

(11) *Número de Publicação:* PT 94964 B

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

C12N015/82 A

C12N005/10 B

C12N015/29 B

A01H001/02 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1990.08.10

(30) *Prioridade:* 1989.08.10 EP 89402270

(43) *Data de publicação do pedido:*
1991.05.22

(45) *Data e BPI da concessão:*
01/97 1997.01.22

(73) *Titular(es):*

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

(72) *Inventor(es):*

WILLY DE GREEF BE
CELESTINA MARIANI BE
JAN LEEMANS BE

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO LUIS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PLANTAS COM FLORES MODIFICADAS

(57) *Resumo:*

PLANTAS COM FLORES MODIFICADAS; GENOMA NUCLEAR;
SEQUÊNCIA DE ADN

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 94.964

REQUERENTE: PLANT GENETIC SYSTEMS, N.V., belga, com sede
em Kolonel Bourgstraat 106, 1040 Brussels,
Bélgica

EPÍGRAFE: "Plantas com flores modificadas"

INVENTORES: Celestina Mariani,
Jan Leemans,
Willy de Greef,

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

EP., 10 de Agosto de 1989, sob o Nº.: 89 402 270.6

PLANT GENETIC SYSTEMS, N. V.

"PLANTAS COM FLORES MODIFICADAS"

A presente invenção refere-se a um método para restaurar a fertilidade numa planta com esterilidade masculina ou esterilidade feminina de origem transgênica por cruzamento dessa planta estéril com uma planta susceptível de restaurar a fertilidade transgênica para proporcionar uma planta com a fertilidade restaurada transgênica possuindo uma sequência de ADN estranha proveniente do genoma nuclear da planta que restaurou a fertilidade, a qual está estavelmente integrada no genoma nuclear da planta restaurada. A sequência de ADN estranha da presente invenção contém um ADN estranho (a partir de agora designado por "ADN restaurador da fertilidade") que: 1) codifica um primeiro ARN, uma proteína ou polipéptido que, quando produzido ou hiper-produzido na célula de uma flor, particularmente de um seu órgão reprodutor masculino ou feminino, ou de uma semente ou embrião da planta restaurada, evita a actividade na célula dessa flor, semente ou embrião de um segundo ARN, proteína ou polipéptido que, quando produzido ou hiper-produzido na célula dessa flor, semente ou embrião, de outro modo perturbaria significativamente e de maneira adversa o metabolismo, o funcionamento e/ou o desenvolvimento da célula da flor, da semente ou do embrião; e 2) está na mesma unidade trans

cricional de um primeiro promotor e sob o seu controlo, o qual é susceptível de dirigir a expressão do ADN restaurador da fertilidade pelo menos nas células da mesma flor ou semente ou embrião da planta restaurada nas quais o segundo ARN, proteína ou polipéptido está a ser produzido ou hiper-produzido. O segundo ARN, proteína ou polipéptido é codificado por um "ADN de esterilidade" estranho que é oriundo do genoma nuclear da planta estéril, que também está estavelmente integrado no genoma nuclear da planta restaurada e que está sob o controlo do "promotor de esterilidade" que é susceptível de: i) dirigir a expressão do ADN da esterilidade selectivamente em células específicas de cada flor, particularmente em pelo menos um seu órgão reprodutor masculino ou feminino, ou células de cada semente ou de cada embrião da planta restaurada e ii) desse modo tornar a planta restaurada dotada de esterilidade feminina ou masculina na ausência de expressão do ADN restaurador da fertilidade nessas células específicas da flor, da semente ou do embrião.

A sequência de ADN estranha da presente invenção, uma vez transferida da planta susceptível de restaurar a fertilidade para a planta restaurada, é opcionalmente uma sequência de ADN estranha de tipo quimérico que também pode conter um segundo ADN estranho (o "primeiro ADN marcador") que: 1) codifica um terceiro ARN, proteína ou polipéptido que, quando presente em pelo menos um tecido específico ou em células específicas da planta, torna toda a planta facilmente separável ou distinguível de outras plantas que

não contêm esse terceiro ARN, proteína ou polipéptido pelo menos no tecido específico ou nas células específicas da planta:

2) encontra-se na mesma unidade transcricional de um segundo promotor e sob o seu controlo, o qual é susceptível de dirigir a expressão do primeiro ADN marcador pelo menos no tecido específico ou nas células específicas da planta; e 3) encontra-se no mesmo locus genético do genoma nuclear da planta restaurada que o ADN restaurador da fertilidade.

A presente invenção também se refere a uma sequência de ADN de tipo quimérico estranho que contem pelo menos um ADN restaurador da fertilidade sob o controlo de pelo menos um primeiro promotor e que pode também conter, adjacente ao(s) ADN(s) restaurador(es) da fertilidade e ao(s) primeiro(s) promotor(es), pelo menos um primeiro ADN marcador sob o controlo de pelo menos um segundo promotor.

A presente invenção também se refere a: um vector que contem a sequência de ADN estranho da presente invenção e que é adequada para a transformação de uma célula da planta, de modo que a sequência de ADN estranho seja estavelmente integrada no genoma nuclear dessa célula; a célula da planta susceptível de restaurar a fertilidade resultante; culturas dessas mesmas células de planta susceptíveis de restaurar a fertilidade; uma planta susceptível de restaurar a fertilidade e o seu material reprodutor (por exemplo, sementes) que pode ser regenerado a

partir de uma célula da planta susceptível de restaurar a fertilidade e cujo genôma nuclear contem, estavelmente integrado na sua estrutura, a sequência de ADN estranha; uma planta cuja fertilidade foi restaurada e o seu material reprodutor contendo, estavelmente integrada nos respectivos genômas nucleares, a sequência de ADN estranha, em conjunto com pelo menos um ADN de esterilidade sob o controlo de pelo menos um promotor de esterilidade; e uma célula da planta cuja fertilidade foi restaurada, bem como as suas culturas.

A presente invenção refere-se ainda a um processo para produzir a planta susceptível de restaurar a fertilidade e ao seu material reprodutor mediante transformação de uma célula da planta com a sequência de ADN estranho de modo a que o ADN restaurador da fertilidade esteja: 1) sob o controlo do primeiro promotor e opcionalmente no mesmo local genético que o primeiro ADN marcador sob o controlo do segundo promotor; e 2) estavelmente integrado no genôma nuclear das células da planta.

A presente invenção, refere-se também às sementes híbridas produzidas pelo cruzamento: 1) da planta restauradora da fertilidade, que de preferência contem, também estavelmente integrado no seu genôma nuclear, o primeiro ADN marcador que codifica a proteína que confere uma resistência a um herbicida na planta restauradora da fertilidade; com 2) uma planta com esterilidade nuclear masculina ou feminina que tem, estavelmente integrado no

seu genôma nuclear, a) o ADN de esterilidade sob o controle do promotor de esterilidade, adjacente ao ADN de esterilidade, e preferencialmente dentro do mesmo locus genético do genôma nuclear, b) um segundo ADN marcador, que codifica um quarto ARN, proteína ou polipéptido e preferencialmente também susceptível de conferir uma resistência ao herbicida na planta estéril, sob o controle de um terceiro promotor susceptível de dirigir a expressão do segundo marcador de ADN pelo menos num tecido específico ou em células específicas nos quais a expressão do segundo ADN marcador torna a planta facilmente separável ou distinguível daquelas plantas em que não existe essa expressão. A presente invenção refere-se particularmente às sementes híbridas produzidas em escala comercial, preferencialmente numa população substancialmente aleatória com eficiência aumentada no que se refere à polinização cruzada e sem a necessidade de trabalho manual em grande quantidade.

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

A hibridação de plantas é um processo reconhecido como importante para se produzir uma descendência que tenha uma combinação dos traços desejáveis das plantas originais. A descendência híbrida resultante tem frequentemente a capacidade de ultrapassar as plantas de que descendem em diferentes aspectos, tais como a quantidade de produção, a adaptabilidade a mudanças do ambiente e a resistência a doenças. Esta capacidade é chamada "heterose"

ou "vigor híbrido". Como resultado, a hidridação tem sido utilizada extensivamente para melhorar as colheitas principais, tais como as de milho, de beterraba ou de girassol. Por muitas razões, mas primeiramente aquelas que estão relacionadas com o facto de a maior parte das plantas serem susceptíveis de efecuaem simultaneamente auto-polinização e polinização cruzada, a polinização cruzada e controlada de plantas sem auto-polinização significativa, para produzir uma colheita de sementes híbridas, tem sido difícil de se conseguir à escala comercial.

Na natureza a grande maioria das plantas utilizadas em seara produzem órgãos reprodutores masculinos e femininos na mesma planta, usualmente muito próximos uns dos outros na mesma flor. Isto favorece a auto-polinização. Algumas plantas, todavia, são excepções como resultado da morfologia particular dos seus órgãos reprodutores que favorecem a polinização cruzada. Estas plantas produzem descendência híbrida com aumento do seu vigor e da sua adaptabilidade. Uma morfologia desse tipo é a que se encontra na Cannabis ssp. (cânhamo), que envolve tanto os órgãos reprodutores masculinos como os femininos situados em plantas separadas. Outro tipo de morfologia nos Zea mays (milho) envolve órgãos reprodutores masculinos e femininos em diferentes partes da mesma planta. Ainda outra morfologia na Elaeis guineensis (palmeiras) envolve gâmetas femininos férteis e masculinos que se tornam férteis em momentos diferentes do processo de desenvolvimento da planta.

Algumas outras espécies vegetais, como o Ananas comosus (ananás), favorecem os processos de polinização cruzada através de uma fisiologia particular dos seus órgãos de reprodução. Estas plantas desenvolveram o que se chama um "sistema de auto-incompatibilidade" graças ao qual o pólen de uma planta não pode fertilizar o gameta feminino dessa mesma planta ou de outra planta com o mesmo genótipo.

Algumas outras espécies de plantas favorecem a polinização cruzada ao exibirem naturalmente as características genômicas denominadas "de esterilidade masculina" graças a essa característica, as anteras das plantas degeneram antes de haver pólen, produzido pelas anteras, que atinja a maturidade. Ver: "Male-Sterility in Higher Plants", M.L.H. Kaul, 1987, in Monographs on Theoretical and Applied Genetics, 10, Edit. Springer Verlag. Tal característica de esterilidade masculina natural deve ter resultado, de uma vasta gama de mutações naturais, que na maior parte das vezes envolveram deficiências, e esta característica não pode ser facilmente mantida nas espécies de plantas que predominantemente recorrem à auto-polinização, dado que em condições naturais se não produzirão quaisquer sementes.

Alguns tipos de esterilidade masculina que ocorrem espontaneamente são codificados citoplasmicamente, enquanto outras são codificadas a nível nuclear. Um tipo de esterilidade masculina é o resultado de uma combinação da esterilidade masculina, codificada a nível nuclear e da esterilidade masculina codificada a nível citoplásmico.

Os alelos nucleares que induzem a esterilidade masculina são, de um modo geral recessivos e apenas as plantas que contêm o alelo citoplasmático de esterilidade masculina e que são homozigóticas para os alelos nucleares indutores da esterilidade masculina são fenotipicamente estéreis a nível masculino. Neste tipo de planta, os alelos correspondentes indutores da fertilidade masculina dominante ou "restauradores da fertilidade" produzem um fenótipo com fertilidade masculina. Como resultado, a descendência deste tipo de planta que tem esterilidade masculina pode ser dotada de fertilidade masculina por polinização das plantas com esterilidade masculina com pólen contendo os restauradores de fertilidade. Como resultado, a descendência das plantas desse tipo possui valor comercial se as suas sementes forem o produto com validade económica (por exemplo, é o caso de plantas como o milho, o sorgo e o girassol).

A maior parte dos genes indutores de esterilidade masculina conhecidos que ocorrem naturalmente e os seus correspondentes genes restauradores da fertilidade não foram utilizados no cultivo ou na produção de novas variedades essencialmente por duas razões: a) a qualidade insuficiente dos genes responsáveis pela esterilidade masculina e pelas características de restauração de fertilidade; e b) a pequena capacidade de polinização cruzada nas searas em que eles ocorrem.

1. A qualidade dos genes

Para se conseguir aproveitar todo o potencial de um sistema restaurador de esterilidade/fertilidade masculinas, é necessário que certos requisitos de qualidade sejam previamente conseguidos :

- a) A estabilidade dos genes que codificam a esterilidade masculina sob uma vasta gama de diferentes condições ambientais. A maior parte dos sistemas correntemente conhecidos, quer eles sejam nucleares quer de codificação citoplasmática, não exibem uma estabilidade suficiente. Em consequência desse facto, sob certas condições climáticas imprevisíveis, a autopolinização ocorre dentro das plantas, sendo colhida uma descendência heterogênea. De acordo com os requisitos necessários para a certificação das sementes, para a maior parte das culturas em searas não se tolera mais do que 1% de sementes não híbridas.
- b) Ausência de efeitos secundários nas plantas. Muitos genes de esterilidade masculina transmitidos citoplasmicamente induzem uma diminuição do vigor da planta. Isto pode ser tolerado até um certo nível, se o vigor híbrido proporcionar uma melhoria significativa da seara quando comparado com o efeito negativo. Outro efeito secundário que foi observado em searas que contêm genes de esterilidade masculina

consiste numa sensibilidade aumentada em relação a certos patogênicos de plantas (por exemplo, as plantas de milho que têm uma esterilidade masculina T-citoplásmica são altamente susceptíveis a infecções com Helminthosporium maydis).

Os genes restauradores da fertilidade também exibem com frequência efeitos secundários negativos embora estes não sejam geralmente uma consequência dos próprios genes, mas devidos a genes muito estreitamente ligados aos genes restauradores da fertilidade. Estes efeitos secundários consistem, na maior parte dos casos, no aumento da sensibilidade às doenças ou a pragas ou numa qualidade inferior da seara.

2. Eficiência da polinização cruzada

Uma polinização cruzada razoavelmente eficiente é essencial para que haja produção de sementes híbridas a um custo aceitável. Para grandes searas que são mal adaptadas à polinização cruzada, é pouco realista assegurar a polinização cruzada manualmente. Por isso, tem sido considerado vender-se, como um produto comercial, não o híbrido F₁, mas a sua geração descendente F₂ auto-gerada (por exemplo, algodão e trigo). A desvantagem deste método reside, todavia, na perda de homogeneidade e na heterose e na segre-

gação de combinações de genes úteis e específicas. Para assegurar uma elevada produção de uma seara a um agricultor, é vantajoso que as culturas híbridas sejam totalmente férteis (com excepção de espécies que fazem polinização cruzada muito eficiente, tais como o milho e a colza). Esta ocorrência dá-se particularmente no caso de searas que formam pólen pesado ou aderente que não seja facilmente transportado pelo vento (por exemplo, o algodão), com searas que não são atraentes para os insectos que procedem à polinização (por exemplo, o trigo) e com culturas que exibem cleistogamia (por exemplo, a soja).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, proporciona-se uma planta de fertilidade restaurada transgénica em que o genoma nuclear contém, estavelmente integrado na sua estrutura, uma sequência de ADN estranha preferencialmente uma sequência de ADN estranha de origem quimérica, caracterizada por :

- (a) Um ADN restaurador da fertilidade que codifica um primeiro ARN, proteína ou polipéptido que, quando produzido ou hiperproduzido numa célula de uma flôr, particularmente num seu órgão masculino ou feminino, de uma semente ou de um embrião dessa planta, impede a actividade dentro da célula da flôr ou da semente ou do embrião de um segundo ARN, proteína ou

polipéptido que, quando produzidos ou hiperproduzidos na célula da flôr, da semente ou do embrião, poderiam noutras circunstâncias perturbar significativamente o metabolismo, o funcionamento e/ou o desenvolvimento da célula da flôr, da semente ou do embrião; sendo o segundo ARN, proteína ou polipéptido codificados por um ADN de esterilidade que também se encontra estavelmente integrado dentro do genoma nuclear da planta e sob o controlo de um promotor de esterilidade capaz de dirigir a expressão do ADN de esterilidade selectivamente em células específicas de cada uma das flores da planta, particularmente nas células que pertençam a um órgão masculino ou feminino dessa mesma flôr e/ou a sementes e/ou a embriões dessa planta e que seja capaz, por esse modo, de tornar a planta estéril sob o ponto de vista masculino ou estéril sob o ponto de vista feminino na ausência de expressão de sequência de ADN restaurador da fertilidade nessas células específicas da flôr, da semente e/ou do embrião; e

- (b) um primeiro promotor capaz de dirigir a expressão do ADN restaurador da fertilidade em pelo menos certas células específicas da flôr, da semente e/ou do embrião da planta em que um promotor de esterilidade dirige a expressão dos genes de ADN da esterilidade; estando o ADN restaurador da fertilidade na mesma unidade transcricional que o primeiro promotor e sob o seu controlo.

A sequência de ADN estranha no genoma nuclear da planta cuja fertilidade foi restaurada pode também compreender preferencialmente no mesmo locus genético que o ADN restaurador da fertilidade :

- (c) Um primeiro marcador de ADN que codifica um terceiro ARN, proteína ou polipéptido que, quando presente pelo menos num tecido específico ou em células específicas da planta, torna a referida planta facilmente separável ou distinguível das outras plantas que não contêm um terceiro ARN, proteína ou polipéptido pelo menos nas células específicas de certos tecidos ou em certas células específicas da planta; e
- (d) um segundo promotor capaz de dirigir a expressão do primeiro marcador de ADN em pelo menos certos tecidos específicos ou em células ou específicas da planta; estando o primeiro marcador de ADN na mesma unidade transcricional que o segundo promotor e sob o seu controlo. Também de acordo com a presente invenção se proporciona uma sequência de ADN estranha de tipo quimérico que compreende o ADN restaurador de fertilidade e o primeiro promotor e que pode também compreender o primeiro ADN marcador e o segundo promotor, bem como pelo menos um ADN adicional que codifica o péptido de trânsito capaz de transportar a primeira proteína ou o primeiro polipéptido ou a terceira proteína ou o terceiro polipéptido para dentro de um cloroplasto ou

de uma mitocôndria da célula vegetal em cujo citoplasma é expressa a sequência de ADN estranha de tipo quimérico.

Suplementarmente e também de acordo com a presente invenção proporciona-se um método para se conseguir a planta de fertilidade restaurada por via transgênica através de um cruzamento feito entre: uma planta com esterilidade masculina ou esterilidade feminina transgênica, cujo genoma nuclear contém, estavelmente integrado na sua estrutura, o ADN da esterilidade sob controlo de um promotor de esterilidade e, preferencialmente, um segundo marcador de ADN sob o controlo de um terceiro promotor; com uma planta capaz de restaurar a fertilidade por via transgênica que tenha um genoma nuclear em que se encontre estavelmente integrada uma sequência de ADN estranha que compreende o ADN restaurador da fertilidade sob o controlo de um primeiro promotor e preferencialmente o primeiro marcador de ADN sob o controlo de um segundo promotor.

Adicionalmente e de acordo com a presente invenção, proporcionam-se os seguintes elementos: uma célula da planta restauradora da fertilidade por via transgênica, bem como culturas celulares dela derivadas, que são transformadas com a sequência de ADN estranha e que podem ser utilizadas para regenerar as plantas com fertilidade restaurada; uma célula da planta de fertilidade restaurada por via transgênica, bem como culturas que dela derivam; e um processo para se obterem sementes híbridas que

crecem na planta de fertilidade restaurada por via transgênica por cruzamento da planta capaz de restaurar a fertilidade por via transgênica com a planta com esterilidade masculina ou esterilidade feminina de tipo transgênico que transporta o ADN de esterilidade sob o controlo de um promotor de esterilidade.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA PRESENTE INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, uma planta capaz de restaurar a fertilidade é produzida a partir de uma única célula de uma planta pela transformação da célula vegetal de uma maneira bem conhecida, para inserir de uma maneira estável, para dentro da estrutura do genoma nuclear dessa célula, a sequência de ADN estranha a que se refere a presente invenção. A sequência de ADN estranha compreende pelo menos um ADN restaurador da fertilidade que se encontra sob o controlo (do primeiro promotor e a ele se encontra fundido pelo seu terminal 5') e que se encontra fundido no seu terminal 3' a sinais adequados de terminação (ou de regulação) de transcrição incluindo um sinal de poliadenilação. Por esse processo, o primeiro ARN, proteína ou polipéptido é produzido ou hiperproduzido em células de pelo menos todas as flores da planta restauradora da fertilidade, preferencialmente em um ou mais órgãos reprodutores masculinos ou órgãos reprodutores femininos pertencentes a essas flores e/ou a sementes e/ou a embriões, de tal modo que quando a planta restauradora da fertilidade for cruzada com uma planta dotada de esterilidade masculina ou

feminina de tipo nuclear, se obtém descendência que é dotada de fertilidade masculina e de fertilidade feminina. A sequência de ADN estranha pode também compreender pelo menos um primeiro marcador de ADN que se encontra sob o controlo de um segundo promotor (e a ele se encontra fundido pelo seu terminal 5') pelo seu terminal 3' a sinais de terminação de transcrição adequados, incluindo um sinal de poliadenilação. O primeiro ADN marcador encontra-se preferencialmente no mesmo local genético que o ADN restaurador da fertilidade, graças ao que o terceiro ARN, proteína ou polipéptido é produzido pelo menos no tecido específico ou em células específicas da planta restauradora da fertilidade, de tal modo que a planta pode ser facilmente distinguida e/ou separada de outras plantas que não contêm esse terceiro ARN, proteína ou polipéptido no tecido específico ou nas células específicas. Isto garante, com um elevado grau de certeza, a segregação simultânea do ADN restaurador da fertilidade e do primeiro marcador de ADN na descendência dessa planta.

A célula de uma planta (particularmente de uma planta capaz de ser infectada com agrobacterium) é preferencialmente transformada, de acordo com a presente invenção, utilizando um vector que é um plasmídeo Ti desarmado que contém a sequência de ADN estranho e é veiculado por agrobacterium. Esta transformação pode ser efectuada utilizando processos do tipo descrito, por exemplo, nas patentes de invenção europeias publicadas sob os N^{os} 0 116 718 e 0 270 822. Os vectores plasmídicos Ti preferidos contêm a

sequência de ADN estranha entre as sequências limítrofes, ou pelo menos contém-na localizada à esquerda da sequência do limite direito, do ADN-T do plasmídeo Ti. Como é evidente, podem utilizar-se outros tipos de vectores para transformar a célula vegetal, recorrendo a processos tais como uma transferência directa de gene (tal como se descreveu, por exemplo, na patente de invenção europeia publicada com o Nº 0 223 247), uma transformação mediada por pólen (tal como se descreveu, por exemplo, na patente de invenção europeia publicada sob o Nº 0 270 356, na publicação PCT W085/01856, e na patente de invenção europeia publicada sob o Nº 0 275 069), uma transformação protoplástica in vitro (tal como se descreveu por exemplo, na patente de invenção norte-americana Nº 4 684 611), uma transformação do ARN da planta mediada por vírus (tal como se descreveu, por exemplo, na patente de invenção europeia publicada sob o Nº 0 067 553 e na patente de invenção norte-americana Nº 4 407 956) e uma transformação mediada por lipossomas (tal como se descreveu, por exemplo, na patente de invenção norte-americana Nº 4 536 475).

Preferencialmente, uma planta capaz de restaurar a fertilidade a que se refere a presente invenção é produzida pela transformação de uma célula vegetal com um vector de um plasmídeo Ti desarmado que contém a sequência de ADN estranha contendo o ADN restaurador da fertilidade sob o controlo de um primeiro promotor e opcionalmente um primeiro marcador de ADN sob o controlo de um segundo promotor. O ADN marcador pode encontrar-se a montante ou

a jusante do ADN restaurador da fertilidade no vector plasmídeo Ti, mas preferencialmente os dois são adjacentes, um em relação ao outro, e encontram-se localizados entre as sequências limítrofes ou pelo menos localizados à esquerda da sequência que constitui o limite da direita do vector do plasmídeo Ti, de tal modo que são adequados e simultaneamente transferidas para dentro da estrutura do genoma nuclear vegetal. Todavia, se se desejar, a célula pode inicialmente ser transformada com a sequência de ADN estranha que contém o ADN restaurador da fertilidade e o primeiro promotor e subsequentemente pode ser transformada com ADN marcador e o segundo promotor, inseridos no mesmo locus genético, dentro do genoma nuclear da célula, que o ADN restaurador da fertilidade, ou esta transformação pode ser efectuada de modo recíproco. Os vectores adequados para este propósito são os mesmos que já foram anteriormente discutidos para a transformação das células com a sequência de ADN estranha. O vector preferido é um vector plasmídeo Ti desarmado.

A selecção do ADN restaurador da fertilidade da presente invenção não é crítica mas depende e deve corresponder à selecção do ADN da esterilidade responsável pela restauração das características de esterilidade masculina ou feminina. Em particular, a produção ou hiperprodução do primeiro ARN, proteína ou polipéptido codificado pelo ADN restaurador da fertilidade, tem de neutralizar, bloquear, afastar, ultrapassar ou de qualquer outro modo impedir a actividade específica do segundo ARN, proteína ou

polipéptido codificado pelo ADN de esterilidade nas células da flôr, preferencialmente nas células de pelo menos um órgão reprodutor masculino ou feminino, ou nas células da semente ou nas células do embrião da planta cuja fertilidade se restaurou. Exemplos de ADNs que envolvem esterilidade masculina e feminina aos quais devem corresponder os ADNs restauradores da fertilidade de acordo com a presente invenção e cuja acção devem contrariar, encontram-se descritos nos pedidos de patente de invenção europeia, N^os 89401194.9 e 90402196.1, respectivamente, que são aqui incorporadas como referência. O ADN restaurador da fertilidade adequado pode ser seleccionado e isolado de uma maneira bem conhecida, de modo a ultrapassar os efeitos do ADN responsável pela esterilidade em qualquer célula de uma flôr, particularmente se se tratar de um órgão masculino ou feminino, uma semente e/ou um embrião, em que o promotor da esterilidade provoca a expressão do ADN da esterilidade.

Os exemplos preferenciais de ADNs restauradores da fertilidade codificam: o barstar que neutraliza a actividade da barnase (que degrada as moléculas de ARN mediante hidrólise da ligação situada depois de qualquer resíduo de guanina); a EcoRI metilase que impede a actividade da endonuclease EcoRI; ou inibidores de proteases que neutralizam a actividade das proteases, tais como a papaína (por exemplo, o zimogénio da papaína e a proteína activa da papaína).

Outro exemplo de um ADN restaurador da fertilidade é um ADN anti-sentido (tal como foi descrito, por exemplo, no pedido de patente de invenção europeia Nº 0 223 399) que codifica um cordão de ADN complementar de um cordão de ADN que codifica o ADN de esterilidade transcrito ao nível da flôr de uma planta de outro modo estéril, das suas células de sementes ou de embriões, sob o controlo de um promotor de esterilidade. Tal ADN anti-sentido pode ser transcrito para uma sequência de ARN capaz de se ligar às porções codificantes e/ou não codificantes de um "ARN de esterilidade", produzido nas sementes das flores e/ou nos respectivos embriões como resultados da expressão do ADN de esterilidade, de modo a neutralizar a tradução do ARN de esterilidade assim produzido. Exemplos de tais sequências de ADN anti-sentido são os ADNs anti-sentido dos ADNs de esterilidade que codificam as seguintes segundas proteínas: barnase; EcoRI; enzimas que catalizam a síntese de fito-hormonas, tais como a isopentil-transferase que é uma enzima que catalisa a primeira fase da biossíntese da citoquinina e é codificada pelo gene 4 do ADN-T da Agrobacterium; enzimas implicadas na síntese da auxina e codificadas pelo gene 1 e pelo gene 2 do ADN-T do Agrobacterium ou alternativamente uma enzima codificada por um gene 1 isolado ou um gene 2 isolado; glucanases; lipases, tais como a fosfolipase A2 [Verheij et al., (1981) 91 Rev. Biochem. Pharmacol., 92-203]; peroxidases dos lípidos; inibidores da membrana celular vegetal; e proteínas tóxicas para células vegetais, tais como uma toxina bacteriana (por exemplo, o fragmento A da toxina da difteria ou

botulina); bem como os ADNs anti-sentido dos ADNs de esterilidade que codificam os genes de auto-incompatibilidade natural.

Outros exemplos de ADNs capazes de restaurar a fertilidade codificam enzimas específicas do ARN (isto é, por exemplo, as designadas "ribozimas"), susceptíveis de uma clivagem altamente específica contra determinada sequência alvo, conforme descrito por Haseloff e Gerlach, Nature, 334 (1988) 585-591. Tal ribozima é, por exemplo, a ribozima dirigida contra um dos ADNs de esterilidade citados anteriormente.

Outros exemplos suplementares de ADNs restauradores da fertilidade podem ser combinações de um ou mais dos diferentes ADNs restauradores da fertilidade a que se fez referência anteriormente.

Por "estranha" em relação à sequência de ADN estranha da presente invenção pretende-se significar que a sequência de ADN estranha contém um ADN restaurador da fertilidade estranho e/ou um primeiro promotor estranho. Por "estranho" em relação ao ADN, tal como, por exemplo, o ADN restaurador da fertilidade e um primeiro promotor, bem como um primeiro ADN marcador, um segundo promotor e qualquer outro ADN que se encontre na sequência de ADN estranha, pretende-se significar que tal ADN não se encontra no mesmo ambiente genômico, numa célula vegetal transformada por esse ADN de acordo com a presente invenção, em que se encontraria

se o referido ADN se encontrasse naturalmente na célula vegetal, na bactéria, no animal, no fungo, no vírus ou similares a partir do qual tal sequência de ADN é originada.

Isto quer dizer, por exemplo, que um ADN restaurador da fertilidade estranho ou um primeiro marcador de ADN pode ser:

- 1) um ADN nuclear na planta de origem; 2) um ADN endógeno em relação à célula vegetal transformada (isto é, pertencente então a uma planta de origem com o mesmo genótipo que a planta que está a ser ou que foi transformada); e 3) dentro da mesma unidade transcricional que o seu próprio promotor endógeno e os seus próprios sinais da regulação da transcrição que se encontram na sua extremidade 3' (oriundos da planta de origem) na sequência de ADN estranha a que se refere a presente invenção e que se encontra integrada na célula vegetal transformada; mas 4) inserida num lugar diferente dentro do genoma nuclear da célula vegetal transformada quando comparada com a localização que tinha na sua planta de origem de tal maneira que ela se não encontra circundada na célula vegetal transformada pelos genes que a circundavam naturalmente na planta de origem. O restaurador da fertilidade estranho ou o primeiro ADN marcador estranho pode também, por exemplo, ser:
- 1) um ADN nuclear na planta de origem; e 2) um ADN endógeno em relação à célula vegetal transformada; mas 3) que se encontra na mesma unidade transcricional que um promotor endógeno diferente (isto é, que não é dele próprio) e/ou os sinais de regulação da transcrição da extremidade 3' numa sequência de ADN de tipo

quimérico que seja estranha e a que se refere a presente invenção numa célula vegetal transformada. Um restaurador da fertilidade estranho ou o primeiro ADN marcador estranho podem também, por exemplo, ser: 1) um ADN nuclear numa planta de origem; e 2) uma estrutura endógena em relação à célula vegetal transformada; mas 3) que se encontra na mesma unidade transcricional que um promotor heterólogo e/ou os sinais de regulação da transcrição da extremidade 3' numa sequência de ADN estranha de tipo quimérico, de acordo com a presente invenção, numa célula vegetal transformada. O restaurador da fertilidade estranho ou um primeiro ADN marcador pode também, por exemplo, ser heterólogo em relação à célula vegetal transformada e encontrar-se na mesma unidade transcricional que o promotor endógeno e/ou os sinais de regulação da transcrição ligados à extremidade 3' (por exemplo, do genoma nuclear de uma planta com o mesmo genótipo que a planta que está a ser transformada) numa sequência de ADN estranha de tipo quimérico numa célula vegetal transformada de acordo com a presente invenção. Um exemplo de um ADN estranho restaurador da fertilidade poderia vir do genoma nuclear de uma planta com o mesmo genótipo que a planta a ser transformada e codificar a estrutura do inibidor de uma enzima catalítica, tal como um inibidor de protease ou de ribonuclease que seja endógeno em relação à planta que está a ser transformada, de tal modo que a enzima é super-produzida nas células transformadas de modo a neutralizar a actividade de uma protease ou ribonuclease (isto é, uma segunda proteína codificada pelo ADN da esterilidade masculina

ou feminina) que perturbaria significativamente de maneira adversa o metabolismo, o funcionamento e/ou o desenvolvimento das células da flôr, particularmente as células dos órgãos masculinos ou femininos, ou as células das sementes ou as células dos embriões, em que tal enzima é expressa. Preferencialmente, cada ADN restaurador da fertilidade e o primeiro ADN marcador são heterólogos em relação à célula vegetal que está em processo de transformação.

Por "heterólogo", em relação ao ADN, tal como um ADN restaurador da fertilidade, um primeiro ou um terceiro promotor, um primeiro ADN marcador e qualquer outro ADN que se encontre na sequência de ADN estranha a que se refere a presente invenção, significa-se que tal ADN não se encontra naturalmente no genoma nuclear das células de uma planta com o mesmo genótipo que a planta que está a ser transformada. São exemplos de ADNs heterólogos os ADNs dos cloroplastos e das mitocôndrias obtidos a partir de uma planta com o mesmo genótipo da planta que está a ser transformada, mas os exemplos preferidos são os ADNs de cloroplastos, de mitocôndrias e nucleares, derivados de plantas que têm um genótipo diferente daquele que é exibido pela planta em transformação, os ADNs provenientes de genomas animais e bacterianos e os ADNs de cromossomas e de plasmídeos provenientes de genomas de vírus e de fungos.

Por "quimérico" em relação à sequência de ADN estranha, a que se refere a presente invenção, significa-se que pelo menos um dos ADNs restauradores da fertilidade nela contidos: 1) não se encontra naturalmente sob o controlo do seu primeiro promotor no que respeita a um dos ADNs restauradores da fertilidade; e/ou 2) não se encontra naturalmente no mesmo locus genético em que se encontra pelo menos um dos seus primeiros ADNs marcadores. São exemplos de sequências de ADN quiméricas e estranhas a que se refere a presente invenção: um ADN restaurador da fertilidade de origem bacteriana sob o controlo de um primeiro promotor de origem vegetal; e um ADN restaurador da fertilidade de origem vegetal sob o controlo de um primeiro promotor de origem vegetal e que se encontra integrado no mesmo locus genético que o primeiro ADN marcador de origem bacteriana.

Por "flor" significa-se que se inclui a totalidade do eixo do rebento, as sépalas, as pétalas, os órgãos reprodutores masculinos (ou estames) e/ou os órgãos reprodutores femininos, (ou carpelos), cujo desenvolvimento total ou parcialmente) retardado ou interrompido daria origem a que se evitasse o desenvolvimento e/ou a propagação de sementes viáveis na flor ou o desenvolvimento e/ou a propagação dos seus gametas masculinos; por "órgão masculino" ou "órgão reprodutor masculino" entende-se a totalidade do órgão de uma flor que esteja envolvido na produção do gameta masculino, bem como uma ou mais das suas partes elementares, tais como a sua antera, pólen e filamento; e por "órgão feminino" ou

"órgão reprodutor feminino" entende-se a totalidade do órgão de uma flor que esteja envolvido na produção do gameta feminino e/ou das sementes viáveis e/ou dos embriões viáveis, bem como uma ou mais das suas partes elementares, tais como o seu ovário, óvulos, estilete, estigma, corola, disco, septo, cálice e placenta. Por "embrião" entende-se a totalidade do embrião de uma planta, bem como uma ou mais das suas partes individuais, tais como o eixo embrionário ou os cotilédones do embrião.

Para que o ADN restaurador da fertilidade seja expresso em pelo menos aquelas células específicas de uma planta cuja fertilidade é restaurada em que se exprime o ADN de esterilidade, é preferível que o primeiro promotor, que controla a expressão do ADN restaurador da fertilidade, seja um promotor capaz de dirigir a expressão génica em pelo menos algumas células vegetais da planta cuja fertilidade foi restaurada (isto é, as células específicas das flores, preferencialmente as células dos órgãos masculinos ou femininos, ou as células das sementes ou as células do embrião), em que o ADN de esterilidade é selectivamente expresso sob o controlo do promotor de esterilidade. Esse primeiro promotor pode ser um promotor endógeno ou um promotor exógeno e pode ser oriundo do genoma nuclear ou do genoma das mitocôndrias ou do cloroplasto de uma célula vegetal. De qualquer modo, o primeiro promotor é estranho ao genoma nuclear da célula vegetal que está a ser transformada. O primeiro promotor pode ser promotor de constituição mas pode também ser o mesmo promotor selectivo que

o promotor de esterilidade. Preferencialmente, o primeiro promotor induz a recuperação da fertilidade, através da produção de pelo menos quantidades suficientes de um primeiro ARN, proteína ou polipéptido restauradores da fertilidade, selectivamente nas mesmas células específicas das flores, das sementes ou dos embriões, em particular nas mesmas células específicas das flores, como aquelas em que o ADN de esterilidade foi expresso. O primeiro promotor da presente invenção pode ser seleccionado e isolado de modo já conhecido a partir de uma espécie vegetal, por exemplo, conforme descrito em: pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9 que aqui se incorpora como referência e que descreve um promotor da esterilidade masculina que dirige selectivamente a expressão de um ADN da esterilidade nas células dos estames (por exemplo da antera) de uma planta e é eficaz para impedir a expressão do ADN de esterilidade noutras partes da planta; e no pedido de patente de invenção europeia Nº 90402196.1, também aqui incorporado como referência, e que descreve um promotor da esterilidade feminina que dirige selectivamente a expressão de um ADN de esterilidade em células de flores, particularmente em células do órgão feminino (isto é, o pistilo) ou em células das sementes ou em células do embrião de uma planta e que se revela eficaz para evitar a expressão do ADN de esterilidade em outras partes da planta. Por exemplo, um primeiro promotor específico de um órgão endógeno adequado ou de um tecido específico pode ser identificado e isolado numa planta, por :

1. Pesquisa de um ARNm que apenas se encontre presente na planta durante o desenvolvimento das suas flores, sementes ou embriões, preferencialmente nas suas anteras, pólen, filamentos, ovário, óvulo, estilete, estigma, placenta, cálice, escutelo, septo, membrana da semente, endosperma ou nos seus cotilédones embrionários;
2. Isolamento deste ARNm específico;
3. Preparação de um ADNc a partir deste ARNm específico;
4. Utilização deste ADNc como uma sonda para identificar as regiões do genoma da planta que contêm o ARN que codifica o ARNm específico; e depois
5. Identificação da porção do genoma da planta que se encontra a montante (isto é, a extremidade 5') da estrutura de ADN que codifica a estrutura específica deste ARNm e que contém o promotor do referido ADN.

Os genes controlados por estes primeiros promotores podem ainda ser utilizados como sondas tal como no passo 4, descrito antes. Sob condições de hibridação, esta sonda fará com que haja hibridação do ADN que codifica um ARNm específico numa mistura de sequências de ADN do genoma de uma outra espécie vegetal (Maniatis et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Ed.

Cold Spring Harbor Laboratory., 1982). A partir de então, em conformidade com o passo 5 descrito anteriormente, pode ser identificado um primeiro promotor específico de uma outra espécie vegetal.

São exemplos de primeiros promotores específicos de órgãos masculinos e promotores de esterilidade os seguintes: o promotor PTA 29, o promotor PTA 26 e o promotor PTA 13, tais como se descreveram no pedido de patente de invenção europeia Nº 89401104.9, que foram isolados a partir da planta do tabaco e que são promotores específicos do tapetum; bem como qualquer outro promotor de um gene que codifique um ARNm específico do tapetum e que possa ser hibridado com os genes TA29, TA26 e TA13 de acordo com o pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9, a partir dos quais os promotores PTA29, PTA26 e PTA13 foram isolados. São exemplos de primeiros promotores específicos de órgãos femininos e de promotores de esterilidade os seguintes: promotores específicos do estilete e/ou do estigma, tais como o PSTMG07, PSTMG08, PSTMG4B12 e PSTMG3C9, e o promotor específico do óvulo que corresponde ao clone de ADNc pMON9608 tal como foi descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 90402196.1; ou então um promotor de um gene que codifique i) a estrutura de um ARNm específico de um estilete-estigma ou ii) específico de um óvulo que possa ser hibridado, respectivamente, com i) um gene do tipo STMG que seja específico do estilete-estigma ou ii) um clone de ADNc pMON9608 de acordo com o pedido de patente de invenção europeia Nº 90402196.1.

Se mais do que um ADN de esterilidade nuclear se encontra presente na planta estéril transgênica que se pode cruzar com a planta capaz de restaurar a fertilidade por via transgênica, de acordo com a presente invenção, a planta capaz de restaurar a fertilidade pode necessitar de ter inserido no seu genoma nuclear mais do que um ADN restaurador da fertilidade, de acordo com a presente invenção, correspondendo em número pelo menos ao número dos ADNs de esterilidade presentes no genoma nuclear da planta estéril. Todos os ADNs capazes de restaurar a fertilidade podem encontrar-se sob o controlo de um único primeiro promotor, mas preferencialmente, cada ADN restaurador da fertilidade encontrar-se-á sob o controlo do seu próprio primeiro promotor separado que dirigirá a expressão do primeiro ARN, da primeira proteína, ou do primeiro polipéptido, pelo menos naquelas células em que os promotores de esterilidade fazem com que os ADNs de esterilidade expressem o segundo ARN, a segunda proteína ou o segundo polipéptido. Cada ADN restaurador da fertilidade é adjacente ao seu primeiro promotor e todos os ADNs restauradores da fertilidade e os seus primeiros promotores são adjacentes, uns em relação aos outros, nas sequências de ADN estranhas da presente invenção e em quaisquer vectores utilizados para transformar as células vegetais com essas sequências de ADN estranhas. Todavia, não é necessário que os ADNs restauradores da fertilidade sejam adjacentes uns aos outros na sequência de ADN estranha e, em alguns casos, podem ser inseridos no genoma nuclear da planta que restaura a fertilidade através de eventos de transformação independentes.

A selecção do primeiro marcador de ADN da presente invenção também não é uma fase crítica. Um primeiro marcador de ADN adequado pode ser seleccionado e isolado de maneira bem conhecida, de tal modo que codifique o terceiro ARN, a terceira proteína ou o terceiro polipéptido que faz com que as plantas que exprimem esse primeiro marcador de ARN sejam facilmente distinguidas e separadas de plantas que não exprimem o primeiro marcador de ADN. Em muitos casos, o primeiro marcador de ADN codifica o mesmo ARN, a mesma proteína ou o mesmo polipéptido que um segundo marcador de ADN codifica nas plantas com esterilidade feminina ou esterilidade masculina de origem nuclear, cuja fertilidade tem de ser restaurada de acordo com a presente invenção. São exemplos dos primeiros ADNs marcadores os ADNs marcadores que se encontram nos genomas nucleares das plantas com esterilidade feminina ou esterilidade masculina de tipo nuclear descritas nos pedidos de patente de invenção europeias Nºs 89401194.9 e 90402196.1, os quais codificam proteínas ou polipéptidos que: induzem uma característica nas células vegetais tais como o gene Al que codifica di-hidroquercetina-4-redutase [Mayer et al., Nature, 330 (1987) 677-678] e o gene da glucuronidase [Jefferson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA ("PNAS"), 83 (1988) 8447]; que induzem características morfológicas específicas nas plantas, tais como um crescimento de tipo anão ou uma forma diferente das folhas; que conferem à planta uma resistência à tensão somática, tal como se sabe ser induzida pelo gene que codifica a superóxido-dismutase, de acordo com o pedido de patente de invenção Nº

88402222.9; que conferem a uma planta uma resistência a doenças ou parasitas, tal como se sabe suceder com o gene que codifica a endotoxina do Bacillus thuringiensis que confere uma resistência a insectos de acordo com o que se descreveu no pedido de patente de invenção europeia Nº 86300291.1; ou que conferem a uma planta uma resistência a bactérias semelhantes à que se consegue com o péptido bacteriano descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 88401673.4.

Os primeiros ADNs marcadores preferidos codificam terceiras proteínas ou terceiros polipéptidos que inibem ou neutralizam a actividade de herbicidas, tais como: o gene sfr e o gene sfrv que codificam enzimas que conferem resistência aos inibidores da glutamina-sintetase do tipo do Bialaphos e da fosfinotricina conforme descrito no pedido de patente de invenção europeia Nº 87400544.0; e genes que codificam enzimas modificadas que servem de alvo a determinados herbicidas e que têm uma menor afinidade para esses herbicidas do que as enzimas endógenas produzidas naturalmente, tal como sucede com a glutamina-sintetase modificada que serve de alvo à fosfinotricina de acordo com o que se descreve na publicação da patente de invenção europeia Nº 0.240.792 e uma 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintetase modificada que serve de alvo ao glifosato de acordo com o que se descreve na publicação de patente de invenção europeia Nº 0 218 571. Outros primeiros ADNs marcadores codificam terceiras proteínas que neutralizam a acção do herbicida bromoxinilo

(Stalker et al., in Genetic Improvements of Agriculturally important Crops, Ed R.T. Fraley, N.M. Frey e J. Schell, Cold Spring Harbor Laboratories, 1988 ou do herbicida sulfonureia [Lee et al. EMBO J., 7, (1988) 1241-1248] ou do herbicida 2,4 D (descrito no 2nd International Symposium of Plant Molecular Biology, Jerusalém, 13-18 de Novembro de 1988)).

O segundo promotor da presente invenção, que controla o primeiro ADN marcador, pode também ser seleccionado e isolado de maneira bem conhecida, de tal forma que o primeiro ADN marcador seja expresso quer selectivamente em um ou mais tecidos específicos ou células específicas quer constitucionalmente na totalidade da planta, de acordo com o que for desejado, dependendo isso da natureza do terceiro ARN, da terceira proteína ou do terceiro polipéptido. Em muitos casos, o segundo promotor é o mesmo que o terceiro promotor que controla o segundo ADN marcador na planta com esterilidade masculina ou esterilidade feminina, cuja fertilidade tem de ser restaurada de acordo com a presente invenção. Por exemplo, se o primeiro ADN marcador codifica uma resistência a um herbicida, pode ser útil ter o primeiro ADN marcador expresso em todas as células da planta, utilizando um segundo promotor constitucional forte, tal como, por exemplo, um promotor 35S [Odell et. al., Nature, 113 (1985) 810-812], um promotor 35S'3 [Hull et howell Virology, 86 (1987) 482-493], um promotor do gene da nopalina sintetase ("PNOS") do plasmídeo Ti [Herrera-estrela, Nature, 303 (1983) 209-213] ou o promotor do gene da

octopina sintetase ("POCS" [De Greve et al. J. Mol. Appl. Genet., 1 (6) (1988), 499-511]). Se o primeiro ADN marcador codificar uma proteína que confere resistência a sua doença, pode ser útil ter o primeiro ADN marcador selectivamente expresso num tecido de lesão, utilizando por exemplo, um segundo promotor que seja um promotor TR, tal como o promotor TR1' ou TR2' de um plasmídeo Ti [Velten et al., EMBO J., 3 (1984) 2723-2730]. Se o primeiro ADN marcador codificar a resistência a um herbicida, pode ser útil ter o primeiro ADN marcador selectivamente expresso em tecido verde pela utilização como segundo promotor, por exemplo, do promotor do gene que codifica a pequena sub-unidade de Rubisco (pedido de patente de invenção europeia Nº 87400544.0.). Se o primeiro ADN marcador codifica um pigmento, pode ser útil seleccionar o segundo promotor de modo a que o primeiro ADN marcador seja expresso em células específicas, tais como as células das pétalas, as células das folhas ou as células das sementes, preferencialmente na camada mais exterior da cutícula das sementes.

Um segundo promotor específico de um tecido pode ser identificado e isolado de maneira bem conhecida, adequada para a sua inclusão na sequência de ADN estranha, de acordo com a presente invenção, numa planta capaz de restaurar a fertilidade ou numa planta cuja fertilidade foi restaurada de acordo com o que nesta invenção se descreve, daí resultando que a planta em causa pode ser facilmente distinguida por transportar o primeiro

ADN marcador, sob o controle do segundo promotor. isto pode ser feito da seguinte maneira :

1. pela pesquisa do ARNm que se encontra presente apenas na planta durante o desenvolvimento de um tecido específico, tal como o das suas pétalas, folhas ou sementes;
2. isolamento deste ARNm específico de um tecido;
3. preparação de um ADNc a partir deste ARNm específico de um tecido;
4. utilização deste ADNc como uma sonda genética para identificar as regiões do genoma dessa planta que contém o ADN que codifica o ARNm específico desse tecido; e, então :
5. identificação da porção do genoma da planta que se encontra a montante do ADN que codifica esse ARNm específico do tecido e que contém o promotor para o referido ADN.

Se mais do que um primeiro ADN marcador se encontrar presente na sequência de ADN estranha, de acordo com a presente invenção, todos os primeiros ADNs marcadores podem estar sob controle de um único segundo promotor mas, preferencialmente, cada primeiro ADN marcador encontrar-se-á sob controle do seu próprio segundo promotor isolado. Ainda mais preferencialmente,

cada primeiro ADN marcador encontrar-se-á sob o controlo do seu próprio segundo promotor e codificará um terceiro ARN diferente, uma terceira proteína diferente, ou um terceiro polipéptido diferente, que induzirá diferentes características fáceis de distinguir na planta transformada. De qualquer modo, o(s) primeiro(s) ADNs marcador(es) ou o(s) segundo(s) promotor(es) deverão encontrar-se adjacentes, uns em relação aos outros e em relação ao(s) ADN(s) restaurador(es) da fertilidade contidos na sequência estranha de ADN da presente invenção e em qualquer vector utilizado para transformar as células da planta com a sequência de ADN estranha.

Dá-se em geral preferência a que o primeiro ARN, proteína ou polipéptido, codificados pelo ADN restaurador da fertilidade, impeçam substancialmente a actividade do segundo ARN, proteína ou polipéptido, cuja estrutura é codificada pelo ADN de esterilidade, no citoplasma ou no núcleo das células vegetais em que o ADN de esterilidade é expresso. Todavia, quando se pretende que a primeira proteína ou o primeiro polipéptido e/ou a terceira proteína ou o terceiro polipéptido seja(m) transportado(s) do citoplasma para dentro dos cloroplastos ou das mitocôndrias das células das plantas transformadas, a sequência de ADN estranha pode, além disso, incluir um outro ADN estranho adicional que codificará um péptido de trânsito. O ADN adicional encontrar-se-á situado entre o ADN restaurador da fertilidade e o primeiro promotor se a primeira proteína ou o primeiro polipéptido tiverem de ser

transportados desse modo e encontrar-se-á entre o primeiro ADN marcador e o segundo promotor se a terceira proteína ou o terceiro polipéptido tiverem de ser desse modo transportados. Por "péptido de trânsito" entende-se um fragmento polipeptídico que se encontra normalmente associado a um cloroplasto ou a uma proteína da mitocôndria ou a uma sub-unidade da proteína e é produzido numa célula como um precursor da proteína codificada pelo ADN nuclear da célula. O péptido de trânsito é responsável pelo processo de translocação da proteína ou da sub-unidade da proteína da mitocôndria ou do cloroplasto de codificação nuclear para dentro dessas mesmas estruturas e durante esse mesmo processo o péptido de trânsito é separado ou proteoliticamente removido da proteína do cloroplasto ou da mitocôndria ou da correspondente sub-unidade. Um ou mais desses ADNs adicionais podem ser fornecidos na sequência estranha de ADN a que se refere a presente invenção para transportar um ou mais das primeiras ou terceiras proteínas ou polipéptidos conforme é geralmente descrito nos pedidos de patentes de invenção europeia N^{os} 85402596.2 e 88402222.9 e em: Van den Broeck et al., Nature, 313 (1985) 358-363; Schatz Eur. J. of Bioch., 165, (1987) 1-6; e Boutry et al., Nature, 328, (1987) 340-342. Um exemplo de um péptido de trânsito adequado para o transporte para dentro dos cloroplastos é o péptido de trânsito da pequena sub-unidade da enzima RUBP carboxilase (pedido de patente de invenção europeia N^o 85402596.2) e um exemplo de um péptido de trânsito para transporte para dentro da mitocôndria é o péptido de trânsito da enzima Mn-super-

óxido dismutase (pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9; ver também o Exemplo 3 contido na presente invenção).

Na sequência de ADN estranha a que se refere a presente invenção, sinais de terminação da transcrição na extremidade 3' podem ser seleccionados entre aqueles que são capazes de proporcionar uma terminação de transcrição correcta e a poliadenilação do ARNm nas células vegetais. Os sinais de terminação da transcrição podem ser os naturais que pertencem ao gene estranho ou ao ADN que vai ser transcrito ou podem pertencer a estruturas estranhas ou heterólogas. Exemplos de sinais heterólogos de terminação da transcrição são aqueles que pertencem, por exemplo, aos genes da octopina sintetase [Gielen et al., EMBO J., 3, (1984) 835-845] e o gene 7 de ADN-T [Velten Schell, Nucleic Acids Research ("NAR"), 13, (1985) 6981-6998].

Também de acordo com a presente invenção, uma cultura de células vegetais, contendo a sequência de ADN estranha da presente invenção, pode ser utilizada para regenerar plantas capazes de restaurar a fertilidade que sejam homozigóticas e dominantes, efectuando a transformação necessária: utilizando uma cultura de células haplóides [Chuong e Beversdorf, Plant Sci., 39, (1985) 219-226] e procedendo então à duplicação do número de cromossomas por técnicas bem conhecidas (por exemplo, mediante a utilização da colchicina); ou alternativamente, utilizando uma cultura de células diplóides e procedendo à cultura de anteras

de plantas regeneradas de modo a produzirem-se descendências celulares haplóides que podem depois ser tornadas diplóides. Veja-se: Plant Tissue and Cell Culture, Plant Biology 3, (1987) A. R. Liss, Inc. N. Y.. Graças a essa técnica, a sequência de ADN estranha apresentar-se-á sob forma homozigótica no genoma nuclear de cada uma das células vegetais assim transformadas e presentes na cultura celular em causa. Isto é preferido para uma cultura de células vegetais que contenham um ADN restaurador da fertilidade sob o controlo de um primeiro promotor que dirige a expressão de um gene a um determinado nível ou fase do desenvolvimento: i) dos gametas masculinos da planta, como por exemplo o pólen, especialmente depois da meiose, ii) dos gametas femininos da planta, como, por exemplo, os óvulos, especialmente após a meiose, ou iii) das células derivadas dos gametas masculinos ou femininos, tais como as células das sementes ou as células do embrião, de tal modo que o ADN restaurador da fertilidade se encontre presente e possa ser expresso em todos os gametas masculinos ou femininos ou células vegetais deles derivadas.

Ainda de acordo com a presente invenção, proporciona-se processos para produzir sementes híbridas que podem crescer em plantas híbridas com a fertilidade restaurada. Um desses processos envolve o cruzamento de: uma planta com esterilidade masculina e fertilidade feminina de origem nuclear que inclua pelo menos um segundo ADN marcador sob o controlo de pelo menos um terceiro promotor; com uma planta homozigótica restauradora

da fertilidade masculina de origem nuclear que inclua pelo menos um ADN nuclear restaurador da fertilidade masculina sob o controlo de pelo menos um primeiro promotor mas sem o primeiro ADN marcador que é o mesmo que o segundo ADN marcador. Neste processo, as plantas com esterilidade masculina e com fertilidade masculina são semeadas ao acaso e depois da polinização utiliza-se o marcador seleccionável, codificado pelo segundo ADN marcador, para eliminar as plantas restauradoras da fertilidade, assegurando-se que as sementes são colhidas apenas nas plantas com esterilidade masculina. Isso garante que todas as sementes colhidas são simultaneamente híbridas e férteis. Outro processo envolve o cruzamento de: uma planta restauradora com fertilidade feminina e com esterilidade masculina de origem nuclear que inclua um primeiro ADN marcador nuclear sob o controlo de um segundo promotor e um ADN nuclear restaurador da fertilidade feminina sob o controlo de um primeiro promotor que se encontra sob forma homozigótica; com uma planta restauradora com esterilidade feminina e com fertilidade masculina de origem nuclear que inclua pelo menos o mesmo primeiro ADN marcador nuclear sob o controlo de um segundo promotor e um ADN nuclear restaurador da fertilidade masculina sob o controlo de um primeiro promotor que se encontra sob forma homozigótica. Ambas as plantas originais com esterilidade masculina e com fertilidade masculina podem desenvolver-se numa população praticamente aleatória, aumentando, conseqüentemente, as probabilidades de polinização cruzada sem haver necessidade de proceder à plantação segundo padrões pré-

-determinados, e utilizando-se a característica codificada pelo primeiro ADN marcador, o que permite que se venham a colher sementes híbridas 100% férteis. Preferencialmente em ambos estes processos, o primeiro ADN marcador encontra-se sob o controlo de um segundo promotor constitucional e codifica uma terceira proteína ou um terceiro polipéptido que torna a planta estéril resistente a um herbicida particular. Os genótipos não desejáveis podem então ser destruídos antes da polinização cruzada, utilizando-se o herbicida particular referido.

Um processo de acordo com a presente invenção que consiste em proceder ao cruzamento; 1) de plantas capazes de restaurar a fertilidade que contêm um ADN restaurador da fertilidade estávelmente integrado no seu genoma nuclear e transmissível através das gerações como um alelo dominante de acordo com a presente invenção, com 2) plantas com esterilidade masculina ou feminina que contêm um ADN de esterilidade, de preferência, simultaneamente, um ADN de esterilidade e um segundo ADN marcador, estavelmente integrados no seu genoma nuclear e transmissíveis através das gerações como alelos dominantes de acordo com os pedidos de patente de invenção europeia Nº 89401194.9 e Nº 90402196.1, proporciona uma alternativa e apresenta várias vantagens em relação aos sistemas actualmente utilizados para se cultivar e produzir colheitas híbridas, conforme adiante descrito :

1. para culturas que não são fáceis de polinizar por via cruzada e para as quais a semente é a colheita economicamente válida e que têm taxas de multiplicação baixos, tal como sucede com os cereais (por exemplo, trigo, centeio e cevada), arroz, algodão e muitos legumes (por exemplo, soja e ervilhas), o processo da presente invenção oferece a possibilidade de produzir descendência híbrida 100% fértil e, desse modo, garante uma grande produção de semente e um rendimento normal. Um exemplo de uma estratégia típica para se produzirem plantas híbridas, utilizando como plantas de origem plantas progenitoras com esterilidade masculina e com esterilidade feminina e um restaurador para as suas respectivas esterilidades, pode incluir os seguintes passos (neste processo "FH1" representa a esterilidade feminina ligada à resistência ao herbicida 1, "RF" representa o restaurador da esterilidade feminina, "M1H1" representa a esterilidade masculina 1 ligada à resistência ao herbicida 1, "M2H2" representa a esterilidade masculina 2 ligada à resistência ao herbicida 2 "RM1" representa o restaurador da esterilidade masculina 1, "A" representa as linhas progenitoras femininas e "B" representa as linhas progenitoras masculinas) :

A. Desenvolvimento de uma planta progenitora feminina A

- 1A) Transformar a planta A com um ADN restaurador da fertilidade de acordo com a presente invenção que codifica

um primeiro ARN, uma primeira proteína ou um primeiro polipéptido (que neutraliza especificamente o produto de expressão do ADN que controla a esterilidade feminina na planta progenitora masculina) e que se encontra sob o controlo de um primeiro promotor que dirige a expressão génica em pelo menos as mesmas células que aquelas em que o ADN de esterilidade feminina será objecto de expressão na planta masculina. Isto dá origem a $A^{RF/rf}$.

- 1Ab)** Auto polinizar $A^{RF/rf}$, dando origem a 25% de plantas $A^{RF/RF}$.
- 1Ac)** Transformar $A^{RF/RF}$ com uma sequência de ADN quimérica que inclui o "ADN de esterilidade masculina 1" sob o controlo de um promotor específico de órgão masculino e de um ADN marcador que confere resistência a um herbicida 1. Isto dá origem a uma planta com esterilidade masculina $A^{RF/RF;M1H1/mh}$.
- 1Ad)** Multiplicar a planta com esterilidade masculina por cruzamento da seguinte maneira :
 $A^{RF/RF;M1H1/mh} \times A^{RF/RF;mh/mh}$.

dando uma descendência que consiste em :

50% de $A^{RF/RF;M1H1/mh}$: esterilidade masculina 1, resistente ao herbicida 1 e

50% de A^{RF/RF;mh/mh}: com fertilidade masculina e sensível ao herbicida.

Esta mistura é semeada em gerações sucessivas de apuramento da planta progenitora feminina, e o herbicida 1 é utilizado em filas alternadas ou blocos alternados de filas para criar um patrimônio de plantas progenitoras femininas puras. As filas ou blocos de filas aonde o herbicida se não aplica servem como fontes de pólen. Apenas as sementes das filas ou blocos de filas tratadas com herbicida são colhidas para constituir a geração seguinte.

B. Desenvolvimento da planta progenitora masculina B

Para a produção econômica de B, a linha de plantas progenitoras com esterilidade feminina necessita que se utilizem dois ADNs de esterilidades diferentes. O primeiro é um ADN que desencadeia a esterilidade feminina sob o controlo de um promotor que dirige selectivamente a expressão dos genes nas células de órgão feminino de planta e que se encontra ligado a um ADN marcador que confere resistência ao herbicida 1. O segundo é um ADN que desencadeia a esterilidade masculina (diferente do ADN que desencadeia a esterilidade masculina 1 e chamado o "ADN de esterilidade masculina 2"), sob o controlo de um promotor que dirige selectivamente a expressão dos

genes nas células do órgão masculino na planta e que se encontra ligado a um segundo ADN marcador que confere resistência ao herbicida 2.

- 1Ba)** Transformar a planta B com a sequência de ADN estranha, de acordo com a presente invenção, que codifica a estrutura de um primeiro ARN, uma primeira proteína ou um primeiro polipéptido que especificamente neutraliza a actividade do ADN de esterilidade masculina 1 expresso na planta progenitora feminina e que se encontra sob o controlo de um primeiro promotor que dirige a expressão dos genes pelo menos nas mesmas células do órgão masculino em que o ADN que desencadeia a esterilidade masculina 1 na planta progenitora feminina se encontra expresso. Isto dá origem a $B^{RM1/rm}$.
- 1Bb)** Auto-polinizar $B^{RM1/rm}$, dando origem a 25% de $B^{RM1/RM1}$.
- 1Bc)** (1) Transformar $B^{RM1/RM1}$ com uma sequência de ADN quimérica que inclui o ADN desencadeador da esterilidade feminina sob o controlo de um promotor que dirige selectivamente a expressão dos genes nas células do órgão feminino da planta e um ADN marcador que confere a resistência ao herbicida 1. Isto dá origem às plantas com esterilidade feminina $B^{RM1/RM1;FH1/fh}$.

(2) Transformar $B^{RM1/RM1}$ com uma sequência de ADN quimérica que inclua o ADN 2 de esterilidade masculina 2 sob o controle de um promotor específico do órgão masculino e um ADN marcador que confere uma resistência a um herbicida que é o herbicida 2. Assim se dá origem a uma planta com esterilidade masculina que é $B^{RM1/RM1;M2H2/mh}$.

1Bd) (1) Multiplicar a planta com esterilidade masculina de 1Bc) (2) pelo cruzamento de :
 $B^{RM1/RM1;M2H2/mh} \times B^{RM1/RM1;mh/mh}$

produzindo-se assim uma descendência que consiste em :
 50% de $B^{RM1/RM1;M2H2/mh}$: com esterilidade masculina, resistente ao herbicida e
 50% de $B^{RM1/RM1;mh/mh}$: com fertilidade masculina e sensível ao herbicida.

(2) Multiplicar a planta com esterilidade feminina de 1Bc) (1) pelo cruzamento :
 $B^{RM1/RM1;M2H2/mh;fh/fh}$
 $\times B^{RM1/RM1;mh/mh;FH1/fh}$ devendo essas plantas ser plantadas em filas separadas, dando-se origem aos seguintes genótipos nas filas em que há esterilidade masculina :
 25% de $B^{RM1/RM1;M2H2/mh;FH1/fh}$: estéreis e resistentes ao herbicida 1 e ao herbicida 2,

25% de $B^{RM1/RM1;mh/mh;FH1/fh}$: com esterilidade feminina e resistência ao herbicida 1.

25% de $B^{RM1/RM1;M2H2/mh;fh/fh}$: com esterilidade masculina e resistência ao herbicida 2 e

25% $B^{RM1/RM1;mh/mh;fh/fh}$: férteis e sensíveis ao herbicida.

1Be) Esta mistura pode ser utilizada outra vez como progenitor masculino ($B^{RM1/RM1;mh/mh;FH1/fh}$) em ulteriores cruzamentos de multiplicação, graças aos quais, procedendo-se à pulverização em cada geração com herbicida 1, se elimina o conjunto das plantas com fertilidade feminina e assim se mantêm a linha progenitora masculina. Esta mistura será plantada em filas alternadas ou blocos de filas alternadas com a mistura obtida em 1Bd) (1), sendo essa mistura tratada com herbicida 2 para se eliminarem as plantas com fertilidade masculina. Alternativamente, a mistura obtida em 1Bd) (2) pode ser semeada assim mesmo e as filas alternadas podem ser tratadas ou com o herbicida 1 ou com o herbicida 2. Nessas circunstâncias o passo 1Bd) (1) deixa de ser necessário.

C. Produção da semente híbrida AB

Semear aleatoriamente as misturas obtidas nos passos 1Ad) e 1Be). Antes de haver uma polinização cruzada, fazer a pulve-

rização com o herbicida 1 de maneira a eliminar todos os genótipos indesejáveis. fazer a polinização cruzada com :
 $A^{RF/RF;rf/rf;MlHl/mh;fh/fh} \times B^{Rm/Rm;rm/rm;mr/mh;Fhl/fh}$,
 dando origem a :

25% de $AB^{RF/rf;MlHl/mh;rm/Rm;Fhl/fh}$

25% de $AB^{RF/rf;MlHl/mh;rm/Rm;fh/fh}$

25% de $AB^{RF/rf;mh/mh;rm/Rm;Fhl/fh}$

25% de $AB^{RF/rf;mh/mh;rm/Rm;fh/fh}$

constituindo-se assim uma semente híbrida 100% fértil.

2. Dependendo das características especiais da cultura semeada, a estratégia geral que a seguir se define pode ser simplificada. Tais características especiais incluem :

- (2.1) Se a cultura fôr objecto de uma polinização cruzada razoável ou boa, feita com o auxílio de insectos, a proporção relativa da linha B progenitora na mistura pode ser baixada sem que se afecte o nível de produção da cultura (por exemplo, o algodão, um legume como o Pisum, a alfafa, a colsa e o milho). Alternativamente, um esquema de cultivo muito mais simplificado pode ser utilizado para uma cultura que envolva uma linha progenitora feminina que tenha sido tornada estéril sob o ponto de vista masculino e resistente a um herbicida e um progenitor masculino que transporte o gene restaurador da fertilidade para contrariar a esterilidade masculina.

Isto permitiria a seguinte estratégia :

Cruzar: $A^{MH/mh}$ com $B^{RM/RM}$ semeados aleatoriamente ou em filas para colheitas que não floresçam simultaneamente.

Tratar com herbicida depois da polinização quando se procedeu a uma sementeira aleatória.

A produção é de: 50% de $AB^{MH/mh;RM/rm}$ e de 50% de $AB^{mh/mh;RM/rm}$, constituindo uma descendência híbrida 100% fértil.

- (2.2) No caso de uma descendência F2 representar o produto de semente comercialmente válido (por exemplo, o caso do algodão), pode utilizar-se a seguinte variante estratégica :
- a) Produzir por transformação plantas com esterilidade masculina da linha progenitora A, dando origem a $A^{M/m;r/r}$;
 - b) Produzir por 2 eventos de transformação e independentes plantas capazes de restaurar a fertilidade que transportem em dois loci genéticos independentes do seu genoma nuclear o gene restaurador da fertilidade cujo produto neutraliza especificamente a actividade do gene

da esterilidade masculina na planta com esterilidade masculina de a) e obter por auto-polinização ambos os genes capazes de restaurar a fertilidade sob a forma homozigótica, dando origem a $B^{m/m;R1/R1;R2/R2}$;

- c) Cruzar $A^{M/m;r/r}$ com $B^{m/m;R1/R1;R2;R2}$ produzindo-se assim 50% de $AB^{M/m;R1/r;R2/r}$ e 50% de $AB^{m/m;R1/r;R2/r}$ o que constitui uma descendência híbrida 100% fértil e
- d) auto-polinizar a mistura obtida em c). Metade da descendência será produzida conforme o que se mostra no Quadro 1, a seguir, havendo apenas 1 de um total de 64 plantas que é dotada de esterilidade masculina (indicada por um * no Quadro 1) e todas as outras são férteis. Este resultado faz com que o processo seja economicamente valioso.

QUADRO 1

AB/AB	sR1R2	sR1r2	srlR2	srlr2
SR1R2	sR1R2/SR1R2	sR1r2/SR1R2	srlR2/SR1R2	srlr2/SR1R2
SR1r2	sR1R2/Sr1R2	sR1r2/SR1r2	srlR2/SR1r2	srlr2/SR1r2
Sr1R2	sR1R2/Sr1R2	sR1r2/Sr1R2	srlR2/Sr1R2	srlr2/Sr1R2
Sr1r2	sR1R2/Sr1r2	sR1r2/Sr1r2	srlR2/Sr1r2	srlr2/Sr1r2*
sR1R2	sR1R2/sR1R2	sR1r2/sR1R2	srlR2/sR1R2	srlr2/sR1R2
sR1r2	sR1R2/sR1r2	sR1r2/sR1r2	srlR2/sR1r2	srlr2/sR1r2
srlR2	sR1R2/srlR2	sR1r2/srlR2	srlR2/srlR2	srlr2/srlR2
srlr2	sR1R2/srlr2	sR1r2/srlr2	srlR2/srlR2	srlr2/srlR2

- (2.3) Se o ADN de esterilidade masculina 2 estiver ligado a outro ADN marcador, diferente daquele que codifica a resistência ao herbicida 2, por exemplo um gene que determina uma cor, as plantas que transportam este ADN de esterilidade masculina podem ser facilmente eliminados sem dano para as outras plantas. Alternativamente, o ADN da esterilidade masculina 2 pode ser introduzido sem nenhum ADN marcador seleccionável. A eliminação das plantas que transportam o ADN da esterilidade masculina 2 pode ser feita através de selecção manual, o que torna necessário que seja feito em apenas uma pequena escala (ver (1) Bd), acima descrito).

(2.4) Se o tecido das plantas progenitoras que deve ser transformado for constituído por células haplóides, isto reduzirá consideravelmente a descendência subsequente, apresentando os genes dominantes que codificam a esterilidade numa forma homozigótica.

(2.5) Se o valor da semente, ou o custo da mão-de-obra permitir a eliminação manual dos genótipos não desejados, pelo menos até aos últimos passos que precedem a produção dos híbridos, o sistema geral pode também ser simplificado.

3. Outro exemplo de uma estratégia de cultura - utilizando esterilidade masculina e esterilidade feminina combinadas com o sistema restaurador da fertilidade de acordo com a presente invenção - pode incluir os seguintes passos :

3A. Desenvolvimento de uma linha progenitora feminina A

3Aa) Transformar a linha A com uma sequência de ADN estranha que inclua um ADN restaurador da fertilidade de acordo com a presente invenção que: codifica um primeiro ARN, uma primeira proteína ou um primeiro polipéptido que neutraliza especificamente a actividade do produto do ADN da esterilidade feminina expressa na linha proge-

nitroa masculina; e que se encontra sob o controle de um primeiro promotor que dirige a expressão do ADN restaurador de fertilidade pelo menos nas mesmas células do órgão feminino em que o ADN da esterilidade feminina da linha progenitora masculina se encontra expresso; e se encontra adjacente a um primeiro ADN marcador que codifica a resistência ao herbicida 2. Isto dá origem a $A^{RFH2/rfh}$. Transformar também, em paralelo, a linhagem A com a sequência de ADN que inclui um ADN de esterilidade masculina que: se encontra sob o controle de um promotor específico de um órgão masculino; e que se encontra adjacente a um segundo ADN marcador que codifica uma resistência a um herbicida diferente (por exemplo, em relação ao herbicida 1) daquela que é codificada pelo primeiro ADN marcador. Isto dá origem a $A^{MH1/mh}$.

3Ab) Cruzar $A^{RFH2/rfh}$ com $A^{MH1/mh}$, dando origem a

- 25% de $A^{RFH2/rfh;MH1/mh}$
- 25% de $A^{RFH2/rfh;MH1/mh}$
- 25% de $A^{rfh/rfh;MH1/mh}$
- 25% de $A^{rfh/rfh;mh/mh}$.

Pulverizar com os herbicidas 1 e 2, seleccionando-se $A^{RFH2/rfh;MH1/mh}$.

3Ac) Proceder à auto-polinização de $A^{RFH2/rfh} \times A^{RFH2/rfh}$, dando origem a 25% de $A^{RFH2/RFH2}$, que pode ser mantido por auto-polinização.

3Ad) Cruzar $A^{RFH2/RFH2;mh/mh}$ com $A^{RFH2/rfh;MH1/mh}$.
Isto dá origem a :

25% de $A^{RFH2/RFH2MH1/mh}$

25% de $A^{RFH2/RFH2;mh/mh}$

25% de $A^{RFH2/rfh;MH1/mh}$

25% de $A^{RFH2/rfh;mh/mh}$

graças ao que as plantas com esterilidade masculina, tendo o ADN restaurador da fertilidade sob a forma homozigótica, podem ser seleccionadas por pulverização com herbicida 1 e por cruzamento de verificação com a linha progenitora A.

3Ae) Manter a linha progenitora feminina A mediante cruzamento de :

$A^{RFH2/RFH2;MH1/mh}$ com $A^{RFH2/RFH2;mh/mh}$.

B. Desenvolvimento de uma linha progenitora masculina B

3Ba) Transformar a linha B com a sequência de ADN estranha que inclui o ADN restaurador da fertilidade da presente invenção que: codifica um primeiro ARN, uma primeira

proteína ou um primeiro polipéptido que neutraliza especificamente a actividade do produto do ADN da esterilidade masculina expresso na linha progenitora feminina; se encontra sob o controlo de um primeiro promotor que dirige a expressão do ADN restaurador da fertilidade pelo menos nas mesmas células do órgão masculino em que o ADN da esterilidade masculina é objecto de expressão e que se encontra adjacente a um primeiro ADN marcador que codifica a resistência ao herbicida 2. Isto dá origem a $B^{RMH2/rhm}$.

Transformar, em paralelo, também a linha B com a sequência de ADN que inclui o ADN de esterilidade feminina que: se encontra sob o controlo específico de um órgão feminino, e se encontra adjacente a um segundo ADN marcador que codifica a resistência ao herbicida 1. Isto dá origem a $B^{FH1/fh}$.

3Bb) Cruzar $B^{RMH2/rmh; fh/fh}$ com $B^{rmh/rmh; FH1/fh}$, dando origem a :

25% de $B^{RMH2/rmh; FH1/fh}$

25% de $B^{RMH2/rmh; fh/fh}$

25% de $B^{rmh/rmh; FH1/fh}$

25% de $B^{rmh/rmh; fh/fh}$

Isolar $B^{RMH2/rmh;FH1/fh}$ por pulverização com os herbicidas 1 e 2.

3Bc) Proceder à auto-polinização de $B^{RMH2/rm}$ com $B^{RMH2/rmh}$, dando origem a :

25% de $B^{RMH2/RMH2}$ que pode ser mantido pelo processo de autopolinização.

3Bd) Cruzar $B^{RMH2/RMH2}$ com $B^{RMH2/rmh;FH1/fh}$ dando origem a :

25% de $B^{RMH2/RMH2;FH1/fh}$

25% de $B^{RMH2/RMH2;FH/fh}$

25% de $B^{RMH2/rmh;FH1/fh}$

25% de $B^{RMH2/rmh;fh/fh}$,

graças ao que as plantas com esterilidade feminina tendo o ADN restaurador da fertilidade sob a forma homozigótica são seleccionadas por pulverização com herbicida 1 e por cruzamento de verificação com a linha progenitora B.

3Be) Manter a linha progenitora masculina B pelo cruzamento de: $B^{RMH2/RMH2;fh/fh}$ com $B^{RMH2/RMH2;FH1/fh}$.

C. Processo alternativo para o desenvolvimento de uma planta progenitora masculina ou feminina (A ou B são ambos designados por C)

- 3Ca) Transformar a linha C com uma sequência de ADN estranha que inclua um ADN restaurador da fertilidade de acordo com a presente invenção que: codifica um primeiro ARN, uma primeira proteína ou um primeiro polipéptido que especificamente neutraliza a actividade do produto de um ADN de esterilidade expresso na outra linha progenitora; se encontra sob o controlo de um primeiro promotor que dirige a expressão do ADN restaurador da fertilidade pelo menos naquelas células em que o ADN da esterilidade da outra linha progenitora é objecto de expressão; e que se encontra adjacente a um primeiro ADN marcador que codifica a resistência ao herbicida 2. Isto dá origem a $C^{RH2/rh}$.
- 3Cb) Proceder à auto-polinização de $C^{RH2/rh}$ com $C^{RH2/rh}$, produzindo 25% de $C^{RH2/RH2}$ que pode ser mantido através de auto-polinização.
- 3Cc) Transformar $C^{RH2/RH2}$ com uma sequência de ADN que inclui um ADN de esterilidade que se encontra: sob o controlo de um promotor específico de um órgão masculino ou de um órgão feminino e se encontra adjacente a um

segundo ADN marcador que codifica a resistência ao herbicida 1. Isto dá origem a $C^{RH2/RH2;SH1/sh}$ (em que "S" representa a esterilidade masculina ou a esterilidade feminina).

3Cd) Manter a linha C pelo seguinte esquema de cruzamentos:
 $C^{RH2/RH2;SH1/sh}$ com $C^{RH2/RH2;sh/sh}$.

3D Produção da semente híbrida AB

Semear ao acaso as misturas obtidas nos passos 3Ae) e 3Be) ou a mistura obtida no passo 3Cd). Antes de ocorrer a polinização cruzada, pulverizar com herbicidas 1 e 2 de maneira a eliminar todos os genótipos indesejáveis. Isto dá origem ao seguinte cruzamento :

$$A^{RFH2/RFH2;rm/rm;MH1/mh;fh/fh}$$

$$B^{RMH2/RMH2;rf/rf;FH1/fh;mh/mh}$$

Isto dá origem à seguinte descendência :

25% de $AB^{RFH2/rf;RMH2/rm;MH1/mh;FH1/fh}$

25% de $AB^{RFH2/rf;RMH2/rm;MH1/mh;fh/fh}$

25% de $AB^{RFH2/rf;RMH2/rm;mh/mh;FH1/fh}$

25% de $AB^{RFH2/rf;RMH2/rm;mh/mh;fh/fh}$

consistindo em sementes híbridas com uma fertilidade de 100%.

4. Outras vantagens do sistema restaurador da fertilidade de acordo com a presente invenção, combinado com os sistemas de esterilidade masculina ou de esterilidade feminina descritos nos pedidos de patente de invenção europeias Nº 89401194.9 e Nº 90402196.1, em comparação com os sistemas mais antigos, incluem :
- a) Um esquema de produção à prova de erros, com diversos marcadores fáceis de distinguir e de seleccionar para o controlo da qualidade;
 - b) uma considerável redução da complexidade ao nível da multiplicação da semente final, que é essencial para que haja uma produção fiável e custos de produção reduzidos; e
 - c) redução do tempo necessário para a produção da semente híbrida comercialmente válida.

Os seguintes Exemplos ilustram a presente invenção. As Figuras a que se faz referência nos Exemplos são as seguintes :

A Fig. 1 mostra um mapa do vector pTVE74 do Exemplo 1.

A Fig. 2 representa uma sequência de ADN do gene barstar, utilizado no Exemplo 1, e ilustra a sequência do seu sítio ClaI, que foi objecto de mutação.

A Fig. 3 representa um mapa do vector pTVE73 do Exemplo 3.

A Fig. 4 representa um mapa do vector pTVE76 do Exemplo 3.

A menos que claramente se indique o contrário nos Exemplos, todos os procedimentos para fazer e manipular o ADN recombinante foram realizados por técnicas normalizadas tais como se encontram descritas em Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, (1982) Cold Spring Harbor Laboratory. Os seguintes plasmídeos e vectores, utilizados nos Exemplos, foram depositados no Deutsche Sammlung Für Mikroorganismen und Zellculturen ("DSM"), Mascheroder Weg 1B, D-3300 Braunschweig, Alemanha ao abrigo do tratado de Budapeste.

Plasmídeo ou vector	Número de Acesso do DSM	Data
pMB3	4470	21 Mar. 1988
pGSC1700	4469	21 Mar. 1988
pGV2260	2799	Dec. 1983

**EXEMPLO 1 - Construção de uma sequência de ADN quimérica do PTA29
e de um gene barstar**

Constrói-se um plasmídeo designado por "pTVE74", ilustrado na Fig. 1, pela reunião dos seguintes fragmentos de ADN, bem conhecidos, com o promotor PTA29 :

1. um fragmento de um vector, que inclui as sequências limítrofes do ADN-T, derivado do pGSC1700 (Cornelissen e Vandewiele NAR, 17 (1) (1989) 19-29) em que foi suprimido o gene da β -lactamase; localizado entre as sequências limítrofes estão os seguintes fragmentos 2 e 3 de ADN;
2. uma sequência quimérica que contém uma cassette promotora PTA29 de acordo com o pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9, cuja estrutura se encontra fundida ao códon de iniciação ATG com um barstar que codifica um gene do Bacillus amyloliquefaciens, que é o inibidor celular da ribonuclease extra-celular, a que se chama Barnase [Hartley et al., Preparativ Biochemistry, 2 (3) (1972) 243-250; Hartley e Smeaton, J. Biol. Chem., 248 (16) (1973) 5624-5626]; depois efectuam-se os seguintes passos :
 - a) A sequência de nucleótidos GCAC, nas posições 7 a 10 a montante do primeiro códon ATG, é mutada transformando-se na sequência de nucleótidos ATCG, de maneira

a que se obtenha um sítio de clonagem ClaI adequado no primeiro codão da metionina da sequência de codificação (ver Fig. 2); isto é executado utilizando-se um processo de mutagenese dirigida a um sítio (pedido de patente de invenção europeia Nº 87402348.4) e origina pMc5-TPBSC; as extremidades salientes ClaI são digeridas pela enzima SI, e o gene barstar é isolado como um fragmento de ClaI-HindIII de 330 nucleótidos (Fig. 2); e

b) O fragmento ClaI-HindIII tratado com SI do pMc5-TPBSC é fundido com o fragmento NcoI-HindIII tratado pelo SI do pMB3 (pedido de patente de invenção europeia Nº: 89401194.9) e com um fragmento de restrição que contém os sinais da extremidade 3' do gene da nopalina sintetase ("NOS") que regulam a terminação da transcrição e a poliadenilação [An et al., EMBO J., 4 (2), (1985) 277]; e

3. uma sequência quimérica que contém o promotor SSU da Arabidopsis Rubisco ("PSSU" ou "PSSUARA"), um neo-gene que codifica a resistência à canamicina (pedido de patente de invenção europeia Nº 87400544.0) e os sinais da extremidade 3' do gene da octopina sintetase ("OCS") [Dhaese et al., EMBO J., 2, (1983) 419].

O pTVE74 é um vector de ADN-T de tipo binário que contém, dentro das sequências limítrofes do ADN-T, três sequências

quiméricas: PNOS-neo e PSSU-sfr que compreendem os primeiros ADNs marcadores sob o controlo dos seus próprios segundos promotores; e o PTA29-barstar em que o barstar é um ADN restaurador da fertilidade cuja expressão sob controlo do primeiro promotor PTA29 que é específico do tapetum neutralizará, nas células do tapetum de uma planta que de outro modo seria dotada de esterilidade masculina, a actividade da Barnase codificada pelo ADN de esterilidade sob o controlo de um promotor de esterilidade específico do tapetum, tal como se descreveu no pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9.

EXEMPLO 2 - Introdução de uma sequência de ADN quimérica do

Exemplo 1 nas células do tabaco e nas células da colza

Constrói-se uma estirpe recombinante de Agrobacterium através da mobilização do pTVE74 (de acordo com o Exemplo 1) do E. coli para dentro do Agrobacterium tumefaciens C58C1 Rif^R que contém pMP90 [Koncz e Schell, Mol. Gen. Genetics, 204, (1986) 383-396]. A estirpe de Agrobacterium daí resultante que alberga o pMP90 e o pTVE74 é utilizada para se transformar os discos da folha de tabaco (Nº tabacum Petite Havane SRL) utilizando processos clássicos normalizados tais como já foram descritos, por exemplo, no pedido de patente de invenção europeia Nº: 87400544.0 e para transportar a colza (Brassica napus) de acordo com os processos de Lloyd et al., Science, 234, (1986) 464-466

e Klimaszweska et al., Plant Cell Tissue Organ Culture, 4, (1985) 183-197. Utiliza-se a carbenicilina para aniquilar as estirpes de Agrobacterium após a infecção.

Os calóides transformados são seleccionados em substratos que contêm 100 μ g/ml de canamicina, e faz-se com que a partir dos calóides resistentes se regenerem plantas. Após a indução de rebentos e de raízes, os tecidos em processo de transformação são transferidos para uma estufa onde se desenvolvem até florirem. As flores são examinadas, verificando-se que exibem uma morfologia natural completa. Os pólenes destas flores são então utilizados para polinizar as plantas de tabaco e de colza com esterilidade masculina de origem nuclear que contêm o gene da Barnase como ADN de esterilidade, sob o controlo do promotor de esterilidade PTA29 que é específico das células de tapetum, descrito no Exemplo 13 do pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9. A descendência destas plantas com esterilidade masculina polinizadas é analisada verificando-se que 75% das suas flores não exibem um fenótipo de esterilidade masculina (isto é, a ausência da camada de tapetum normal nos estames das suas flores).

EXEMPLO 3 - Construção de sequências de ADN quiméricas de PTA29 e de um gene de metilase EcoRI

Constrói-se um plasmídeo denominado "pTVE73", cuja estrutura se ilustra na Fig. 3, pela união dos seguintes fragmentos, bem conhecidos, com o promotor PTA29 :

1. um fragmento vector, que inclui as sequências limítrofes do ADN-T, derivado do pGSC1700 tal como se descreveu no Exemplo 1 e com os seguintes fragmentos 2-4 de ADN entre as suas sequências limítrofes;
2. a sequência quimérica (Nº 3) do Exemplo 1, que contém o promotor pSSU que controla a expressão do neo-gene e da extremidade 3' do gene OCS;
3. uma sequência quimérica, que contenha o promotor da nopalina-sintetase ("PNOS") [pedido de patente de invenção europeia Nº 87400544.0], o gene hph que confere a resistência à higromicina [Van den Elzen et al., Plant Molecular Biology, 5, (1985) 299-302] e a extremidade 3' do gene NOS (Exemplo 1); e
4. uma sequência quimérica, que contém a cassette promotora PTA29 do Exemplo 1, de estrutura fundida com o gene da metilase EcoRI [Botterman e Zabeau, Gene, 37, (1985) 229-239], cujo produto de expressão neutraliza a actividade da endonuclease de restrição EcoRI que cliva o ADN de dupla hélice nos sítios GAATTC [Wilson TIG, 4, (11) (1988) 314-318]; são realizados os passos seguintes :
 - a) um fragmento BglIII-HindIII do pEcoR4 [Botterman e Zabeau (1985)] contendo a sequência de codificação da metilase EcoRI, é submetido a clonagem no pMa5-8

(pedido de patente de invenção europeia Nº 87402348.4);
mediante uma mutagenese dirigida para um sítio FspI é
introduzida no terminal N da sequência que codifica a
metilase

TTA, ATG, GCT, AGA, AAT

TGC, GCA

FspI

- b) o fragmento promotor de pMB3 é ligado no seu sítio
preenchido NcoI à ponta arredondada FspI, produzindo o
PTA29

_____ cc ATG, GCA, ...

_____ metRI.

e é fundido com a extremidade 3' do gene NOS do Exemplo
1.

O vector pTVE73 é de ADN-T de tipo binário e contém dentro
das sequências limítrofes do ADN-T, três sequências quiméricas:
PSSU-neo e pNOS-hph que são os primeiros ADNs marcadores sob o
controle dos seus próprios promotores, e o gene PTA29-metilase
EcoRI que é um ADN restaurador da fertilidade sob o controle do
primeiro promotor PTA29 específico do tapetum. A expressão nas
células do tapetum de uma planta que de outro modo seria dotada

de esterilidade masculina do ADN restaurador da fertilidade sob o controlo do promotor PTA29 neutralizará a actividade, ao nível dessas células de EcoRI codificada por um ADN de esterilidade sob o controlo de um promotor de esterilidade específico do tapetum, tal como foi descrito no Exemplo 16 do pedido de patente de invenção europeia Nº 89401134.9.

Também se constrói um plasmídeo denominado "pTVE76", cuja estrutura se ilustra na Fig. 4, através de um processo de união ao promotor PTA29 dos seguintes fragmentos bem conhecidos :

1. Um fragmento de vector, que inclui as sequências limítrofes do ADN-T, derivado do pGSC1700 [Cornelissen e Vandewiele, NAR, 17 (1) (1989) 19-29] no qual o gene da β -lactamase foi suprimido e que contém os seguintes fragmentos 2-4 entre as suas sequências limítrofes;
2. a sequência quimérica (Nº 3) do Exemplo 1, que contém o promotor pSSU, o neo-gene e a extremidade 3' do gene OCS;
3. a sequência quimérica que contém o promotor PNOS o gene hph e a extremidade 3' do gene NOS; e
4. uma sequência quimérica que contém a cassette do promotor pTA29 de acordo com o Exemplo 1, cuja estrutura se encontra fundida com o fragmento do gene que codifica a estrutura do

péptido de trânsito ("PT") da Mm-superóxido dismutase ("Mn-SOD") [Bowler et al., Embo J., 8, (1989) 31-38]; são feitas as seguintes modificações na estrutura do péptido de trânsito com o fim de isolar o fragmento para se proceder à clonagem utilizando a mutagênese dirigida ao sítio, tal como foi descrita no pedido de patente de invenção europeia Nº 87402348.4 :

- i) os nucleótidos AA localizados a montante na posição -2 e -1 em relação ao codão de iniciação ATG são modificadas de modo a transformarem-se em nucleótidos CC que constituam um sítio NcoI no codão de iniciação, o que resulta na produção das seguintes sequências de nucleótidos:

- CCATGGCACTAC

NcoI

- ii) os nucleótidos CTTG localizados imediatamente no sítio de processamento do péptido de trânsito são modificados para se transformarem em GGTAC, criando um sítio KpnI no sítio de processamento, o que resulta nas seguintes sequências de nucleótidos :

G		L	Q	T	F	S	L
CTC, CGC, GGC,		TTG, CAG, ACC, TTT, TCG, CTC					
CTC, CGC, GGC,		<u>GTA, CAG, ACC, TTC...</u>					

↓ KpnI

em que a seta indica o sítio de processamento da sequência do péptido de trânsito e linha superior indica a sequência de aminoácidos que corresponde à sequência que codifica a estrutura de Mn-SOD; após o tratamento do sítio KpnI com polimerase de ADN Klenow, o fragmento NcoI-KpnI é fundido na sua estrutura ao terminal N arredondado do FspI da sequência que codifica a metilase EcoRI, tal como foi utilizado na construção do pTVE73 e a seguir é fundido com a extremidade 3' do gene NOS, de acordo com o Exemplo 1.

O pTVE76 é um vector do tipo binário de ADN-T e contém, entre as sequências limítrofes de ADN-T três sequências quiméricas: o PSSU-neo e o PNOS-hph que são os primeiros ADNs marcadores sob o controlo dos seus segundos promotores; e o gene da PTA29-TP-EcoRI metilase que é um ADN restaurador da fertilidade sob o controlo do primeiro promotor PTA29. A expressão da metilase EcoRI, fundida com o péptido de trânsito da Mn-SOD, nas células de tapetum de uma planta que, de outro modo, seria dotada de esterilidade masculina e o acto de dirigir a proteína do tapetum para as mitocôndrias dessas células neutralizarão a actividade nessas mesmas células da EcoRI fundida com o péptido de trânsito cuja estrutura é codificada pelo ADN de esterilidade correspondente, que se encontra sob o controlo de um promotor específico do

tapetum tal como se descreveu no Exemplo 16 do pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9.

EXEMPLO 4 - Introdução de sequências de ADN quimérico do Exemplo 3 no tabaco e na colza

As estirpes recombinantes de Agrobacterium são construídas pela mobilização do pTVE73 e do pTVE76 do Exemplo 3 originários do E. coli e a seguir integrados no Agrobacterium C58Cl Rif^R que contém pMP90 [Koncz e Schell, Mol. Gen. Genetics, 204, (1986) 383-396]. As estirpes daí resultantes, que albergam, respectivamente, o pMP90 e o pTVE73 e o pMP90 e o pTVE76 são utilizadas para a transformação dos discos da folha de tabaco e para a transformação da colza, tal como se descreveu no Exemplo 2. Os calóides transformados e os rebentos são seleccionados em substratos que contêm 100 μ g/ml de canamicina.

Os rebentos transformados são postos em processo de desenvolvimento de raízes, transferidos para o solo numa estufa onde se desenvolvem até que floresçam. As flores, tanto do tabaco como da colza, são então examinadas e ambas mostram uma morfologia natural. O pólen destas flores é utilizado para polinizar plantas de tabaco e de colza com esterilidade masculina de origem nuclear obtidas por transformações com vectores pTVE63 e pTVE62, respectivamente, (tal como se descreveu no Exemplo 17 do pedido

de patente de invenção europeia Nº 89401194.9) sendo de notar que nesses vectores o gene EcoRI é um ADN de esterilidade sob o controlo de um promotor de esterilidade PTA29 e, no vector pTVE62, o gene EcoRI está também fundido com o ADN que codifica o péptido de trânsito da Mn-SOD. A descendência destas plantas que se encontram dotadas de esterilidade é analisada e 75% das suas flores não exibem um fenótipo com esterilidade masculina (isto é, ausência de uma camada de tapetum normal nos estames das suas flores).

Como é evidente, a presente invenção não se encontra limitada às transformações de quaisquer plantas específicas. A presente invenção diz respeito a qualquer planta cujo genoma nuclear possa ser transformado com um ADN restaurador da fertilidade sob o controlo de um primeiro promotor que possa dirigir a expressão de um ADN restaurador da fertilidade de maneira selectiva pelo menos nas células das flores da planta, particularmente pelo menos num seu órgão masculino ou num seu órgão feminino, e/ou em sementes e/ou embriões, graças ao que a planta em causa possa ser simultaneamente auto-polinizada e objecto de polinização cruzada. Por exemplo, a presente invenção diz respeito a plantas tais como o milho, a colza, o trigo, o arroz, o girassol, a beterraba, o tomate, a alface, os pimentos, o sorgo, a soja, as ervilhas, a alfafa, as ervas, os trevos, a cenoura, as couves, o alho-pôrro, as cebolas, o tabaco, as petúnias, o cacau, e as árvores de citrinos.

Por outro lado, a presente invenção não se encontra limitada aos plasmídeos e aos vectores especificamente descritos nos exemplos anteriores, compreendendo também todos os plasmídeos e vectores que contêm o ADN capaz de restaurar a fertilidade sob o controlo do primeiro promotor.

Além disso, a presente invenção não está limitada aos primeiros promotores descritos nos exemplos anteriores, tais como o promotor PTA29, antes pelo contrário compreende qualquer sequência de ADN que codifique um primeiro promotor capaz de dirigir a expressão de um ADN restaurador da fertilidade, pelo menos nas células das flores de uma planta, nas suas sementes e/ou nos seus embriões, nos quais a expressão de um ADN de esterilidade de um outro modo faria com que a planta se tornasse dotada de uma esterilidade masculina ou de uma esterilidade feminina. Em relação a este ponto, o primeiro promotor da presente invenção compreende: promotores descritos no pedido de patente de invenção europeia Nº 89401194.9 para utilização no controlo da expressão de um ADN capaz de desencadear a esterilidade selectivamente nas células dos estames de uma planta que se pretende dotar de esterilidade masculina; e os promotores descritos no pedido de patente de invenção europeia Nº 90402196.1 para utilização no controlo da expressão de um ADN capaz de desencadear a esterilidade selectivamente nas células das flores, das sementes ou dos embriões de uma planta que se pretende dotar de esterilidade feminina. Alternativamente, o primeiro ptomotor pode ser um

promotor constitutivo em relação à planta, desde que seja assegurada a condição de o primeiro ARN, a primeira proteína ou o primeiro polipéptido não perturbar significativamente de maneira adversa o funcionamento, o metabolismo ou o desenvolvimento das células em que ele é expresso na ausência da expressão do ADN de esterilidade.

Por outro lado, a presente invenção não é limitada aos ADNs específicos que são capazes de restaurar a fertilidade e que se descreveram nos exemplos anteriores, compreendendo também qualquer sequência de ADN que codifica um primeiro ARN, uma primeira proteína ou um primeiro polipéptido que, numa planta cuja fertilidade foi restaurada neutraliza, bloqueia, altera, supera ou de qualquer outra maneira impede a actividade do segundo ARN, da segunda proteína ou do segundo polipéptido que é codificado pelo ADN capaz de desencadear a esterilidade e que se encontra sob o controlo do promotor de esterilidade e que de outro modo significativamente perturbaria de maneira adversa o metabolismo, o funcionamento e/ou o desenvolvimento das células das flores, das sementes ou dos embriões dessa planta.

A presente invenção também não se encontra limitada aos primeiros ADNs marcadores específicos que se descreveram nos exemplos anteriores, mas compreende também qualquer sequência de ADN que codifique um terceiro ARN, uma terceira proteína ou um terceiro polipéptido que confere, em pelo menos um tecido vegetal

específico ou em células específicas duma planta, em que essa sequência é expressa, uma característica distintiva que possa servir de critério de separação quando comparada com as características de um tecido vegetal específico ou de células vegetais específicas nas quais essa sequência de ADN não tenha sido expressa.

Reivindicações

1. ADN recombinante, caracterizado pelo facto de incluir um primeiro ADN quimérico o qual compreende:
 - a) um ADN restaurador que codifica uma proteína que é um inibidor de uma ribonuclease e
 - b) um primeiro promotor que dirige a expressão pelo menos em células específicas de uma flor, de uma semente e/ou de um embrião de uma planta, e de o referido ADN restaurador estar na mesma unidade transcricional do referido primeiro promotor e sob o seu controlo.
2. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido inibidor ser capaz de neutralizar a actividade da barnase, ribonuclease extracelular do *Bacillus amyloliquefaciens*.
3. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o referido inibidor ser barstar com uma sequência de aminoácidos tal como codificada pela sequência nucleotídica:

ATGAAAAAAGCAGTCATTAACGGGGAACAAATCAGAAGTATCAGCGACCT
 CCACCAGACATTGAAAAAGGAGCTTGCCCTTCCGGAATACTACGGTGAAAACCTGGACGC
 TTTATGGGATTGTCTGACCGGATGGGTGGAGTACCCGCTCGTTTTGGAATGGAGGCAGTT
 TGAACAAAGCAAGCAGCTGACTGAAAATGGCGCCGAGAGTGTGCTTCAGGTTTTCCGTGA
 AGCGAAAGCGGAAGGCTGCGACATCACCATCATACTTTCT

ou uma sua variante que seja capaz de neutralizar a barnase.

4. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo facto de o referido ADN restaurador incluir a sequência nucleotídica:

ATGAAAAAAGCAGTCATTAACGGGGAACAAATCAGAAGTATCAGCGACCT
CCACCAGACATTGAAAAAGGAGCTTGCCCTTCCGGAATACTACGGTGAAAACCTGGACGC
TTTATGGGATTGTCTGACCGGATGGGTGGAGTACCCGCTCGTTTTGGAATGGAGGCAGTT
TGAACAAAGCAAGCAGCTGACTGAAAATGGCGCCGAGAGTGTGCTTCAGGTTTTCCGTGA
AGCGAAAGCGGAAGGCTGCGACATCACCATCATACTTTCT.

5. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo facto de o referido ADN restaurador ser o fragmento Clal-HindIII da figura 2.
6. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 5, o qual inclui também um segundo ADN quimérico, caracterizado pelo facto de compreender:
- (c) um ADN marcador que codifica um ARN marcador, uma proteína ou um polipeptido que, ao estar presente pelo menos num tecido específico ou pelo menos em células específicas de uma planta, faz com que essa planta seja facilmente separável de outras plantas que não contenham o referido ARN marcador, a referida proteína ou o referido polipeptido nesse tecido específico ou nessas células específicas; e
 - (d) um segundo promotor capaz de dirigir a expressão do referido ADN marcador pelo menos no referido tecido específico ou nas referidas células específicas; em que o referido ADN marcador está na mesma unidade transcricional do referido segundo promotor e sob o seu controlo.

7. ADN recombinante de acordo com as reivindicações 6 ou 7, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma proteína ou um polipeptido que confere uma cor pelo menos ao referido tecido específico ou às referidas células específicas, ou codificar uma proteína ou um polipeptido que confere a essa planta uma tolerância à fadiga, uma resistência a doenças ou pragas, ou uma resistência bacteriana.
8. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma endotoxina de *Bacillus thuringiensis* que confere resistência aos insectos, ou codificar um péptido bactericida que confere uma resistência bacteriana.
9. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma enzima modificada destinatária de um herbicida e que tenha com esse herbicida uma afinidade menor do que a enzima destinatária não modificada.
10. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma proteína ou um polipeptido seleccionado(a) entre o grupo constituído por uma 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase modificada enquanto alvo para o herbicida glifosato e por uma glutamina-sintetase modificada enquanto alvo para um inibidor da glutamina-sintetase, incluindo a fosfinotricina.
11. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma proteína ou um polipeptido que inibe ou neutraliza a actividade de um herbicida.

12. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador codificar uma proteína ou um polipeptido que confere resistência a um inibidor da glutamina-sintetase, incluindo a fosfinotricina.
13. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o referido ADN marcador ser um gene *sfr* ou *sfrv*.
14. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 6 a 13, caracterizado pelo facto de o referido segundo promotor ser um promotor constitutivo, um promotor induzível em lesões, um promotor que dirige a expressão selectivamente em tecidos vegetais que possuam actividade de fotossíntese, ou um promotor que dirige a expressão do gene selectivamente em células de folhas, em células de pétalas ou em células de sementes.
15. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de o referido segundo promotor ser um promotor 35S, um promotor 35S3, um promotor Pnos, um promotor TR1' ou TR2' ou um promotor SSU.
16. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo facto de compreender também:
 - (e) um primeiro ADN que codifica um péptido de trânsito capaz de transportar o referido inibidor para dentro de um cloroplasto ou mitocôndrio das referidas células dos estames; em que o referido primeiro ADN está na mesma unidade transcricional do referido ADN restaurador e do referido primeiro promotor e entre esse ADN restaurador e esse primeiro promotor; e/ou

- (f) um segundo ADN que codifica um péptido de trânsito capaz de transportar a referida proteína marcadora ou o referido polipeptido marcador para dentro de um cloroplasto ou mitocôndrio pelo menos desse tecido específico ou dessas células específicas, em que o referido segundo ADN está na mesma unidade transcricional do referido ADN marcador e do referido segundo promotor e entre esse ADN marcador e esse segundo promotor.
17. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor ser um promotor constitutivo.
18. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão pelo menos nas células do órgão masculino de uma planta.
19. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão selectivamente nas células dos estames de uma planta.
20. ADN recombinante de acordo com as reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células de estames seleccionadas entre o grupo constituído por células das anteras, do pólen e dos filamentos.

21. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão em células das anteras.
22. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor ser um promotor de um gene endógeno de uma planta, seleccionado entre o grupo constituído pelo gene TA29 do tabaco, pelo gene TA26 do tabaco, pelo gene TA13 do tabaco, um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA29, um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA13 e um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA26.
23. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor ser o promotor TA29 contido no fragmento NcoI-HindIII do plasmido pMB3, DSM 4470.
24. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão pelo menos em células do órgão feminino de uma planta.
25. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão selectivamente em células dos órgãos femininos de uma planta.
26. ADN recombinante de acordo com as reivindicações 24 ou 25, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor dirigir a expressão em um ou em vários tipos

de células do órgão feminino, seleccionadas entre o grupo constituído por células dos ovários, dos óvulos, dos estiletes, dos estigmas ou do septo.

27. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor ser um promotor que dirige a expressão em células dos estiletes e/ou dos estigmas, tal como o promotor do gene STGM4B12 endógeno do tabaco, o gene STGM3C9 endógeno do tabaco, o promotor do gene STGM07 endógeno do tabaco ou o promotor do gene STGM08 endógeno do tabaco.
28. ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo facto de ser ADN nuclear de uma célula de uma planta ou de uma semente.
29. ADN recombinante de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo facto de conter também um ADN que codifica a referida ribonuclease.
30. Célula de uma planta, caracterizada pelo facto de conter o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 29.
31. Célula de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo facto de poder ser regenerada numa planta.
32. Planta, caracterizada pelo facto de conter o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 29.

A7

33. Planta, caracterizada pelo facto de conter o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 29 em todas as suas células.
34. Semente de uma planta, caracterizada pelo facto de conter o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 29.
35. Semente de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo facto de ser uma semente híbrida
36. Planta, caracterizada pelo facto de conter integrado no ADN nuclear de todas as suas células o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 a 23 e a qual é capaz, quando cruzada com uma segunda planta que contenha um segundo ADN recombinante que inclua um ADN da esterilidade que codifique a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor da esterilidade que dirija a expressão selectivamente em células específicas dos estames da referida segunda planta e que possua esterilidade masculina devida à produção selectiva da referida ribonuclease nas referidas células específicas dos estames, de produzir plantas de progenia de fertilidade masculina que produzam essa ribonuclease e esse inibidor da referida ribonuclease nessas células específicas dos estames.
37. Planta de acordo com a reivindicação 36, caracterizada pelo facto de ser homozigótica em relação ao referido ADN recombinante.
38. Planta, caracterizada pelo facto de conter integrados no ADN nuclear de todas as suas células:

- a) o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 a 23 e
- b) um segundo ADN recombinante que inclua um ADN da esterilidade que codifique a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor da esterilidade que dirija a expressão selectivamente nas células específicas dos estames dessa planta,

e a qual possua fertilidade masculina devida à neutralização da actividade da referida ribonuclease nessas células específicas dos estames por meio de referido inibidor produzido pela expressão desse ADN restaurador pelo menos nessas células específicas dos estames.

- 39. Planta de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo facto de ser uma planta híbrida.
- 40. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 36 a 39, caracterizada pelo facto de a referida ribonuclease ser uma barnase e o referido ADN restaurador codificar barstar ou uma sua variante capaz de neutralizar a actividade da barnase.
- 41. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 36 a 40, caracterizada pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células de estames, seleccionadas entre o grupo constituído por células das anteras, do pólen e de filamentos.
- 42. Planta de acordo com a reivindicação 41, caracterizada pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células de estames, seleccionadas entre o grupo constituído por células epidermais do tapetum e das anteras.

43. Planta de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo facto de o referido promotor da esterilidade ser um promotor proveniente de um gene endógeno da planta, seleccionado entre o grupo constituído pelo gene TA29 do tabaco, o gene TA26 do tabaco, o gene TA13 do tabaco, um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA29, um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA13 e um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA26.
44. Planta de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo facto de o referido promotor da esterilidade ser o promotor TA29 contido no fragmento NcoI-HindIII do plasmido pMB3, DSM 4470.
45. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 36 a 44, caracterizada pelo facto de o referido primeiro promotor e o referido promotor da esterilidade serem o mesmo.
46. Par de plantas progenitoras para a produção de sementes, caracterizado pelo facto de ser constituído por:
- a) uma planta progenitora com esterilidade masculina que contém incorporado no genoma nuclear de todas as suas células um segundo ADN recombinante que inclui um ADN da esterilidade que codifica a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor da esterilidade que dirige a expressão do referido ADN da esterilidade selectivamente nas células específicas dos estames da referida planta e
 - b) uma planta progenitora com fertilidade masculina que contém incorporado no ADN nuclear de todas as suas células um ADN recombinante de acordo com

uma qualquer das reivindicações 17 a 23, em que o referido primeiro promotor dirige a expressão pelo menos nas mesmas células específicas dos estames que o referido promotor da esterilidade;

e de a referida planta com esterilidade masculina e a referida planta com fertilidade feminina poderem ser cruzadas para produzirem uma progenia com fertilidade masculina que inclua o referido ADN recombinante e o referido segundo ADN recombinante.

47. Par de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo facto de a referida ribonuclease ser a barnase e o referido ADN restaurador codificar barstar ou uma sua variante capaz de neutralizar a actividade da barnase.
48. Par de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizado pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células de estames, seleccionadas entre o grupo constituído por células de anteras, de pólen e de filamentos.
49. Par de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células de estames, seleccionadas entre o grupo constituído por células epidermais do tapetum e das anteras.
50. Par de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo facto de o referido promotor da esterilidade ser um promotor proveniente de um gene endógeno da planta, seleccionado entre o grupo constituído pelo gene TA29 do tabaco, o gene TA26 do tabaco, o gene TA13 do tabaco, um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA29, um

A-7

gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA13 e um gene que codifica um ARNm hibridizável para o referido gene TA26.

51. Par de acordo com a reivindicação 50, caracterizado pelo facto de o referido promotor da esterilidade ser o promotor TA29 contido no fragmento NcoI-HindIII do plasmido pMB3, DSM 4470.
52. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 46 a 51, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor e o referido promotor da esterilidade serem o mesmo.
53. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 46 a 52, caracterizado pelo facto de a referida planta progenitora com fertilidade masculina ser homozigótica em relação ao referido ADN recombinante.
54. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 46 a 53, caracterizado pelo facto de a referida planta progenitora com fertilidade masculina e a referida planta progenitora com esterilidade masculina serem diferentes e as referidas sementes serem sementes híbridas.
55. Processo para a produção de uma planta transgénica ou do seu material de reprodução ou das plantas da sua progenia, caracterizado pelos passos seguintes:
 - a) transformação de uma célula inicial de uma planta com o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 27 para se produzir uma célula vegetal transformada que contém o referido ADN recombinante estavelmente incorporado no seu ADN nuclear;

- b) regeneração da referida planta transgénica a partir dessa célula transformada e facultativamente
 - c) propagação dessa planta transgénica para se obter o referido material de reprodução ou as plantas da sua progenia que contenham o referido ADN recombinante.
- 56.** Planta, caracterizada pelo facto de conter integrado no ADN nuclear de todas as suas células o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 ou 24 a 27 e a qual é capaz, ao ser cruzada com uma segunda planta que contenha um segundo ADN recombinante que inclua um ADN da esterilidade que codifique a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor que dirija a expressão selectivamente nas células específicas do órgão feminino da referida segunda planta e a qual possua esterilidade feminina devida à produção selectiva dessa ribonuclease nas referidas células específicas, de produzir plantas de progenia com fertilidade feminina que produzam essa ribonuclease e esse inibidor da referida ribonuclease nessas células específicas.
- 57.** Planta de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo facto de ser homozigótica em relação ao referido ADN recombinante.
- 58.** Planta, caracterizada pelo facto de conter integrado dentro do ADN nuclear de todas as suas células:
- a) o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 ou 24 a 27 e
 - b) um segundo ADN recombinante que inclua um ADN da esterilidade que codifique a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor da esterilidade que dirija a expressão selectivamente nas células específicas do órgão feminino da referida planta,

e a qual possua fertilidade feminina devida à neutralização da actividade dessa ribonuclease nas referidas células específicas por meio do referido inibidor produzido pela expressão desse ADN restaurador pelo menos nessas células específicas.

59. Planta de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo facto de ser uma planta híbrida.
60. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 56 a 59, caracterizada pelo facto de a referida ribonuclease ser a barnase e o referido ADN restaurador codificar barstar ou uma sua variante capaz de neutralizar a actividade da barnase.
61. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 56 a 60, caracterizada pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células seleccionadas entre o grupo constituído por células dos ovários, dos óvulos, dos estiletes, dos estigmas e do septo.
62. Planta de acordo com a reivindicação 61, caracterizada pelo facto de o referido primeiro promotor ser um promotor que dirige a expressão nas células dos estiletes e/ou dos estigmas, tal como o promotor do gene STGM4B12 endógeno do tabaco, o gene STGM3C9 endógeno do tabaco, o promotor do gene STGM07 endógeno do tabaco ou o promotor do gene STGM08 endógeno do tabaco.
63. Planta de acordo com uma qualquer das reivindicações 56 a 62, caracterizada pelo facto de o referido primeiro promotor e o referido promotor da esterilidade serem o mesmo.

64. Par de plantas progenitoras para a produção de sementes, caracterizado pelo facto de ser constituído por:
- a) uma planta progenitora com esterilidade feminina que contém incorporado no genoma nuclear de todas as suas células um segundo ADN recombinante que inclui um ADN da esterilidade que codifica a referida ribonuclease sob o controlo de um promotor da esterilidade que dirige a expressão do referido ADN da esterilidade selectivamente em células específicas do órgão feminino da referida planta, e
 - b) uma planta progenitora com fertilidade feminina que contém incorporado no ADN nuclear de todas as suas células o ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 17 ou 24 a 27 em que o referido primeiro promotor dirige a expressão pelo menos nas mesmas células específicas do órgão feminino que o referido promotor da esterilidade;
- e de a referida planta com esterilidade feminina e a referida planta com fertilidade feminina poderem ser cruzadas para produzirem uma progenia com fertilidade feminina que inclui o referido ADN recombinante e o referido segundo ADN recombinante.
65. Par de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo facto de a referida ribonuclease ser a barnase e o referido ADN restaurador codificar barstar ou uma sua variante capaz de neutralizar a actividade da barnase.
66. Par de acordo com a reivindicação 64 ou 65, caracterizado pelo facto de o referido promotor da esterilidade dirigir a expressão em um ou em vários tipos de células seleccionadas entre o grupo constituído por células dos ovários, dos óvulos, dos estiletes, dos estigmas e do septo.

67. Par de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor ser um promotor que dirige a expressão nas células dos estiletes e/ou dos estigmas, tal como o promotor do gene STGM4B12 endógeno do tabaco, o gene STGM3C9 endógeno do tabaco, o promotor do gene STGM07 endógeno do tabaco ou o promotor do gene STGM08 endógeno do tabaco.
68. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 64 a 67, caracterizado pelo facto de o referido primeiro promotor e o referido promotor da esterilidade serem o mesmo.
69. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 64 a 68, caracterizado pelo facto de a referida planta progenitora com fertilidade feminina ser homozigótica em relação ao referido ADN recombinante.
70. Par de acordo com uma qualquer das reivindicações 64 a 69, caracterizado pelo facto de a referida planta progenitora com fertilidade feminina e a referida planta progenitora com esterilidade feminina provirem de linhagens diferentes e as referidas sementes serem sementes híbridas.
71. Utilização do ADN recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 28, caracterizada pelo facto de permitir a produção de um inibidor de uma ribonuclease pelo menos em células específicas de uma flor, de uma semente e/ou de um embrião de uma planta.

72. Utilização de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo facto de permitir a neutralização da actividade da referida ribonuclease produzida pelo menos nas referidas células específicas.

Lisboa, 13 de Agosto de 1996

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Artur L. D. Sousa

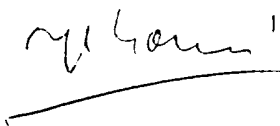
R E S U M O

"PLANTAS COM FLORES MODIFICADAS"

A invenção refere-se a uma planta cujo genoma nuclear é transformado graças a uma sequência de ADN estranho que codifica um produto que neutraliza a actividade de um outro produto que interrompe o metabolismo, o funcionamento e/ou desenvolvimento das células das flores da planta, particularmente das células dos órgãos reprodutivos, ou das células da semente ou das células dos embriões. A sequência de ADN estranho também pode codificar opcionalmente a estrutura de um marcador.

Lisboa, 10 de Agosto de 1990

C. Agente Oficial do P. G. A. da Comissão Europeia



A circular map of the pTVE74 plasmid. The map is a circle with a central label 'pTVE74'. The outer edge of the circle is marked with restriction sites: EcoRV, RsrII, BstXI, PstI, SmaI, XbaI, SpeI, StuI, SfiI, and SalI. The inner edge of the circle is marked with gene locations: pvr, ori, pssu, nos, barst, pta29, pnos, neo, ocs, neo, lib, ocs, neo, psm/sp, and pvt ori. The map is divided into segments by these sites, with labels indicating the size of each segment in base pairs: 18000, 15000, 12000, 9000, 6000, and 3000. The origin of replication (ori) is located at the 0 position.

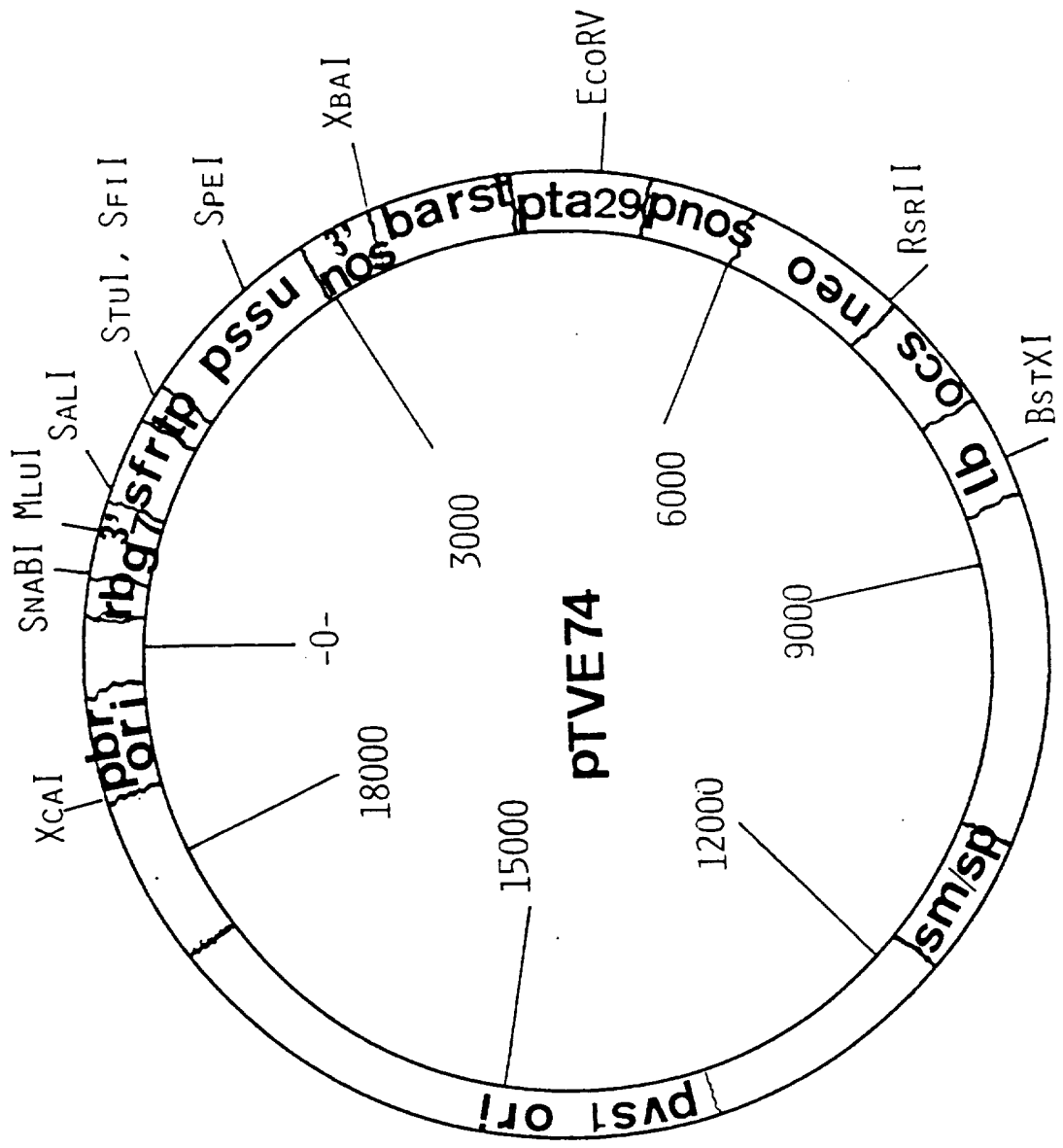


Fig. 2

↓
 ATCG
 GGAGCCGCAC ATGAAAAAAG CAGTCATTAA CCGGGAACAA ATCAGAAAGTA TCAGCGACCT CCACCCAGACA
 80 90 100 110 120 130 140
 TTGAAAAAGG AGCTTGCCCT TCCGGAATAC TACGGTGAAA ACCTGGACGC TTTATGGGAT TGTCTGACCG
 150 160 170 180 190 200 210
 GATGGGTGGA GTACCCGCTC GTTTTGAAT GGAGGCAGTT TGAACAAAGC AAGCAGCTGA CTGAAAAATGG
 220 230 240 250 260 270 280
 CGCCGAGAGT GTGCTTCAGG TTTTCCGTGA AGCGAAAGCG GAAGGCTGCG ACATCACCAT CATACTTTCT
 290 300 310 320 330 340
 TAATACGATC AATGGGAGAT GAACAATATG GAAACACAAA CCCGCAAGCT TGGTCTAGAG

FIG.3

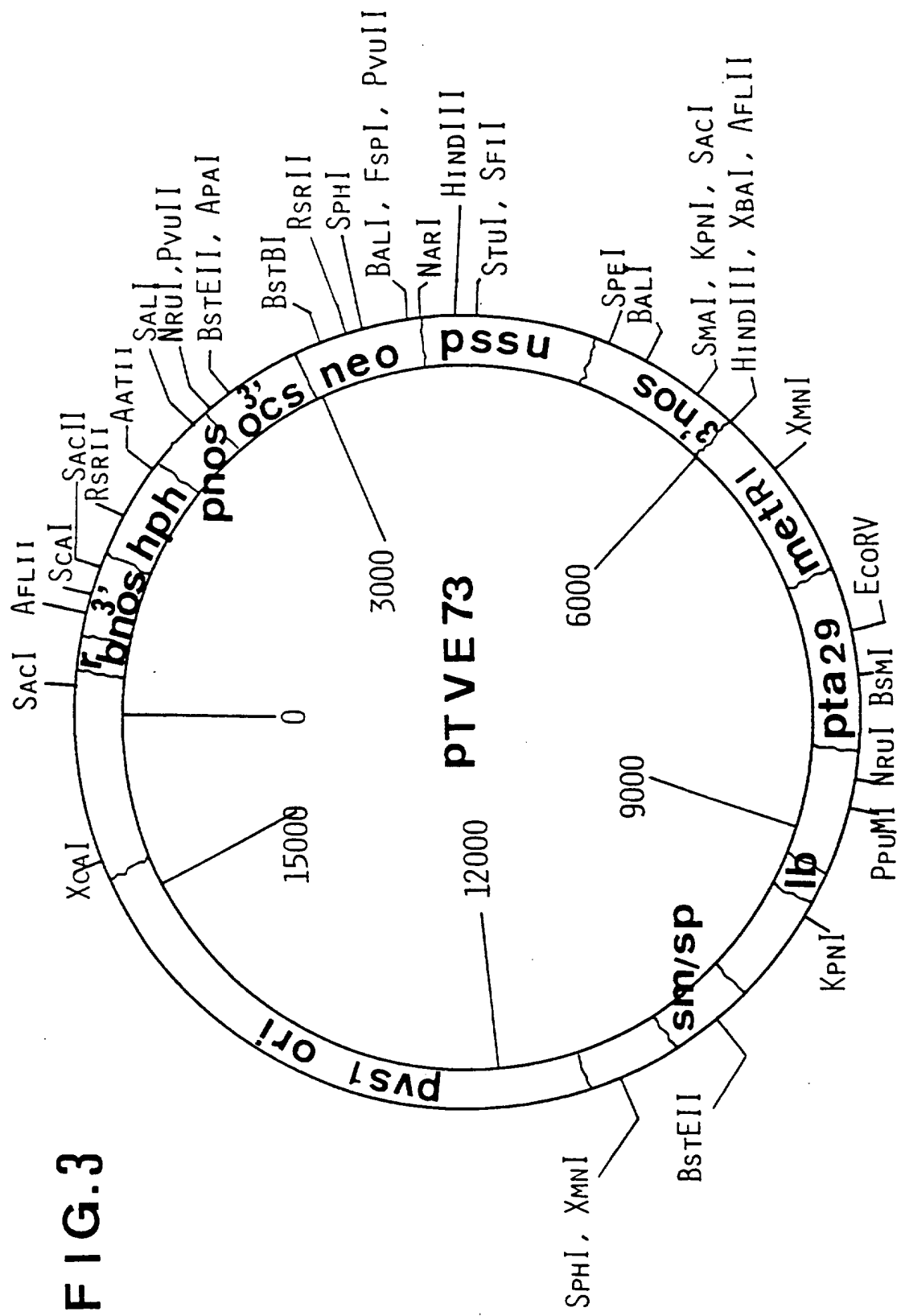


FIG.4

