fajon belül is egy Ogura citoplazmát hordozó káposzta és egy normál káposzta között végzett protoplaszt fúzióval. A hímsteril és normális zöld cybrideket használtuk a regenerált növények közül.

Ezeket a cybrideket colza különböző változataival kereszteztük az első esetben és káposztával a második esetben. A keresztezéseket minden egyes generációnál megismételjük ugyanazokkal a változatokkal, hogy így olyan meghatározott genotípust kapjunk, amely az ismételt alkalmazott változathoz közel áll.

Ezeket az eltérő változatokat így módon átalakítva a különböző cybridek citoplazmaival, mezőgazdasági teszteknek vetjük alá, hogy mérjük a magtermelést, ami több faktortól függ: elegendő nektár termelése ahhoz, hogy a rovarok által való beporzást befolyásoljuk, továbbá normális virágmorfológia, hogy ez a beporzás hatékony legyen és a gyümölcsök normálisan fejlődjenek.

A cybridek gyűjteményét tehát két csoportra lehetett osztani:

- egy olyan cybrid csoportra, amely a kereskedelmi magtermeléshez illesztett hímsterilitást tartalmaz;
- egy olyan cybrid csoportra, amely nem tartalmazza a jó kereskedelmi magtermeléshez szükséges összes jellemzőt.

A 27-es, 58-as és 85-ös colza hibridek, valamint a 9-es, 17-es, 21-es, 24-es és a 24c káposzta hibridek például az első csoportba tartoznak. A 23s, 77-es, 118-as colza hibridek és az 1-es, 6-os és 14-es káposzta hibridek például a második csoporthoz tartoznak.

Ezeknek a cybrideknek az össz-DNS-ét SallI, NcoI, NruI, BglI, PstI és KpnI enzimekkel emésztjük. A kapott Southern blot-okat hibridizáltattuk a különböző mitokondriális próbákkal, az Atpa, Cob, Cox1, Atp6, 26S és 18S próbákkal és az Ogura genom két fragmentumával, az egyik egy 2,5 kb méretű, az NcoI emésztésből származik és egy 19,4 kb méretű, amely egy NruI emésztésből származik.

A két cybrid csoport az alábbiakban különbözik egymástól:

- a) A 23s, 77 és 22s colza cybridek és az 1, 16 és 11 káposzta hibridek tartalmazzák az Ogura genomnak azt a régióját, amely körülveszi a Cox1 gént, és amelyet a 10,7 kb méretű BglI vagy a 11 kb méretű NruI fragmentumok ismernek fel, és az Ogura genomnak azt a régióját, amely körülveszi az egyik formilmetionin transzfer RNS-gént, és amelyet az 5,1 kb méretű SallI illetve a 15 kb méretű NruI fragmentumok ismer fel.

b) A 27, 58 és 85 colza cybridek, és a 9, 17, 21 és 27c káposzta cybridek nem tartalmazzák a megfelelő régiókat, amelyek a két szülő fuzionált genomja közötti rekombináció eredményeképpen helyettesítődtek a 27, 58 és 85 colza és a 9, 17, 21, 24 és 27c káposzták mitokondriális genomjának analóg régióival.

A fentiekből azt a következtetést lehet levonni, hogy az Ogura genom két kérdéses régiója nemkívánatos, ha a kereskedelmi magtermeléshez van szükség a hímsterilitási rendszerre.

### 3. példa

Ebben a példában az „Ogura hímsterilitási szekvenciák” és a nemkívánatos szekvenciák ismeretének értékét mutatjuk be a kapott cybridek azonnali osztályozása céljából, anélkül hogy sok évig várnunk kellene a visszakeresztezésre és a mezőgazdasági tesztekre.

Az Ogura citoplazmát hordozó *Brassica* növények protoplasztjait fuzionáltatjuk a kérdéses *Brassica* fajok protoplasztjaival. A fúzióból származó telepeket in vitro tenyésztjük, majd regeneráljuk olyan táptalajon, amely elősegíti a rügyképződést [Pelletier, G., Primard, C., Vedel, F., Chétrit, P., Rémy, R., Rousselle, P. and Renard M., Molecular and General Genetics, 191, 244–250 (1983)].

Egy gramm friss anyagból, ami lehet kallusz vagy a regenerált növény egy fragmense, lehetséges az előzőekben leírt technikák alkalmazásával össz-DNS-t izolálni. A Sall emésztés után Southern blot hibridizálást végzünk a 389–1199-es nukleotidok által határolt szekvenciával (lásd 1. ábra), ekkor csak egy 4,4 kb méretű jelet szabad kapni (5,1 kb-nál nem szabad jelet kapni). Hasonlóképpen, NruI emésztés után és a Cox1 gént hordozó próbával végzett hibridizálás után egy olyan jelet kell hogy kapjunk, amelynek mérete 11 kb-tól eltérő.

Ezek a hibridizációk lehetővé teszik, hogy meg tudjuk mondani, hogy a kapott növény valóban hímsteril-e, és alkalmas-e kereskedelmi magtermelésre.

### 4. példa

Ez a példa a 3. példa egy változata, és azon az elképzelésen alapul, hogy a két szülő között szexuális keresztezéseket hajtunk végre speciális körülmények között vagy bizonyos genotípusokkal, ahelyett hogy protoplaszt fúziókat végeznénk, ami azzal az eredménnyel járna, hogy a növények ismert termékenyítésével ellentétben, az ooszférák és pollentömlők vagy a hím gaméták citoplazmái összekeverednek. Ha ilyen módszereket írnának le, akkor korai szelekciót lehetne végrehajtani az ezekből a mesterséges megtermékenyítésekből származó fiatal növényeken, ugyanolyan módon, ugyanazokat a próbákat és kritériumokat alkalmazva, mint a 3. példában.

### 5. példa

Ez a példa azt mutatja, hogy milyen értéke van annak, ha ismerjük az Ogura sterilítási szekvenciát egy olyan típusú genetikai manipulációban, amelyet élesztők esetében már leírtak [Johnston, S. A., Anziano, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C. and Butow, R. A., Science, 240, 1538–1541 (1988)].

Egy normális *Brassica* növényből kiindulva a merisztémákat vagy egy másik módszer szerint sejteket in vitro bombázunk olyan mikrorészecskékkel, amelyeket az Ogura sterilítási szekvenciát hordozó DNS-sel borítottunk. A kezelt merisztémák vagy a regenerált növények utódai citoplazmatikusan hímsterilek, ha a DNS képes bejutni a mitokondriumokba és integrálódik ezeknek a sejtstruktúráknak a genomjába. Ez az eljárás elkerüli azokat a problémákat, amelyeket a nemkívánatos szekvenciák okoznak, akkor, amikor az Ogura retek kloroplasztok vagy az Ogura mitokondriális genom meghatározott szekvenciái szerepet játszanak.

### 6. példa

Ez a példa azt illusztrálja, hogy milyen értéke van annak, ha ismerjük az „Ogura sterilítási” szekvenciát egy, nem citoplazmatikus, a Mendeli öröklésnek megfelelő sejtmagban kódolt hímsterilitásnak génsebészeti módszerekkel történő előállításánál.

A 928-as és 1569-es nukleotidok által határolt mitokondriális DNS-szekvenciából kiindulva kiméra gén készíthető, amelyik, miután vele *Brassica*-sejteket vagy más nemzetség sejtjeit genetikailag transzformáltuk, átíródik a kapott transzformált növények sejtjeinek sejtmagjában. Amennyiben a kiméra gén tartalmaz egy preszekvenciát, amely transzlatált fehérjetermékét képessé teszi arra, hogy a mitokondriumba jusson, ezek a transzformánsok hímsterilek lesznek, és ez a tulajdonságuk domináns mendeli tulajdonságként viselkedik.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás *Brassica*-nemzetségbe tartozó növénynek CMS fenotípust és nőivarú termékenységgel kompatibilis morfológiát biztosító rekombináns növényi sejtmaggenom vagy mitokondriális genom előállítására, azzal jellemezve, hogy

a) egy, az 1. ábrán bemutatott szekvencia 928–1568. nukleotidjainak megfelelő szekvenciával legalább 90%-ban homológ szekvenciát tartalmazó Ogura sterilítási szekvenciát juttatunk be, és

b) igazoljuk egy – cox1-próbával végzett hibridizációval kimutatható – BglI-emésztéssel kapható, 10,7 kb hosszúságú vagy egy NruI-emésztéssel kapható, 11 kb hosszúságú fragmens által hordozott nemkívánatos szekvencia, és/vagy egy – formilmetionin-transzfer-RNA-próbával végzett hibridizációval kimutatható – Sall-emésztéssel kapható, 5,1 kb hosszúságú vagy NruI-emésztéssel kapható, 15 kb hosszúságú vagy BglI-emésztéssel kapható, 18,5 kb hosszúságú fragmens által hordozott szekvencia hiányát.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy formilmetionin-transzfer-RNA-próbaként az 1. ábrán bemutatott, 373–1179. nukleotidoknak megfelelő szekvencia egy fragmensét alkalmazzuk.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy bejuttatandó szekvenciaként egy, transzlatált terméket a mitokondriumokba bejuttatni képes preszekvenciát is tartalmazó szekvenciát a juttatunk be.

4. Eljárás az 1–3. igénypontok bármelyike szerint előállított, módosított genomot tartalmazó *Brassica*-nemzetséghez tartozó növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a növényt protoplaszt-fúzióval állítjuk elő.

5. Eljárás az 1–3. igénypontok bármelyike szerint előállított, módosított genomot tartalmazó *Brassica*-nemzetséghez tartozó növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a növényt szexuális reprodukcióval állítjuk elő.

6. Eljárás az 1–3. igénypontok bármelyike szerint előállított, módosított genomot tartalmazó *Brassica*-nemzetséghez tartozó növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a növényt genomjába történő génbevitel segítségével állítjuk elő.

7. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica napus* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

8. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica oleracea* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

9. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó

növényként *Brassica campestris* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

10. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica juncea* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

11. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica nigra* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

12. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica hirta* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

13. A 4–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy módosított genomot tartalmazó növényként *Brassica carinata* fajhoz tartozó növényt állítunk elő.

14. Eljárás hibrid növények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 7–13. igénypontok bármelyike szerint előállított növényt ugyanahhoz a fajhoz tartozó, adott esetben termékenységet helyreállító génnel rendelkező növényvel keresztezünk.



			F			
			Cn		E	MBS
	B M		AvuBF	M	c	RasnRS
	b s		li4sa	n	o	seaasp
	v e		uJHmu	l	N	aIABal
	I I		IIIII	I	I	IIIII
			//			//

241 -----  
 ACAAAGTGTACTCTTTTTTAAGAGTTAGCTGCATTCCTGCGGGAGGTACGTACGCAAT  
 -----  
 TTTTTGACAAATGAGAAAAAATTCTCAATCGACGTAAGGACGCCCTCCATGCATGCGTTA 300

		B			
	E	s			
	F c	p			N
	n o	lM		B	l
M	u P	2aB	M	s	a
w	4 l	8eb	w	p	I
o	H 5	6Iv	o	M	I
I	I I	III	I	I	I
		/			

301 -----  
 CAAAGCAGCAGGGCAGGTTTCGCAACACCTGCTTCAACTTCATGCACATTAGCAACAAGAT  
 -----  
 GTTTCGTCGTCCCCTGCAAGCGTTGTGGACGAAGTTGAAGTACGTGTAATCGTTGTCTA 360

			F F			E
			CnBn C			cBS
	M B		AvusuPAvS		B	S
	n b		li4p4slif		b	f
	l v		uJHCHtuJe		v	e
	I I		IIIIIIII		I	I
			//			//

361 -----  
 TGGGTAGTTGATTGTTGGGAGGATAGCTGCAGCTCCCTACGGGAGTGAAGTACAGTTCCA  
 -----  
 ACCCATCAACTAACACCCTCCTATCGACGTCGAGGGATGCCCTCACTTGATGTCAAGGT 420

		B				
		s				
		p	S H	C		
	lH	Ba Ca	f C			M
	2g	su ve	rMM v	F HT	E	b
	8l	p9 iI	lns i	a nh	a	o
	6A	C6 JI	0lp J	u aa	r	I
	II	II II	III I	I II	I	I
		/	/	/	/	

421 -----  
 GGGGGAGCACAGCAAGGGCCAATACCGGCTGTGAGGCGCGTAGCGGGAAGAGATGTATGG  
 -----  
 CCCCCTCGTGTCTCCCGTTATGGCCGACACTCCGCGCATCGCCCTTCTCTACATACC 480

				S		
	C			Ba	B	
	Av	M		A	su D	sFS M
	li	s		l	a3 p	aot n
	uJ	e		w	BA n	Jky l
	II	I		I	II I	III I
		/				//

481 -----  
 TAAGGGATAGCTGTTTAACCATTTGTAATGGAATGGGATGTTGATCCTCCTTGAATAAT  
 -----  
 ATTCCCTATCGACAAATTGGTAAACATTACCTTACCCTRCAACTAGGAGGAACCTTATTA 540

1. ábra (polyt.)

MBS				M			F
asn	M	X	CB		T		n
aaa	m	m	CS		a		uS
IAB	e	n	IF		q		4p
---	:	:	II		I		Hi
							II

541 ACGTATAAAGAGATTTCATTCCAGTTGGAAAGCAATCGAGAAAACGCCGCCAAATA  
 ----- 600  
 TGCATATATTCTTCTAAAAGTAAGGTCAACCTTTCGTTAGCTCTTTTGGCGCGGGTTTAT

A							
fSM	C		HB			B	
lsaP	v	p	ls	NT	M	MBSM	
faem	i	l	np	rh	l	ssmc	
IAII	J	e	fM	ua	y	paAr	
IIII	:	:	II	II	I	IIII	
	//			/		//	

601 CGCTTCGCCACGTGTAGCCCTGTATGGACTCGCGAAGCAGGTCTCCGGTCGGTGTCEAAG  
 ----- 660  
 GCGAAGCGGTGCACATCGGGACATACCTGAGCGCTTCGTCCAGAGGCCAGCCACAGTTTC

S						
a						MBS
u D	M					asnB
3 p	n					eaab
A n	l					IABv
I I	I					IIII

661 ATTTGATCTAACTATTGAGTGAGGACTACTTACCGATTGATAGAATAATACGTATATAAG  
 ----- 720  
 TAACTAGATTGATAACTCACTCCTGATGAATGGCTAACTATCTTATTATGCATATATTC

F		S				
Cn	M	a		T	H	H
Avu	b	u D	T	sM	Ha	i
li4	o	3 p	a	ps	he	n
uJH	I	A n	q	Ee	aI	f
III	I	I, I	I	II	II	I
	//					

721 AAGAAGCTGCTTTGTGGAGTGATCTTCTCGAAATGAATTAAGTAAGGCGCTATGTTTCAG  
 ----- 780  
 TTCTTCGACGAAACACCTCACTAGAAAGAGCTTTACTTAATTCATTCCGCGATACAAGTC

A	D			C		E	
T l	r	MSM		v	M	c	B
f w	d	npa		i	w	5	3A
i N	I	lee		J	o	7	Ja
I I	I	III		I	I	I	II

781 ATTCTGAACCAAAGCACTAGTTGAGGTCTGAAGCCTTATGAGCAGAAGTAATAAATACCT  
 ----- 840  
 TAAGACTTGGTTTCGTGATCAACTCCAGACTTCGGAATACTCGTCTTCATTATTTATGGA

1. ábra (polyt.)

			M	T	H		C B	N	
F	M	M	b	s	i		v s	a	
a	n	n	o	p	c		i p	i	
u	l	l	r	e	:		J H	:	
I	I	I	I	I	I		I I	I	

CGGGGAAGAAGCGGGGTAGAGGAATTGGTCAACTCATCAGGCTCATGACCTGAAGATTAC  
 ----- 341 ----- 900  
 GCGCCCTTCTTCGCCCCATCTCCTTAACCAGTTGAGTAGTCCGAGTACTGGACTTCTAATG

		E					S		
M		c					f		T
b		o	F	S	F		a		a
o		5	i	p	a		N		q
I		7	n	i	u		I		I
I		I	I	I	I				

AGGTTCAAATCCTGTCCCGCACCGTAGTTTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATC  
 ----- 901 ----- 960  
 TCCAAGTTTAGGACAGGGGCGTGGCATCAAAGTAAGACGTAGTGAGAGGGACAGCAATAG

			H X		M TE				
			G GCa m		aBsc		M		
			d EdveMa		ecpo		b S		
			i aiiIcI		Ie45		o p		
			I eIJIrI		If57		I i		
			I IIIIII		IIII		I I		
			/ / /						

GACATCGCAAGGTTTTTGAACGGCCGAAACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTCAGC  
 ----- 961 ----- 1020  
 CTGTAGCGTTCCAAAAACTTTGCCGGCTTTGCCCTTCACTGTTATGGCGAAAAGAAGTCG

			B		T				
			sT		s				
			ta		p				
			Bq		E				
			II		I				
			/						

ATATAAATGCAATGATTACCTTTTTCGAAAAATGTCCACTTTTTGTGCATAATCTCACTC  
 ----- 1021 ----- 1080  
 TATATTTACGTTACTAATGGAAAAAGCTTTTTAACAGGTGAAAAACAGTATTAGAGTGAG

							S H		
							aCa		
						Av	uve		
						li	9iI		
						uJ	6JI		
						II	III		
						/	/		

CTACTGAATGTAAAGTTAGTGTAAATAAGTTTCTTTCTTTAGCTTTTTTACTAATGGCCC  
 ----- 1081 ----- 1140  
 GATGACTTACATTTCAATCACATTATTCAAAGAAAGAAAATCGAAAAATGATTACCGGG

1. ábra (polyt.).

	C    C		N    S
	vDE   Av		3D    L    a    E
	ids   li		sr    a    u    DSMX
	Jep   uJ		md    i    j    ppap
	III   II		AI    i    A    nJea
	/    /		II    i    i    IIII
	/    /		/    /

1141 ATATTTGGGCTAAGCTGGTTTTTCTAACCAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACGATCTA 1200  
 -----  
 TATAAACCGATTTCGACCAAAAAGATTGTTGGTTGTAACAAATGCTTGGTACTCTGCTAGAT

	T		
	a		
	qT		C
M	s	N	Is
s	p	d	ip
e	E	e	-E
I	I	I	2I
			vM
			ia
			Je
			II
			I

1201 GAGAAGTTAAAAATCCATATGAATTTTCAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAATTTACAATA 1260  
 -----  
 CTCTTCAATTTTAAAGGTATACTTAAAGTCATACCCACCGATCCACAGTTTTAATGTTAT

	M T		
	a s		B
R	e p	H	s
s	I 4	p	m
a	I 5	n	A
I	I I	I	I

1261 AAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAAGTCTCACCTATCATTAAAGGGGAA 1320  
 -----  
 TTTAGTTTACATGGATTGCTACTTCACTGCTTTTTTCAGAGTGGATAGTAATTTCCCCCTT

	M		
	n		M
l	l	l	l
I	I	I	I

1321 ATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAA 1380  
 -----  
 TATCTCCCTTTCTCCTTTTTTTCTCCCTTTCCCTTTATCTCCCTTTCTCCTTTTT

	M		T
	n	n	s
l	l	l	p
I	I	I	E

1381 AAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGTGGAAAATTGACCG 1440  
 -----  
 TTTCTCCCTTTCCCTTTATCTCCCTTTCTCCTTTTTTTCTCCACCTTTAACTGGC

1. ábra (folyt.)

	T				
	a				
	q				
	I		I		
	I		Ms		
	-		fp		
	l		eE		
			II		
			/		

AGAAAATAATGCTTTGTGAACCCAATTGCTTTGACAAAAATAAGAAAGAAGCAAAATCT  
 1441 ----- 1500  
 TCTTTTATTACGAAACACTTGGGTAAACGAAACTGTTTTATTCTTTCTTCGTTTTAGA

			S			N
T			BB a	M		l
s	E		gsDu	b		a X
p	a		lepJ	o		I c
E	r		IYnA	I		I m
I	I		IIII	I		I I
			//			

CATTCATTTGAAATAGAAGAGATCTCTATGCCCCCTGTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTT  
 1501 ----- 1560  
 GTAAGTTAAACTTTATCTTCTCTAGAGATACGGGGGACAAGAACCAAAAGAGGGTACGAA

	H					
	l		M			C
	n		bs		M	M
	c		of		n	a
	I		Ie		l	e
	I		II		I	I
			//			

TTGTTGGTCAACAACCAACCACAACCTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGAC  
 1561 ----- 1620  
 AACCAACCAGTTGTTGGTTGGTGTGAAAGATATCAAGAAGTGATGAGGATCTCCGAACGT

						N
	C		H		T	l
	AVM		iT		G	sAM
	lin		nf		s	pss
	uJl		fi		u	Eee
	III		II		I	III
			//			

GGAGTGAAGCTGTCTGGAGGAATCATTGTTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCA  
 1621 ----- 1680  
 CCTCACTTCGACAGACCTCCCTTAGTAAACAACCTTTAGTTAATTAGATTAGTACGGAGT

	T		M	T		M
	BM s		b	s		b
	sn p		o	p		o
	rl E		I	E		I
	II I		I	I		I
			//			

ACTGGATAAATCACTTATTTTTCACAATCTTCTGGTTATGCCTTTTCTTTACTTT  
 1681 ----- 1740  
 TGACCTATTTAAGTGAATAAAAAGTGTTAAGAAGACCAATACGGAAAAGAAGAAATGAAA

1. ábra (folyt.)



				S		
				a		T
T	M	B	l	D	A	s
a	n	s	3	p	l	p
q	l	r	A	n	w	E
I	I	I	I	I	I	I

2041 TATATCGAAGTCCTCTCCTTCAAATACTGGAAGGTGGATCACTTGTAGGAATTGTAGGAA  
 -----> 2100  
 ATATAGCTTCAGGAGAGGAAGTTTATGACCTTCCACCTAGTGAACATCCTTAACATCCTT

	N	N	H		
	l	l	BC	a	H
a	XR	EaBsvHeSM			IT
I	cs	alaaiiaItw			nf
I	ma	eIlJJeIyo			fi
I	II	IIIIIIII			II

////

2101 TGACATAATGCTAATCCATGTTGTACATGGCCAAGGAAGCATAAAATGATTCTTTTCATTC  
 -----> 2160  
 ACTGTATTACGATTAGGTACAACATGTACCGGTTCCCTTCGTATTTTACTAAGAAAGTAAG

				E	*
				c	
				o	
				R	
				l	
				2	B
E	M			4F	MT s
c	n			/a	nh p
o	l			3u	la C
N	I			II	II I
I	I			/	/

2161 FATAGATACCTCTGGTAGGTAAAGCACTCTACTGTGCTTTATTGAAAGTTCCCATCGCGG  
 -----> 2220  
 ATATCTATGGAGACCATCCATTTTCGTGAGATGACACGAAATAACTTTCAAGGGTAGCGCC

	B			C	H	E
	s	T	T	P	v	i
	p	h	a	l	i	n
	C	a	q	e	J	f
	I	I	I	I	I	I

2221 GGGCGAGGATACTTGCCTTCGCGGTTTCGACTTTCTTTTCAGGCTTGACTCATTATTTTCC  
 -----> 2280  
 CCCGCTCCTATGAACGGAAGCGCCAAGCTGAAAGAAAAGTCCGAACTGAGTAATAAAAGG

		B			
		s			
S		P			
Aa		S	CB1H		H
vu	M	fAva2gS			IT
a9	n	alin8is			nf
I6	l	NuJI6At			fi
II	I	IIIIIIII			II

/

2281 GGTCTCTCACACCCCTTTAGAGCTCTTTATGATGCCCACTGAGTAAGATTCTGGGGGCTT  
 -----> 2340  
 CCAGGAGAGTGTGGGAAATCTCGAGAAATACTACGGGTGACTCATTCTAAGCCCCCGAA

1. ábra (p/lyt.)

N

	S	B	C		B	SS	ENM		B		M	
	MNe	H	s	Av	F	sDpa	ST	slb	ST	E	a	EM
	scr	h	p	li	a	asBcph	pa	o	na	a	e	an
	piF	a	C	uJ	u	JaIIia	3II		Aq	r	I	rl
	III	:	I	II	:	IIIIII	IVI		II	I	I	II
	//		/			/	//	/				/

CCCGGCGCAGAAGCTCATTCTGAACCGCGGGAACCTTCGTCTCTTCGACACAAACGTTTT  
 2341 -----> 2400  
 TGGCGCGCTCTTCGAGTAAGACTTGGCGCCCTTGAAGCAGAGAAGCTGTGTTTGCAAAA

S

	C	M		BBB	N	a
	v	M	b	A	sa	DlHu
	i	n	o	l	amtpap	3
	J	l	I	w	SHYnIhA	
	I	I	I	I	IIIVII	
					//	/

ATGAAGAGGCTGATGGTGATGAGGATCC  
 2401 -----> 2428  
 TACTTCTCCGACTACCACTACTCCTAGG

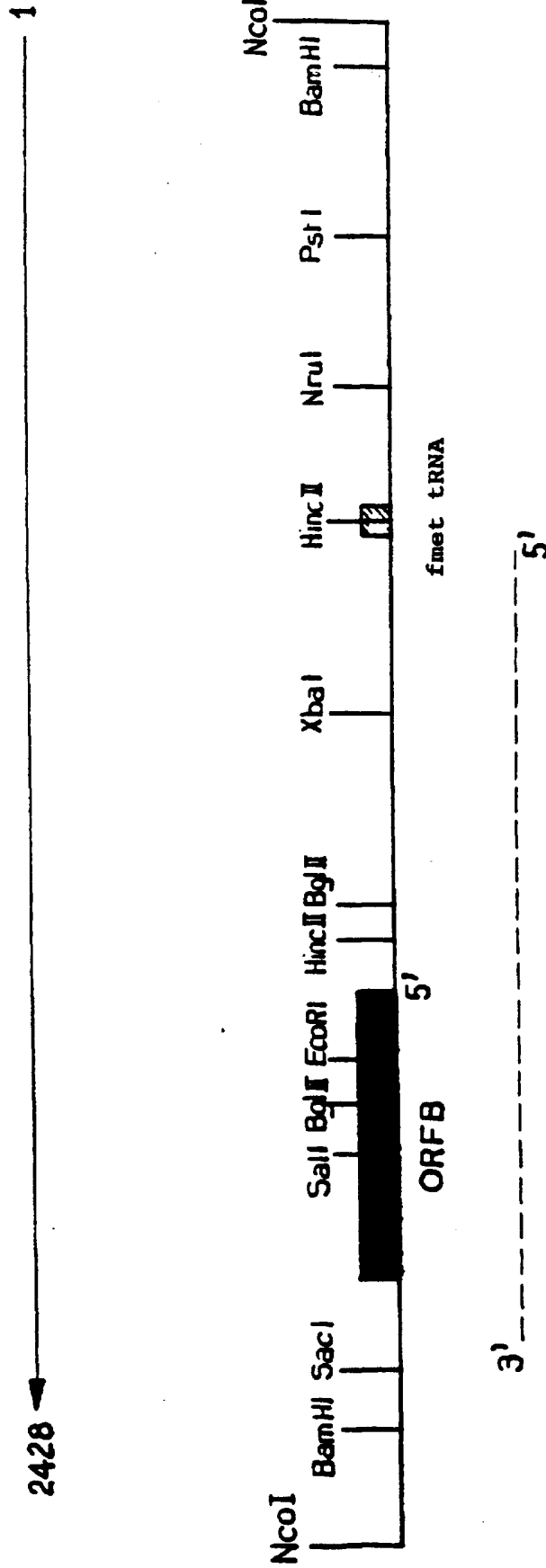
Hasító enzimek:

- |            |          |       |          |         |         |        |          |
|------------|----------|-------|----------|---------|---------|--------|----------|
| AccI       | AflIII   | AluI  | AlwI     | AlwNI   | AseI    | AvaI   | AvaII    |
| BalI       | BamHI    | BanII | BbvI     | BbvII   | BceII   | BglII  | Bpu10I   |
| BsaI       | BsaAI    | BsaBI | BsaJI    | BsiI    | BsmI    | BsmAI  | Bsp1286I |
| BspCI      | BspHI    | BspMI | BsrI     | BstBI   | BstXI   | BstYI  | Cfr10I   |
| CviJI      | DdeI     | OpnI  | DrdII    | DsaI    | EaeI    | EarI   | Eco57I   |
| EcoBI      | EcoDI    | EcoNI | EcoO109I | EcoPI   | EcoP15I | EcoRI  | EcoRII   |
| EcoR124/3I | EspI     | Esp3I | FauI     | FinI    | Fnu4HI  | FokI   | GdiII    |
| GsuI       | HaeI     | HaeII | HaeIII   | HgiAI   | HhaI    | HincII | HinfI    |
| HphI       | MaeI     | MaeII | MaeIII   | MboII   | McrI    | MfeI   | MlyI     |
| MmeI       | MnlI     | MseI  | MspI     | MwoI    | NciI    | NcoI   | NdeI     |
| NheI       | NlaIII   | NlaIV | NruI     | Nsp8II  | PleI    | PmlI   | PpuMI    |
| PstI       | RsaI     | SacII | SalI     | Sau96I  | Sau3AI  | ScaI   | ScrFI    |
| SfaNI      | SfeI     | SnaBI | SpeI     | SpiI    | SplI    | SstI   | StyI     |
| StyLTI     | StySJI   | TaqI  | TaqII-1  | TaqII-2 | TfiI    | ThaI   | Tsp45I   |
| TspEI      | Tth111II | XbaI  | XcmI     | XmaIII  | XmnI    |        |          |

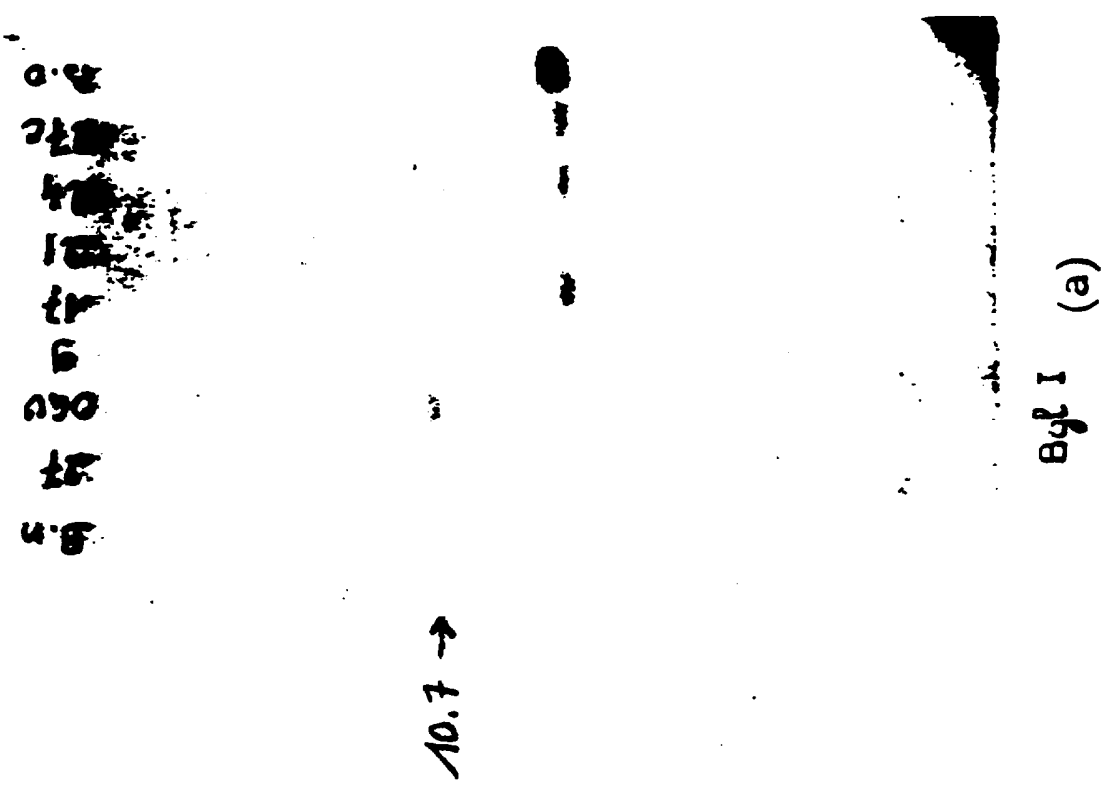
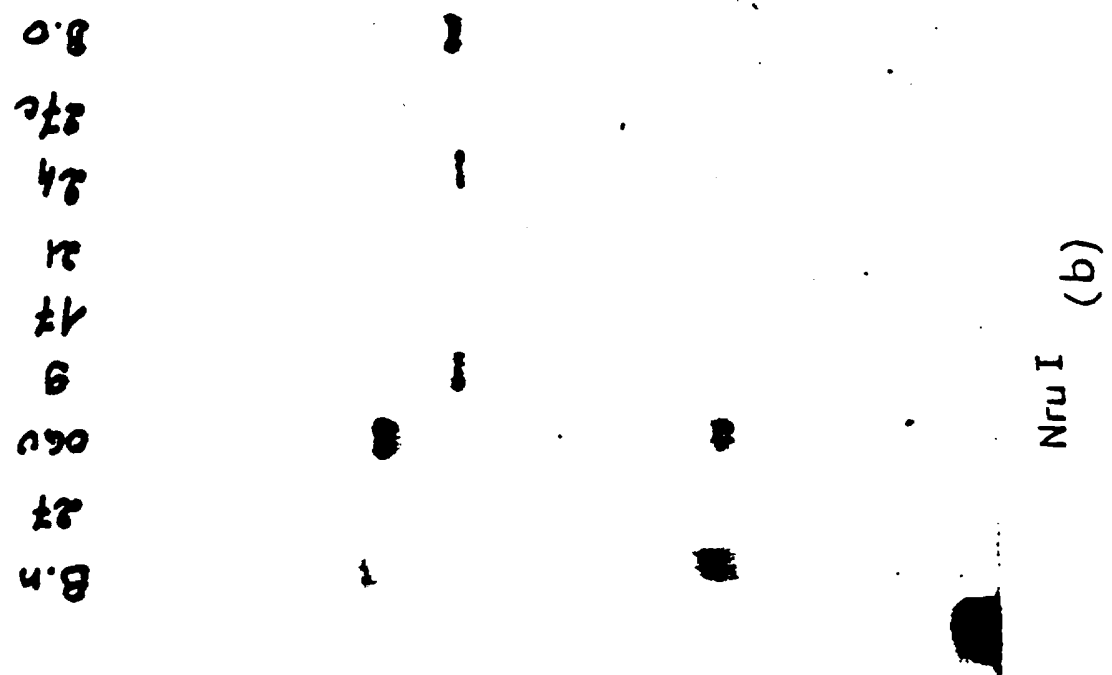
Nem hasító enzimek

- |         |         |         |          |          |          |          |        |
|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|--------|
| AatII   | AflII   | AgeI    | AnaII    | ApaI     | ApalI    | AvrII    | BanI   |
| BcgI    | BclI    | BglI    | BspGI    | BspMII   | BssHII   | BstEII   | Bsu36I |
| CfrAI   | ClaI    | DraI    | DraIII   | DrdI     | EciI     | Eco47III | EcoAI  |
| EcoDXXI | EcoEI   | EcoKI   | EcoR124I | EcoRV    | FseI     | FspI     | HgaI   |
| HgiEII  | HindIII | HinfIII | HpaI     | KpnI     | MluI     | NaeI     | NarI   |
| NotI    | NsiI    | NspI    | PflMI    | PshAI    | PvuI     | PvuII    | RleAI  |
| RsrII   | SfiI    | SgrAI   | SmaI     | SnaI     | SphI     | SspI     | StuI   |
| StySBI  | StySPI  | StySQI  | Tth111I  | Uba1105I | Uba1108I | XhoI     |        |

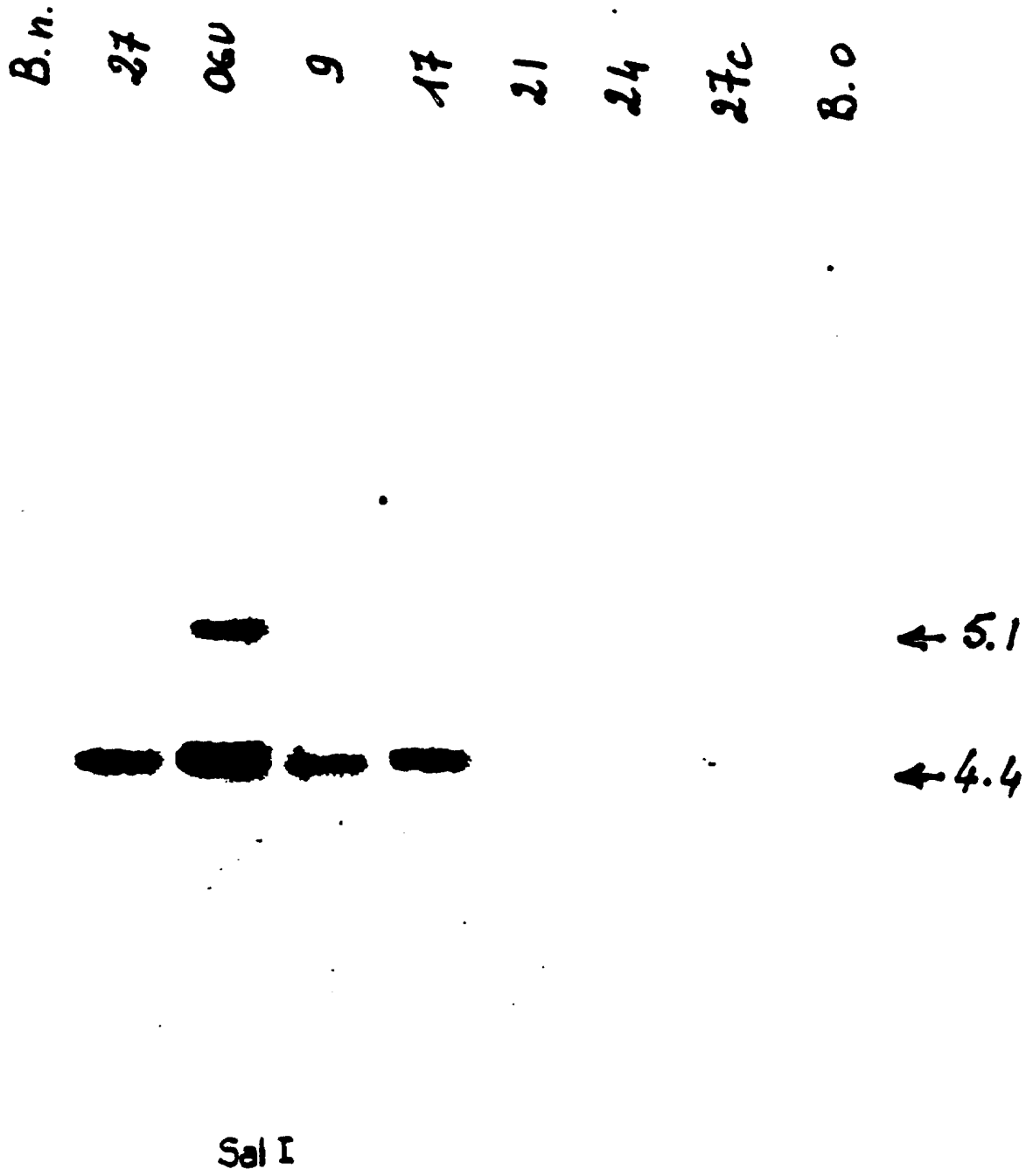
1. ábra (folyt.)



2. ábra



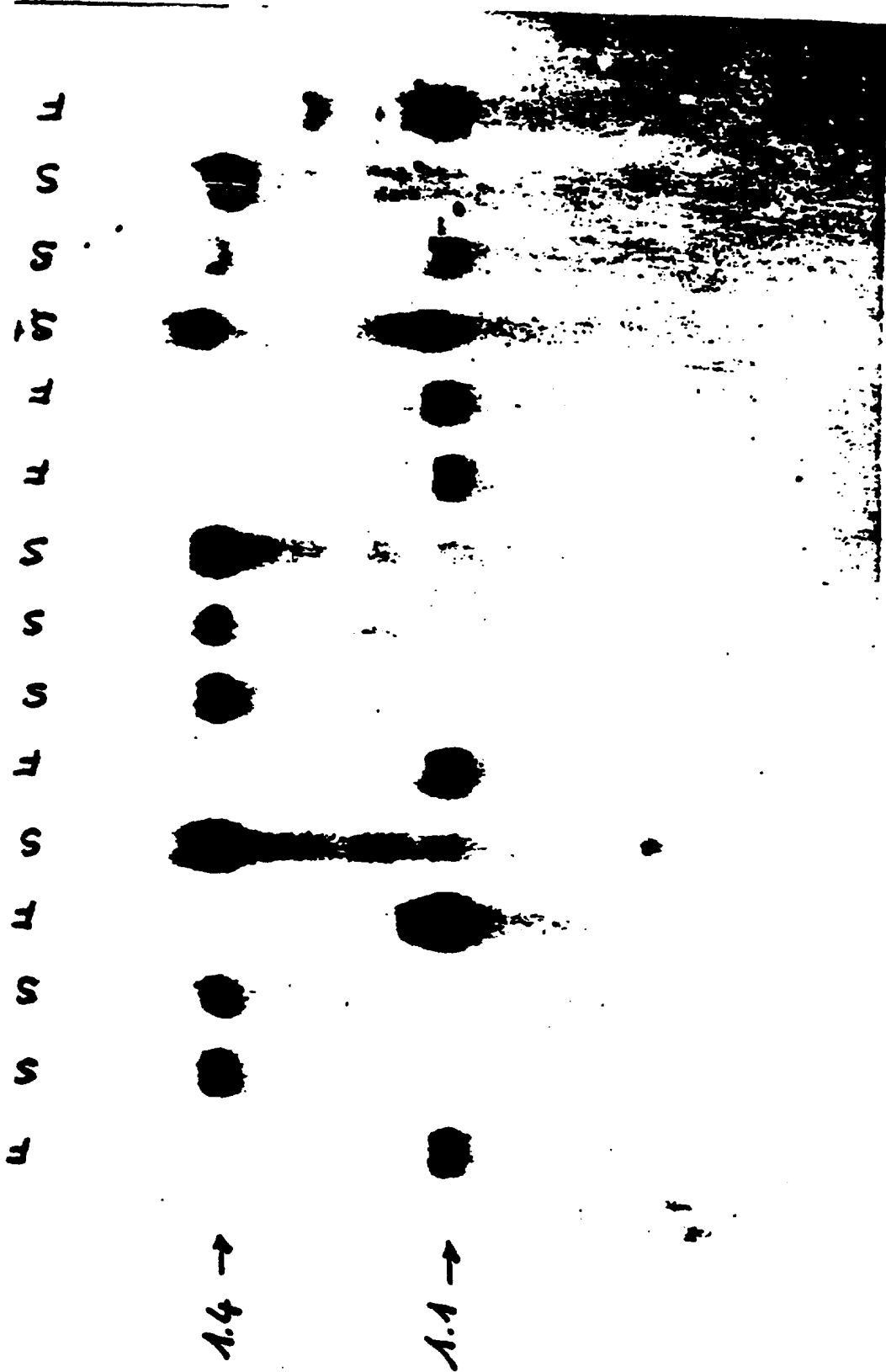
3. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra