



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

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

(21) Nr. cerere: 93-00376

(22) Data de depozit: 20.09.1991

(30) Prioritate: 21.09.1990 FR 90/11670;

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.09.1999 BOPI nr. 9/1999

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

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. FR 91 / 00741 20.09.1991

(87) Publicare internațională:
Nr. WO 92/05251 02.04.1992

(56) Documente din stadiul tehnicii:
Pelletier G. et al., *Molecular & General Genetics*, vol. 191, 1983, pag. 244...250,
Chetrit P. et al., *Theor. Appl. Genet.*, vol. 69,
1985, pag. 361...366, Vedel F. et al., *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 25, nr. 3, 1987, pag. 249...257, Makaroff C. A. et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, nr. 20, 1989, pag. 11706...11713

(71) Solicitant: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, PARIS, FR;

(73) Titular: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, PARIS, FR;

(72) Inventatori: BONHOMME SANDRINE, PARIS, FR; BUDAR FRANCOISE, LIMOURS, FR;

(74) Mandatar: ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

(54) **SECVENȚĂ DNA CARE CONFERĂ STERILITATE
CITOPLASMATICĂ MASCULINĂ, GENOM NUCLEAR SAU
MITOCONDRIAL, MITOCONDRIE, CITOPLASMĂ ȘI PLANTĂ CARE
CONȚIN NUMITA SECVENȚĂ ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A UNEI
PLANTE HIBRIDE CU AJUTORUL ACESTEIA**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o secvență DNA care conferă sterilitate citoplasmatică masculină, care este purtată de către o secvență DNA cu o însușire de nucleotide caracteristică sau posedă o omologie de cel puțin 50% cu secvența menționată. Invenția se referă și la un genom recombinat de plantă, nuclear sau mitocondrial care conține o secvență DNA de sterilitate Ogura, care este purtată de către o secvență definită mai sus. Un alt obiect al invenției este o mitocondrie care conține un genom definit mai sus. Un alt obiect al invenției este o citoplasmă cu un genom mitocondrial, definit mai sus. Invenția se referă și la o plantă care aparține genului *Brassicae* care conține cloro-

plaste de *Brassicae* care sunt compatibile cu genomul nuclear al numitei plante și mitocondrii definite mai sus. Invenția se referă și la un procedeu de obținere a unei plante hibride, care constă în aceea că, o plantă care posedă caracterul de sterilitate masculină citoplasmatică, definită mai sus, este încrucișată cu o plantă din aceeași specie care posedă eventual, o genă Rfl care restaurează fertilitatea. Prin aplicarea invenției, se obține avantajul că se pot identifica și selecționa plante de *Brassicae*, care poartă gene de sterilitate și care nu au fragmente de genomuri incompatibile, cu o bună comportare agronomică.

Revendicări: 17
Figuri: 6

RO 114978 B1



Prezenta invenție se referă la o secvență DNA care conferă sterilitate citoplasmatică masculină, genom nuclear sau mitocondrial, mitocondrie, citoplasmă și plantă, care conțin numita secvență, și la un procedeu de obținere a unei plante hibride cu ajutorul acesteia, folositoare pentru dezvoltarea varietăților hibride ale speciilor cu importanță agronomică.

Ea se referă în special la o plantă care aparține familiei *Cruciferae*, în care citoplasma celulelor conține organite care posedă secvențe nucleotidice, care conferă o androsterilitate și caracteristici agronomice bune.

Dezvoltarea varietăților hibride poate fi facilitată sau făcută posibilă prin utilizarea unui sistem de androsterilitate citoplasmatică. Hibrizii sunt obținuți prin fertilizare încrucișată între două populații parentale, una jucând rolul masculin și alta rolul feminin. Unul dintre obstacolele întâlnite atunci când se dorește obținerea varietăților hibride de calitate uniformă prin încrucișare sexuată pe specii autogame este capacitatea plantei de a se autopoleniza. Sistemele de androsterilitate permit obținerea de plante femele incapabile de autofertilizare și de la care, după polenizare, semințele care toate sunt hibride, pot fi recoltate direct fără a recurge la tehnici laborioase, cum ar fi, castrarea florilor.

Determinanții genetici ai androsterilității îi includ pe cei care sunt cuprinși în citoplasmă. La fiecare generație produsă sexuat ei sînt transmiși exclusiv de către mamă. Se obține astfel 100% androsterilitate la fiecare generație cu un sistem de androsterilitate citoplasmatică. Acești determinanți genetici sunt conținuți în genomul mitocondriilor.

Un sistem adecvat de androsterilitate citoplasmatică (CMS) la *Cruciferae* se definește prin următoarele caracteristici:

1). Androsterilitatea trebuie să fie totală, altfel spus, nu trebuie să se producă polen indiferent de condițiile de cultură și indiferent de linia care se dorește a fi utilizată ca părinte femel. În caz contrar, semințele recoltate de la aceste plante femele vor proveni parțial prin autofecundare și deci nu vor fi de tipul hibrid F1.

2) Producerea acestor semințe trebuie să fie realizată ținînd cont de avantajul vectorilor naturali ai polenului, cum ar fi în cazul acestor specii, *Hymenopterae*, *Dipterae* și vînt. Polenul trebuie să fie transportat de la plantele polenizatoare la plantele androsterile (femele). De fapt, la *Cruciferae* numai insectele pot asigura acest transport la distanță. Plantele femele trebuie prin urmare să fie suficient de atractive pentru insectele care vin și colectează nectarul de la ele. Morfologia florilor trebuie să oblige insecta să realizeze această colectare plecînd dinspre vârful florii astfel încât, în principal, toracele său să vină în contact cu stigmatetele. Practic, aceasta înseamnă că baza petalelor trebuie să formeze un fel de tub în jurul bazei pistilului.

3). Morfologia organelor femele (pistil) trebuie să fie identică cu cea a unei plante fertile, în special un singur pistil pe floare și de formă rectilinie.

Într-adevăr, sterilitățile masculine rezultă adesea, de asemenea, printr-o feminizare a anterelor care se transformă în pseudopistile și chiar prin transformarea nectarilor în flori complete. Uneori, pistilul sau pistilele astfel produse sunt de asemenea deformate. Toate aceste aberații nu permit o producție bună de semințe și aceasta se poate considera ca echivalentă unui oarecare grad de sterilitate feminină.

4). Pentru producerea de varietăți hibride F1 la speciile de la care se recoltează semințele, ca rapița sau muștarul de câmp, este esențial ca părintele mascul al hibridului să anuleze complet efectul androsterilității citoplasmei, astfel încât plantele hibride să fie polenizate cu ușurință.

La *Cruciferae*, primul caz de androsterilitate citoplasmatică sau CMS a fost

- descriș de către Ogura (1968) la ridiche (*Raphanus sativus*). Bannerot (1974, 1977) a transferat citoplasma Ogura la *Brassicae* obținând astfel plante care posedă androsterilitate ciplasmatică. Acest fel de plante nu prezintă caracteristici agronomice satisfăcătoare (cloroze la temperaturi mai scăzute, fertilitate feminină săracă) rezultând recolte scăzute care le fac nepotrivite pentru uz comercial. 50
- La *Cruciferae*, pentru a evita această cloroză, trebuie să se combine în aceeași celulă genomi nucleari și de la cloroplast ai unuia și aceluiași gen. Astfel, plantele de *Brassica* care posedă genomi ai unui cloroplast de *Brassicae* nu prezintă o cloroză mai îndelungată. Dacă ele posedă întregul genom mitocondrial Ogura, ele prezintă androsterilitate citoplasmatică totală dar, totuși, florile vor avea o morfologie aberantă care face imposibilă polenizarea lor prin vectorii naturali. 55
- Mai mult, pentru speciile la care interesul este în legătură cu semințele, este necesar să se refacă fertilitatea masculină a varietăților hibride care urmează să se comercializeze prin intermediul genelor nucleare cunoscute ce gene restauratoare. 60
- Este dificil să se refacă fertilitatea masculină a plantei care posedă întregul genom mitocondrial Ogura deoarece este necesar să se facă să intervină aproape simultan mai multe gene de restaurare. 65
- Problema pe care o rezolvă invenția de față este obținerea unui sistem adecvat de sterilitate masculină, prin eliminarea genelor responsabile pentru caracterele nedorite ale citoplasmei Ogura, menținând o sterilitate masculină care este eficientă și ușor de restaurat. 70
- Astfel, prezenta invenție se referă la o secvență DNA care conferă sterilitate citoplasmatică masculină, care este purtată de către o secvență DNA cu o înșiruire de nucleotide caracteristică, sau posedă o omologie de cel puțin 50% cu secvența menționată.
- Invenția se referă și la un genom recombinat de plantă, nuclear sau mitocondrial, care conține o secvență DNA de sterilitate Ogura, care este purtată de către o secvență definită mai sus. 75
- Un alt obiect al invenției este o mitocondrie care conține un genom definit mai sus.
- Un alt obiect al invenției este o citoplasmă cu un genom mitocondrial definit mai sus. 80
- Invenția se referă și la o plantă care aparține genului *Brassicae* care conține cloroplaste de *Brassicae*, care sunt compatibile cu genomul nuclear al numitei plante și mitocondrii definite mai sus.
- Invenția se referă și la un procedeu de obținere a unei plante hibride, care constă în aceea că, o plantă care posedă caracterul de sterilitate masculină citoplasmatică definită mai sus este încrucișată cu o plantă din aceeași specie care posedă, eventual, o genă Rfl care restaurează fertilitatea. 85
- Prin aplicarea invenției se obține avantajul că se pot identifica și selecționa plante de *Brassica* care poartă gene de sterilitate și care nu au fragmente de genomuri incompatibile, cu o bună comportare agronomică. 90
- În cele ce urmează, se vor face referiri la fi g. 1...6, care reprezintă:
- fig. 1, secvență nucleotidică a fragmentului DNA mitocondrial Ogura al ridichii care poartă caracterul CMS;
 - fig. 2, harta de restricție a fragmentului DNA mitocondrial descriș în fig. 1;
 - fig. 3, electroforeza DNA-ului mitocondrial după digestie cu BglI(3a) și NruI(3b);
- Benzile arată corespondența la o hibridizare cu o sondă CoxI. (Hiesell et al. 1987); 95

- fig.4, electroforeza DNA-ului mitocondrial după digestie cu Sall; Benzile indică corespondența la o hibridizare cu o sondă delimitată prin nucleotidele 389 și 1199 a secvenței descrise în fig. 1;

- fig.5, fructe produse prin plante de varză care poartă diferiți genomi citoplasmatici;

- fig.6, electroforeza RNA-ului mitocondrial. Benzile arată corespondența la o hibridizare cu o sondă, fragment EcoRI-BamHI, care include o porțiune a secvenței numite ORF B.

Secvența DNA de sterilitate Ogura este definită în legătură cu secvența delimitată prin numerele 1 și 2428 din fig.1. Ea este realizată prin transcrierea unei secvențe ale cărei terminații 3' și 5' sunt legate printr-o linie întreruptă în fig.2 și care se observă numai în plantele mascul-sterile. ORF B corespunde la un cadru de citire deschis; această denumire a fost dată pe baza observării homologiei cu o secvență descrisă de Brennicke. În fig.2, secvența care corespunde la una din cele două gene ARN pentru transferul formilmetioninei este prezentată hașurat.

Secvența DNA delimitată prin nucleotidele numerotate 928 și 2273 pe fig. 1 corespund unui transcript care poate fi vizualizat prin hibridizare moleculară (1,4), cum se vede în fig. 6. Pe această fig.6, fiecare scobitură corespunde la o plantă fertilă (F) sau la o plantă mascul-sterilă (S). Numai plantele mascul-sterile sintetizează un transcript de aproape 1400 baze. Acest transcript începe la poziția 928 (± 10 baze) ale secvenței din fig. 1 și se termină la poziția 2273 (± 5) (inițierea și terminarea transcripției pot avea loc la diferite poziții din mitocondriile vegetale).

De preferință, prezenta invenție se referă la o citoplasmă care conține o secvență DNA care posedă o homologie de cel puțin 50% cu secvența delimitată prin nucleotidele 928 și 2273 din fig.1, care conferă caracterul CMS, sau o citoplasmă care conține o secvență DNA care posedă o homologie de cel puțin 50% cu secvența delimitată prin nucleotidele 928 și 1569 din fig.1 și transcrisă de RNA care conferă caracterul CMS și caracterizată prin aceea că ea:

- conține cloroplaste ale aceleiași specii ca genomul nuclear sau al altei specii, dar care este compatibil cu acest genom nuclear;

- nu conține în întregime sau parțial, unul sau altul (sau ambele) fragment(e) ale genomului mitocondrial Ogura definit mai jos:

- poartă una sau două gene RNA de transfer ale formil metioninei folosită pentru inițierea translației;

- poartă gena Cox1, care codifică pentru subunitatea nr. 1 a citocrom-oxidazei.

Absența acestor fragmente, numite "secvențe indezirabile", este necesară pentru a obține genomi mitocondriali care corespund unei sterilități masculine de bună calitate corespunzătoare celor patru caracteristici definite mai sus.

Conform altor aspecte ale sale, invenția se referă la un genom recombinat nuclear sau mitocondrial de plantă, caracterizat prin aceea că el conține o secvență DNA de sterilitate Ogura:

a) care este purtată de o secvență DNA delimitată de nucleotidele 928 și 2273 ale secvenței arătate în fig. 1, sau

b) care posedă o homologie de cel puțin 50% cu numita secvență menționată în a),

și conferă, atunci când este prezentă în citoplasma unei plante o sterilitate citoplasmatică masculină asupra numitei plante.

În special, unul din subiectele prezentei invenții este un gemon recombinant nuclear sau mitocondrial de plantă, caracterizat prin aceea că el conține o secvență

DNA de sterilitate Ogura,

c) care este purtată de către o secvență delimitată de către nucleotidele numerotate 928 și 1569 din fig.1, sau

d) care prezintă o homologie de cel puțin 50% cu numita secvență menționată în c),

și conferă, atunci când este prezentă în citoplasma unei plante și este transcrisă de RNA, o androsterilitate citoplasmatică asupra numitei plante.

Un genom nuclear sau mitocondrial, conform invenției, poate fi caracterizat prin aceea că numitul genom recombinant mitocondrial este lipsit în totalitate sau parțial de fragmentele genomului Ogura:

- care poartă una din cele două gene ale RNA-ului de transfer al formil-metioninei folosite pentru inițierea translării,

- care poartă gena *cox1*, care codifică pentru subunitatea nr.1 a citocromoxidazei,

sau, în care numitele fragmente sunt inactive.

Mai specific, genomul mitocondrial, recombinant conform invenției, poate fi caracterizat:

1) prin aceea că este lipsit în totalitate sau parțial de un fragment de aproape 10,7 kb după digestie cu BglI sau de un fragment de aproape 11 kb după digestie cu NruI, fragmente care poartă gena *cox1*.

Aceasta este demonstrată, în special, în fig.3, prin hibridizare moleculară cu o sondă care poartă secvența *Cox1*.

2) prin aceea că este lipsită total sau parțial de un fragment de 5,1 kb după digestie cu Sall, sau de un fragment de aproape 15 kb după digestie cu NruI sau de un fragment de aproximativ 18,5 kb după digestie cu BglI, fragmente care poartă una din cele două gene RNA de transfer al formilmetioninei.

Aceasta este demonstrată, în special, în fig.4, prin hibridizare moleculară cu o sondă delimitată de către nucleotidele nr. 389 și 1199 ale secvenței descrise în fig.1.

În fig.3 și 4, genotipii desemnați corespund la plante care posedă un sistem adecvat de sterilitate citoplasmatică masculină.

GENOTIPI

CLOOPLASTE

MITOCONDRII

B.n

B.napus

B.napus

27

B.napus

B.napus/Ogura

OGU.

R.sativus (OGU)

R.sativus (OGU)

9,17,21,24,27c

B.oleracea

B.oleracea/Ogura

B.o.

B.oleracea

B.oleracea

Mai mult decât atât, existența unui caracter CMS de bună calitate necesită prezența unei secvențe DNA care poate fi identificată prin hibridizări DNA/DNA pe digestii. Astfel, prezenta invenție relatează despre o secvență DNA care a făcut posibilă definirea și care este caracterizată prin aceea că ea conține o secvență care dă după digestie cu NcoI un fragment de 25 kb, un fragment de 6,8 kb după digestie NruI și un fragment de 4,4 kb după digestie cu Sall.

Această secvență poate fi de asemenea identificată prin hibridizări asupra RNA-ului total al plantelor masculine sterile. Este pus în evidență un transcript de aproape 1400 perechi de baze. Este absentă din plante revenirea fertilității.

Definiția de secvențe de nucleotide "indezirabile" și secvențe de nucleotide

200 "indispensabile" pentru o sterilitate Ogura, conform invenției, face posibilă selecția unui material vegetal care poartă cloroplaste compatibile cu genomul nuclear și poartă mitocondrii de bună calitate, prin tehnici de hibridizare DNA binecunoscute specialiștilor din domeniu, fără a aștepta obținerea de plante adulte și apariția de flori și fructe. Un instrument de înaltă eficacitate pentru selectarea plantelor care posedă o citoplasmă androsterilă care au proprietăți agronomice bune este deci de acum încolo la dispoziția utilizatorilor.

205 Conform altui aspect al invenției, aceasta se referă la o mitocondrie caracterizată prin aceea că ea conține o secvență de nucleotide corespunzătoare unui DNA care prezintă o homologie de cel puțin 50%, cu secvența delimitată prin bazele numerotate 928 și 2273 din fig.1 și care codifică pentru androsterilitate citoplasmatică Ogura; sau alternativ, mitocondria conține o secvență DNA purtată de către secvența delimitată prin nucleotidele 928 și 1569 din fig.1, sau care posedă o homologie de 210 50% cu această secvență și care este transcrisă de RNA în mitocondriile plantelor masculin sterile. Acest DNA poate poseda, în plus, caracteristicile definite mai sus, în special absența secvențelor inddezirabile.

Prezenta invenție se referă de asemenea la o citoplasmă de *Cruciferae*, caracterizată prin aceea că ea conține o secvență DNA "de sterilitate Ogura"; această 215 citoplasmă conține, în plus, cloroplaste ale aceleiași specii sau ale unei alte specii, dar care sunt compatibile cu genomul nuclear.

Secvența de sterilitate Ogura este caracterizată prin aceea că:

a) ea este purtată de către secvența DNA de 2428 perechi de baze arătate în fig. 1,

220 b) ea este delimitată prin nucleotidele 928 și 2273 din fig.1 și corespunde transcriptului indicat prin linia întreruptă din fig.2 și vizualizată prin hibridizare moleculară (1, 4) din fig. 6,

c) ea posedă o homologie de cel puțin 50% cu numita secvență menționată în b) și conferă, atunci când este prezentă în genomul mitocondrial al unei plante o 225 androsterilitate citoplasmatică numitei plante, sau,

d) ea este purtată de către secvența delimitată prin nucleotidele 928 și 1569 din fig.1 și este transcrisă de RNA în mitocondriile plantelor sterile sau,

e) ea posedă o homologie de cel puțin 50% cu secvența descrisă în d) și este transcrisă de RNA în mitocondriile plantelor sterile.

230 Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o plantă a familiei *Cruciferae*, caracterizată prin aceea că ea conține cloroplaste și un nucleu al aceleiași specii sau care este compatibil, și mitocondrii purtătoare ale unui genom care conferă caracterul CMS, așa cum a fost definit mai sus.

235 Mai precis, prezenta invenție se referă de asemenea la o plantă care aparține genului *Brassica*, caracterizată prin aceea că ea conține cloroplaste, un nucleu de Brassica și mitocondrii care poartă un genom ce conferă coracterul CMS, așa cum a fost definit mai sus.

Acest genom mitocondrial trebuie de asemenea să poarte un număr de gene al speciei de *Brassica* în problemă. Aceasta este realizată prin recombinare între 240 genomul Ogura și genomul de *Brassica*.

În special, prezenta invenție se referă la o plantă care aparține speciei *Brassica napus*, caracterizată prin aceea că ea conține un nucleu de *Brassica* și prin aceea că citoplasma conține cloroplaste de la *Brassica* și mitocondrii mascul-sterile care conțin un DNA conform prezentei invenții, așa cum s-a definit mai sus; aceste mitocondrii 245 pot de asemenea să conțină cea mai mare parte a genelor mitocondriale de *Brassica*

RO 114978 B1

napus (185, Atp9, CoxII, ndhl, cob). *Brassica napus* corespunde la rapiță, sau Canola și Rutabaga.

Prezenta invenție se referă la o plantă din speciile *Brassica oleracea*, caracterizată prin aceea că ea conține un nucleu de *Brassica* și prin aceea că citoplasma conține cloroplaste de *Brassica* și mitocondrii care conțin o secvență de DNA care codifică pentru caracterul CMS, așa cum a fost definit. 250

Brassica oleracea acoperă diferite tipuri de varză; varză cu căpățână, de Bruxelles, napi, conopidă italiană, varză furajeră și conopidă.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o plantă a speciei *Brassica campestris*, caracterizată prin aceea că ea conține un nucleu de *Brassica* și prin aceea că citoplasma conține cloroplaste de *Brassica* care sunt compatibile cu un genom nuclear și mitocondrii care conțin un segment DNA ce codifică pentru caracterul CMS, așa cum a fost definit. 255

Brassica campestris corespunde la rapiță, nap turcesc, varză chinezească, de Pekin și japoneză. 260

În mod asemănător, prezenta invenție se referă la o plantă aleasă din grupul care cuprinde: *B. Juncea*, *B. nigra*, *B. hirta*, *B. carinata*, caracterizată prin aceea că ea conține un nucleu de *Brassica* și prin aceea că citoplasma conține cloroplaste de *Brassica* care sunt compatibile cu genomul nuclear și mitocondrii care conțin o secvență DNA care codifică pentru caracterul CMS, așa cum a fost definit. 265

Conform unui alt aspect al său, subiectul prezentei invenții este o plantă care aparține genului *Brassica* al cărei genom nuclear conține o secvență de sterilitate Ogura, așa cum a fost definit mai sus, precum și elementele care efectuează expresia și transportul produsului său de translație în mitocondrie. Această plantă poate aparține mai ales uneia dintre următoarele specii: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* și *B. carinata*. 270

Prezența "secvenței sterilității Ogura" este necesară și suficientă pentru a induce o absență totală a polenului în absența genelor de restaurare. Polenizarea acestor plante se efectuează normal ca urmare a unei producții bune de hectar.

Morfologia organelor femele este normală și fructele (silicvele) formate conțin un număr normal de semințe. Fig.5 arată morfologia observată la o plantă normală de control (z), o plantă care are morfologia aberantă care posedă întregul genom Ogura(z(6)) și cloroplaste de *Brassica oleracea*, o plantă de varză purtătoare a cloroplastelor de *Brassica napus* și mitocondrii mascul-sterile având gene de *Brassica napus* (z(A)), și plante purtătoare de cloroplaste de *Brassica oleracea* și mitocondrii recombinante care nu conțin deloc secvențele nedorite (z(9)) și (z(17)). Plantele au următoarele caracteristici: 275

GENOTIP	CLOPLASTE	MITOCONORII	
z	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i>	285
z(A)	<i>B. napus</i>	<i>B. napus</i> /Ogura	
z(6)	<i>B. oleracea</i>	Ogura	
z(9)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i> /Ogura	
z(17)	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i> /Ogura	

Genotipurile z(A) și z(6) nu prezintă un sistem citoplasmatic de sterilitate masculină adecvat. 290

Astfel de plante pot fi obținute, de exemplu, prin tehnica fuziunii de protoplaști sau prin oricare alte tehnici care efectuează o recombinare bună între genomul

RO 114978 B1

295 mitocondrial al speciilor în discuție și genomul mitocondrial Ogura. În astfel de plante, fertilitatea este restaurată printr-o genă unică de restaurare, numită Rf1, originară de la ridiche, ceea ce nu este cazul plantelor care posedă în întregime genomul mitocondrial inadecvat.

300 Astfel de plante se pot obține de asemenea prin reproducere sexuată naturală sau artificială.

Astfel de plante care posedă un genom mitocondrial conform invenției pot fi de asemenea obținute prin transfer de genă în mitocondrie.

În toate cazurile, aceste plante posedă un sistem CMS adecvat, și anume;

- o sterilitate masculină totală,
- 305 - o morfologie care permite o bună polenizare și o bună producție, cum este ilustrat în tabelul 1 și tabelul 2.

Astfel, prezenta invenție se referă, de asemenea, la un procedeu pentru obținerea de plante hibride, caracterizat prin aceea că, o plantă care posedă un caracter CMS adecvat, care conține secvența sterilității Ogura în genomul său nuclear sau mitocondrial, este încrucișată cu o plantă normală în cazul unei recolte comestibile sau furajere, sau cu o plantă care asigură o genă de restaurare a fertilității, Rf1, atunci când urmează să fie recoltate semințele. Ea se referă de asemenea la o plantă hibridă obținută prin această metodă.

310 În general vorbind, cele mai bune caracteristici agronomice sunt obținute cu plante având sterilitate masculină care posedă cloroplaste ale aceleiași specii ca nucleul și mitocondrii care prezintă un sistem de sterilitate masculină adecvată.

Tabelul 1 arată productivitatea unei linii de varză diferite citoplasme (genotipurile z9 sau z17 sunt adecvate). Tabelul 2 arată productivitatea unei linii de rapiță cu diferite tipuri de citoplasmă (sunt adecvate genotipurile Fu 27, Fu 58 și Fu 85).

320 Tabelul 1

Productivitatea liniei z (varză Saurkrant) cu diferite citoplasme

Citoplasmă		Genotipuri	Recoltă de semințe grame/plantă
Cloroplaste	Mitocondrii		
<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i>	(z)	53,1
martor fertil			
<i>B. napus</i>	Ogura	(zC)	0
<i>B. napus</i>	Ogura/ <i>napus</i>	(zA)	22,7
<i>B. oleracea</i>	Ogura	(z6)	9,3
Ogura	Ogura	(zO)	20,1
330 <i>B. Oleracea</i>	Ogura/ <i>oleracea</i>	(z9 sau z17)	91,8

Tabelul 2

Productivitatea liniei Darmor (rapiță de iarnă) cu diferite citoplasme

	Randament (% Darmor)	Cloroplaste	Mitocondrii
335 DARMOR	100 (35 qx)	<i>B. Napus</i>	<i>B. Napus</i>
Fu 27	118	<i>B. Napus</i>	<i>B. Napus/Ogura</i>

Tabelul 2 (continuare)

Fu 58	120	<i>B. Napus</i>	<i>B. Napus/Ogura</i>	340
Fu 77	96	<i>B. Campestris</i>	Ogura	
Fu 85	114	<i>B. Napus</i>	<i>B. Napus/Ogura</i>	
Fu 118	103	<i>B. Napus</i>	<i>B. Napus/Ogura</i>	
BIENVENUE	108			
JET NEUF	89			345

* Randament

· Rapită de iarnă DARMOR masculin-fertilă și masculin-sterilă (Fu)

Tabelul 2 (continuare) 350

Componentele randamentului (Clermont-Ferrand)

	NS	G1S	NSPS	NS	G1Sm	SUT	HI	RDT	HT	
DARMOR	7183	81,9	9,9	70028	4,31	1077	0,256	31,6	120	
BIENVENUE	7344	80,7	11,2	81841	3,88	1064	0,269	30,7	109	
JET NEUF	7977	87,7	8,6	67291	4,98	1176	0,262	33,3	115	355
Fu 27 DARMOR	9292	82,8	11,6	106188	4,09	1337	0,293	42,2	122	
Fu 58 DARMOR	8617	76,5	11,7	99947	3,65	1228	0,270	36,0	131	
Fu 118 DARMOR*	8389	84,6	11,0	92428	4,11	1243	0,276	38,1	132	

NS: Număr de silicve/m²; G1S: Greutatea unei silicve (mg);

NSPS: Număr de semințe/silicvă;

NS: Număr de semințe/m²;

G1Sm: Greutatea unei semințe (mg);

SUT: Substanță uscată totală (g/m²)

HI: Indice de recoltă (%);

RDT: Randament (gx/ha);

HT: Înălțime (cm).

* Aceste plante posedă adesea fructe (silicve) deformate

Subiectul prezentei invenții este de asemenea o sondă care conține o secvență de cel puțin 10 baze, și, de preferință, de 15 baze, ale unei secvențe cuprinsă între nucleotidele numerotate 928 și 1569 din fig. 1; numita sondă poate fi marcată, de exemplu, prin intermediul unei baze radioactive, sau prin orice alt mijloc, cum ar fi, de exemplu, fluorescența. Această sondă poate fi utilizată pentru punerea în evidență a sterilității masculine și poate fi utilizată, în special, în selectarea clonelor.

Exemplul 1. Evidențierea secvenței DNA responsabilă de sterilități citoplasmatică masculină Ogura

1. Planta

Prin "cibrid" se denumesc forme obținute prin fuziunea de protoplaști izolați, urmată de regenerarea întregii plante. Această metodă de obținere permite amestecul în celulă a informației citoplasmatică care provine de la ambii părinți. Cibridul nr. 13 a fost obținut dintre 820 plante regenerate prin fuziuni de protoplaști între un cibrid de *B. Napus* rezistent la triazină, Ogura cms (descendent al cibridului 77 descris de Pelletier et. al., 1985) și varietatea fertilă de origine Brutor, sensibilă la triazină. Un test de rezistență la triazină (Ducruet și Gasquez, 1978) realizat pe un

eșantion de frunză de la fiecare regenerat a permis să se determine tipul de cloroplast (cloroplaste rezistente la triazină provenită de la părintele 77 sau cloroplaste sensibile la triazină provenite de la linia Brutor).

S-au cultivat plantele și s-a observat stadiul de înflorire. S-au selectat ca cibrizi plantele care prezintă combinații non-parentale (fie sensibilă/masculin-sterile sau rezistentă/ masculin-fertile). Cibrizul 13 a fost de tipul sensibil/masculin-steril. Cibrizul 1 a fost de tipul rezistent/masculin-fertil.

2. Izolarea de acizi nucleici

A fost izolat DNA-ul total plecând de la frunze care provin de la plante de 4 săptămâni, conform metodei descrisă de Dellaporta (1983). DNA-ul mitocondrial a fost extras din frunze de la plante de 8 săptămâni, așa cum a fost descris de Vedel și Mathieu, 1982, cu următoarele variante:

Mitocondriile nu au fost purificate pe gradient de sucroză înainte de liză și liza s-a realizat în 4% sarcosil, cu 0,5 mg/ml proteinază K (Boehringer Mannheim GmbH), în 50 mM Tris pH=8, 20 mM EDTA. După precipitare, DNA-ul mitocondrial s-a purificat prin centrifugare pe un gradient bromură de etidiu/clorură de cesiu (metodă 1-Vedel și Mathieu 1982) în tuburi de centrifugare din polialomer.

RNA-ul total s-a izolat din frunze sau muguri floriali conform cu Logemann et al., 1987.

RNA-ul mitocondrial s-a extras din conopidă de 8 săptămâni, conform tehnicii Stern și Newton, 1986.

3. Analize prin restricție a DNA-ului mitocondrial și electroforeza în gel de agaroză

Acestea au fost realizate cum este descris de Pelletier și al., 1983. RNA-ul total sau mitocondrial s-a depus pe gelurile de electroforeză care conțin formaldehidă, cum a descris Sambrook și al., 1989.

4. Hibridizarea

Transferul DNA sau RNA pe filtre de nailon (Hybond-N, Amersham) s-a realizat prin adsorpție capilară cu 6 x SSC sau respectiv cu 10 x SSPE, urmând instrucțiunile fabricantului. Prehibridizarea și hibridizarea s-au realizat conform Amersham, folosind sonde marcate prin sistemul de marcăre multiprimer DNA (Amersham) după purificare pe coloane Sephadex G50 (Sambrook et al., 1989).

5. Clonarea DNA-ului mitocondrial

Două bănci genomice de linii cibrice masculin sterile (13-7) și revertante (13-6) s-au construit într-un vector fag lambda EMBL3, cultivat pe o sușă restrictivă de *E. coli* Nm539 (Frischauf et al., 1983). S-au obținut aproximativ $2,5 \times 10^4$ clone pe μ g de DNA mitocondrial.

Băncile de DNA mitocondrial au fost titrate și etalate în scopul izolării plăcilor care au fost transferate pe filtre de nailon cum s-a descris în Sambrook et al., 1989. Sonda de hibridizare utilizată pentru a sorta cele două bănci de DNA mitocondrial s-a preparat după cum urmează: fragmentul de DNA mitocondrial specific pentru CMS s-a eluat folosind procedura Gene clean™ (BIO 101 INC.), plecând de la un produs de digestie al unui DNA mitocondrial depus pe un gel de agaroză pregătitor. DNA-ul eluat a fost apoi marcat așa cum s-a descris.

Extracția de DNA Lambda, sub-clonarea fragmentului NcoI 2,5 în situsul NcoI al pTrc99A (Amann et al., 1988) și extracțiile de plasmidă DNA s-au realizat conform protocoalelor lui Sambrook et al., 1989. Plasmidele recombinante s-au introdus într-o sușă, de *E. coli* NM522 (Gough și Murray, 1983).

6. Studiul genetic al cibridului 13 și al descendenților lui

În prima generație de descendenți obținuți prin polenizarea cibridului 13 cu Brutor, compusă din 13 plante, 5 sunt total masculin-sterile (incluzând plantele 13-2 și 13-7), una este masculin-fertilă (nr. 13-C) și 7 sunt practic complet sterile cu câteva flori masculin-fertile. 435

Planta fertilă 13-6 a fost autopolenizată și încrucișată cu Brutor. În ambele cazuri s-au obținut doar plante fertile (43 și, respectiv, 42). 440

În încrucișările între planta masculin-sterilă 13-7 și Brutor, 24 descendenți sunt complet sterili și 6 posedă câteva flori fertile, un rezultat asemănător cu cel observat cu cibridul însuși. Planta 13-2 a fost încrucișată cu linia de restaurare RF care este heterozigotă pentru genele specifice de restaurare pentru sterilitatea masculină Ogura. (Chetrit et al., 1985). Descendența acestei încrucișări este alcătuită din 53 plante masculin-sterile, 37 plante masculin-fertile și 9 plante care sunt aproape sterile complet, deși ele posedă câteva flori sterile. Aceste rezultate sugerează că plantele masculin-sterile ale familiei cibridă 13 conțin daterminantul Ogura-cms asemenea altor cibrizi studiați anterior cu un profil de restaurare mai simplu (Chetrit et al., 1985). 445

La acest stadiu al studiului, pot fi luate în considerare două posibilități: fie cibridul 13 conține un amestec de genomuri mitocondriale "masculin-fertile" și "masculin-sterile" și există posibilitatea selectării în continuare pentru ambele fenotipuri, fie cibridul 13 conține un genom mitocondrial recombinant de structură instabilă, care revine la o configurație "fertilă" mai stabilă, și va fi imposibil să se mențină un fenotip masculin-steril omogen printre generațiile următoare. 450 455

Plantele masculin-sterile obținute plecând de la descendența plantei masculin-sterile 13-7 s-au dezvoltat simultan prin butași și încrucișare sexuată cu Brutor. După un număr variabil de generații (1 la 5) prin cele două metode, toate familiile au dat plante complet sterile. Din contră, plantele complet sterile obținute astfel, niciodată nu au mai dat plante sterile. 460

În lumina acestor rezultate, se poate considera că cea de a doua explicație propusă mai sus, cea care spune că cibridul 13 poartă un genom mitocondrial stabil care pierde daterminantul Ogura-cms în timpul procesului care conduce la o configurație "fertilă", fără posibilitatea de întoarcere la un fenotip steril, este cea corectă.

7. Comparație între DNA-urile mitocondriale ale urmașilor masculin-sterili și al revertanților fertili. Izolarea unui fragment specific de la plante masculin-sterile 465

DNA-ul mitocondrial s-a extras pornind de la frunzele descendenței masculin-sterile 13-7 și a revertanților fertili (descendența 13-6 sau 13-7), și s-au digerat cu câteva enzime de restricție în vederea comparării profilurilor de restricție. Genomii mitocondriali ai celor două tipuri sunt foarte asemănători, neputându-se observa nici o diferență între profilul de restricție al mitocondriilor masculin-sterile și al revertanților fertili folosind diferite enzime. Totuși, s-a detectat un fragment de restricție de 6,8 kb în profilul de restricție al DNA-ului mitocondrial al plantelor masculin-sterile digerat cu Nrul, și nu s-a observat niciodată în profilurile corespondente ale revertanților fertili. 470 475

Fragmentul (denumit N6,8) a fost eluat de pe un gel de agaroză, marcat și folosit ca sondă pe profilurile de restricție Nrul ale DNA-ului mitocondrial: s-a observat un semn mare la 6,8 kb în toată descendența masculin-sterilă a cibridului 13, în timp ce nici un fragment de această mărime nu s-a observat în genomii mitocondriali ai revertanților fertili hibridizați cu sonda. În plus, sonda N6,8 se hibridizează cu un fragment din DNA-ul mitocondrial Ogura digerat cu Nrul, dar nu în cel de *Napus cv.* 480

Brutor, care arată originea Ogura a acestui fragment.

485 O bancă lambda care conține extracte de DNA mitocondrial originale de la
 plantele masculin-sterile (13-7) s-a testat cu fragmentul eluat marcat, și în afară de
 8 clone care hibridizează, s-au izolat doi fagi recombinanți care conțin întregul frag-
 ment N6,8 și secvențele învecinate. S-a obținut o hartă de restricție detaliată a
 acestei regiuni. Hibridizarea profilurilor de restricție ale DNA-ului mitocondrial originar
 490 de la descendența fertilă și sterilă a cibridului 13 cu o sondă N6,8 a permis limitarea
 regiunii specifice pentru genotipul masculin-steril la un fragment NcoI de 2,5 kb.

Fragmentul NcoI de 2,5 kb s-a marcat și folosit ca sondă, respectând originea
 DNA-ului mitocondrial de la descendența 13-7 și 13-6 digerată cu NcoI. Dincolo de
 semnalul de la 2,5 kb care este specific pentru profilul masculin-steril, câteva frag-
 mente NcoI hibridizează simultan în profilurile revertantului fertil și masculin-steril;
 495 aceste fragmente sunt la 2,2, 10 și 14 kb. Un fragment NcoI de 2,7 kb hibridizează
 puternic în genomul mitocondrial al descendenței fertile și nu în cea a descendenței
 sterile. Analiza acestui profil de hibridizare conduce la concluzia că fragmentul NcoI
 de 2,5 kb, deși specific pentru DNA-ul mitocondrial masculin-steril, conține secvențe
 care sunt repetate în alte locuri în genomul mitocondrial (pe fragmentele 2,2-, 10- și
 500 14-kb după NcoI), și aceste secvențe repetate sunt prezente de asemenea în DNA-ul
 mitocondrial al revertanților fertili, în plus față de fragmentul specific de 2,7 kb.

RNA-ul total se extrage din frunze sau butași ai descendenților cibridului 13,
 sau ai cibridilor masculin-steril sau fertil (provenind de la alte experimente de fuziune)
 și de la linia Brutor. Bloturile Northern s-au realizat și hibridizat cu o sondă care cores-
 505 punde insertului clonei lambda care conține N6,8 descris în exemplul 3. S-a detectat
 un transcript de 1,4 kb în toți cibridii masculin-steril, incluzând cibridul 13-7, în timp
 ce nici un transcript nu s-a observat în linia Brutor sau în doi cibridi fertili (diferiți de
 13). Mai mult decât atât, plantele fertile posedă un transcript de 1,1 kb care hibri-
 dizează cu sonda, care este absent sau prezent la un nivel foarte scăzut în toți cibridii
 510 masculin-sterili testați. Câteva transcripte comune tuturor probelor hibridizează slab
 cu sonda datorită mărimii insertului marcat. Se confirmă că transcriptele mitocon-
 driaie pot fi detectate în probele RNA-ului total prin hibridizarea aceluiași blot Northern
 cu un fragment DNA care conține secvența genei atpa.

Același transcript specific de 1,4 kb s-a găsit în RNA-ul mitocondrial Ogura
 515 extras din conopide utilizând ca sondă fragmentul NcoI de 2,5 kb. Limitele exacte ale
 acestui transcript s-au determinat folosind ca sondă subclone ale fragmentului NcoI
 de 2,5 kb.

8. Studiul cibridului 1 și al descendenților săi

Cibridul 1 a fost masculin-fertil. În descendența sa, planta 1.12 a fost fertilă
 520 și planta 1.18 sterilă. Planta 1.12 a dat în descendența sa plante sterile (S_3) și plante
 fertile (RF_3). Planta 1.18 a dat plante sterile (S_2) și o ramură fertilă (RF_2). Plantele S_2
 și S_3 sunt restaurate prin aceeași genă nucleară care restaurează fertilitatea polenului
 ca cibridul steril 13.

Pe hibridizarea cu fragmentul marcat NcoI de 2,5 kb DNA-ul mitocondrial al
 525 plantelor S_2 și S_3 nu a dat un semnal la 2,5 kb pe digestia NcoI sau un semnal pe
 digestia NruI la 6,8 kb.

Asemănător, hibridizarea cu RNA-ul total (Northern) cu o sondă care
 corespunde secvenței ORFB nu a dat un semnal la 1,4 kb cum se întâlnește la hibridul
 steril 13. Din contră, o sondă care corespunde secvenței delimitată prin nucleotidele
 530 928 și 1569 din fig. 1 dă un semnal în Northern aproximativ 1,3 kb. Acest semnal
 este absent din RNA-ul planlor RF_1 , RF_2 , RF_3 sau Brutor. De asemenea, este posibil

să se folosească această secvență (928-1569) ca o sondă în dotblot de detaliu al RNA-ului total, și, în acest caz, exclusiv toate plantele masculin-sterile dau un semnal.

Aceste rezultate arată că plantele S2 și S3, deși masculin-sterile, nu au menținut secvența nucleotidică descrisă în fig. 1 în conformația sa originală și demonstrează că, în această secvență, porțiunea mărginită prin nucleotidele 928 și 1569 este cea care poartă determinantul specific "de sterilitate Ogura", care face plantele masculin-sterile când se transcrie această secvență. 535

Această secvență nu are o homologie semnificativă cu secvențele prezente în baza de date. 540

Exemplul 2. *Demonstrarea secvențelor nedorite în genomul mitocondrial Ogura*

S-a obținut o colecție de cibrizi din speciile *B.napus* prin fuziune de protoplaști între o rapiță purtătoare de citoplasmă Ogura și o rapiță normală. Prima este masculin-sterilă și deficientă de clorofilă la temperatură scăzută, însă mai târziu este verde normal și fertilă. Cibrizii au fost sortați dintre plantele regenerate și s-au reținut cele care erau masculin-sterile și verzi normal. 545

În același fel s-a obținut o colecție de cibrizi de la speciile *B.oleracea* prin fuziune de protoplaști între o varză purtătoare de citoplasmă Ogura și o varză normală. S-au reținut dintre plantele regenerate cibrizii care au fost masculin-sterili și verzi normal. 550

Acești cibrizi s-au încrucișat cu diferite varietăți de rapiță în primul caz și varză în cel de-al doilea. Încrucișările s-au repetat la fiecare generație cu aceleași varietăți, astfel să se obțină un genotip definit apropiat varietăți recurente.

Aceste diferite varietăți convertite astfel cu citoplasme ale diferiților cibrizi au fost supuse la teste agronomice pentru a măsura producția de semințe, care depinde de câțiva factori: o producție suficientă de nectar pentru a efectua polenizarea prin insecte și o morfologie florală normală, în scopul ca această polenizare să fie eficientă și fructele să se dezvolte normal. 555

Colecția de hibrizi poate fi astfel împărțită în două loturi:

- un lot de cibrizi care posedă o sterilitate masculină adecvată comercializării producției de semințe, 560

- un lot de cibrizi care nu posedă toate caracteristicile favorabile pentru o bună comercializare a semințelor. Cibrizii de rapiță nr. 27, 58 și 85 și cibrizii de varză nr. 9, 17, 21, 24, și 27c, de exemplu, aparțin primului lot.

Cibrizii de rapiță nr. 23s, 77 și 118 și cibrizii de varză nr. 1, 6 și 14, de exemplu, aparțin celui de-al doilea lot. 565

DNA-ul total al acestor cibrizi a fost supus digestiilor enzimatice cu Sall, NcoI, Nrul, BglI, PstI, KpnI. Bloturile Southern obținute s-au hibridizat cu diferite sonde mitocondriale Atpa, Cob, Cox1, Atp6, 26S, 18S și două fragmente ale genomului Ogura de 2,5 kb derivat de la o digestie cu NcoI și de 19,4 kb derivate de la o digestie cu Nrul. 570

Cele două loturi cibride diferă prin aceea că:

- a) numerele 23s, 77 și 11s de la rapiță și 1, 16 și 11 de la varză posedă regiunea genomului Ogura care înconjoară gena Cox1, care se recunoaște prin fragmentele BglI de 10,7 kb sau Nrul de 11 kb și regiunea genomului Ogura care înconjoară una dintre genele RNA de transfer al formilmetioninei, care se recunosc prin fragmentele Sall de 5,1 kb sau Nrul de 15 kb. 575

- b) numerele 27, 58, 85 de la rapiță și 9, 17, 21, 24 și 27c de la varză nu posedă regiunile corespunzătoare care au fost reamplasate ca urmare a recombinărilor între genomurile celor doi părinți care au fost fuzionate, prin regiuni analoage 580

ale genomului mitocondrial al rapiței din nr. 27, 58 și 85 și al verzei din nr. 9, 17, 21, 24, și 27c. Se deduce din aceasta că cele două regiuni în discuție ale genomului Ogura sunt nedorite dacă se vrea să se aibă un sistem de sterilitate masculină adecvat comercializării producției de semințe.

Exemplul 3. Acest exemplu ilustrează valoarea cunoașterii secvențelor de "sterilitate masculină Ogura" și a secvențelor nedorite pentru a realiza o sortare rapidă a cibrizilor obținuți, fără a fi necesar să se aștepte câțiva ani pentru retro-încrucișări și teste agronomice.

Protoplaști de la o plantă *Brassica* purtătoare de citoplasma Ogura s-au fuzionat cu protoplaști de la speciile de *Brassica* în discuție. Coloniile derivate din fuziune s-au cultivat *in vitro* și puse să se regenereze pe un mediu care favorizează formarea de butași (vezi Pelletier et al, 1983).

Dintr-un gram de material proaspăt, fie un calus sau un fragment al plantulei regenerate, este posibil prin tehnicile descrise mai sus să se izoleze DNA-ul total. După digestie cu Sall hibridizare de tip Southern cu o sondă delimitată prin nucleotidele nr. 389 și 1199 (vezi fig. 1) ce va da un semnal numai pentru 4,4 kb (nu va fi dat un semnal pentru 5,1 kb). Asemănător, după digestie cu Nrul și hibridizare cu o sondă care poartă gena *CoxI* se va obține un semnal pentru o dimensiune diferită de 11 kb.

Aceste hibridizări permit să fie anticipată planta care se va obține, care într-adevăr, va fi masculin-sterilă și adecvată comercializării producției de semințe.

Exemplul 4. Acest exemplu este o variantă a exemplului 3, bazat pe ideea realizării încrucișării sexuate între doi părinți în condiții speciale sau cu genotipuri speciale, în locul realizării fuziunilor de protoplaști, cu rezultatul că, spre deosebire de procedeele cunoscute de fecundare de la plante, aici se realizează amestecarea citoplasmelor oosferei și a tubului polenifer sau gametului mascul. Dacă astfel de metode au fost descrise, se poate realiza o sortare timpurie în același mod pe plante tinere derivate din aceste fertilizări artificiale, utilizând aceleași sonde și aceleași criterii ca în exemplul 3.

Exemplul 5. Acest exemplu ilustrează valoarea cunoașterii secvenței de sterilitate Ogura într-un tip de manipulare genetică care a fost deja descris la drojdii (Johnston et al., 1988).

Plecând de la o plantă de *Brassica* normală, meristeme sau celule alternative sunt bombardate *in vitro* cu microparticule învelite cu DNA care poartă secvența de sterilitate Ogura. Plantele obținute din descendența meristemelor tratate sau a plantulelor regenerate vor fi citoplasmatic masculin-sterile dacă DNA-ul a fost capabil să pătrundă în mitocondrii și să se integreze în genomul acestor organite. Se vor evita astfel problemele puse prin secvențele indezirabile, când este vorba de cloroplastele de ridiche Ogura sau de secvețe astfel definite ale genomului mitocondrial Ogura.

Exemplul 6. Acest exemplu ilustrează valoarea cunoașterii secvenței de "sterilitate Ogura" pentru construcția prin inginerie genetică a unei sterilități masculine nucleare în locul uneia citoplasmatică conform eredității Mendeliene.

Pornind de la secvența DNA mitocondrială, delimitată prin nucleotidele 928 și 1569, poate fi construită o genă himerică care va fi transcrisă, după transformare genetică, de celule de *Brassica* sau celulele altor genuri, în nucleii celulelor plantelor transformate obținute. Dacă gena himerică conține o presecvență care permite translația produsului său proteic pentru a fi introdus în mitocondrie, acești transformanți vor fi masculin-sterili și acest caracter se va menține ca un caracter Mendelian dominant.

1. Secvență DNA, care conferă sterilitate citoplasmatică masculină, **caracterizată prin aceea că** este purtată de către o secvență DNA delimitată prin nucleotidele numerotate cu 928 și 2273 din fig. 1, sau posedă o omologie de cel puțin 50% cu secvența menționată.

635

2. Secvență DNA, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** este purtată de către secvența delimitată prin nucleotidelor 928 și 1569 din fig. 1 și este transcrisă de RNA în mitocondriile masculin-sterile.

3. Genom recombinant de plantă, nuclear sau mitocondrial, **caracterizat prin aceea că** conține o secvență DNA de sterilitate Ogura, care este purtată de către o secvență definită în revendicarea 2.

640

4. Genom, conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** este lipsit total sau parțial de unul și/sau altul din cele două fragmente ale genomului Ogura, care poartă una sau ambele gene RNA de transfer al formilmetioninei folosită pentru inițierea translării, sau care poartă gena *Cox1* care codifică subunitatea nr.1 a citocromoxidazei, sau în care numitele fragmente sunt inactive.

645

5. Genom, conform revendicărilor 3 și 4, **caracterizat prin aceea că** este lipsit de partea secvenței care este purtată de către un fragment de 10,7 kb după digestie cu *BglI* și un fragment de 11 kb după digestie cu *NruI*, aceste fragmente fiind relevante prin hibridizare cu o probă *Cox1*.

650

6. Genom, conform revendicărilor 3-5, **caracterizat prin aceea că** este lipsit de partea secvenței care dă un fragment de 15 kb după digestie cu *NruI*, dă un fragment de 5,1 kb după digestie cu *Sall*, dă un fragment de 18,5 kb după digestie cu *BglI* și care este relevat prin hibridizare cu o probă care corespunde secvenței delimitată de către bazele 389 și 1199 ale secvenței arătată în fig. 1.

655

7. Genom, conform revendicărilor 3-6, **caracterizat prin aceea că** conține o secvență care dă un fragment de 2,5 kb după digestie cu *NcoI*, dă un fragment de 6,8 kb după digestie cu *NruI* și dă un fragment de 4,4 kb după digestie cu *Sall*.

8. Genom nuclear, conform revendicărilor 3-7, **caracterizat prin aceea că** conține și o presecvență care permite translarea produsului secvenței definite în revendicarea 2 pentru a fi introdus în mitocondrii.

660

9. Mitocondrie, **caracterizată prin aceea că** conține genom definit în revendicările 3...8.

10. Citoplasmă, **caracterizată prin aceea că** conține un genom mitocondrial definit în revendicările 3...8 și cloroplaste ale aceleiași specii ca genom nuclear, sau ale unei alte specii, dar care este compatibil cu acest genom nuclear.

665

11. Plantă care aparține genului *Brassica*, **caracterizată prin aceea că** conține cloroplaste de *Brassica* care sunt compatibile cu genomul nuclear al numitei plante și mitocondrii definite în revendicarea 9.

12. Plantă care aparține genului *Brassica*, **caracterizată prin aceea că** genomul său nuclear cuprinde un genom definit în revendicarea 8, precum și elemente care efectuează expresia și transportul produsului său de translație în mitocondrie.

670

13. Plantă, conform revendicărilor 11 și 12, **caracterizată prin aceea că** aparține uneia dintre speciile: *B.napus*, *B.oleracea*, *B.campestris*, *B.nigra*, *B.junceae*, *B.hirta* și *B.carinata*.

675

14. Plantă, conform revendicărilor 11...13, **caracterizată prin aceea că** este

RO 114978 B1

obținută prin fuziune de protoplaști.

680 15. Plantă, conform revendicărilor 11...13, **caracterizată prin aceea că** este obținută prin reproducere sexuată.

16. Plantă, conform revendicărilor 11...13, **caracterizată prin aceea că** este obținută prin transfer de genă în mitocondrie.

685 17. Procedeu de obținere a unei plante hibride, **caracterizat prin aceea că** o plantă care posedă caracterul de sterilitate masculină citoplasmatică, definită în revendicărilor 11...16, este încrucișată cu o plantă din aceeași specie care posedă, eventual, o genă Rfl care restaurează fertilitatea.

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

Examinator: **biochim. Crețu Adina**

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;
C 12 Q 1/68;

Fig. 1

(51) **Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;**
C 12 Q 1/68;

F Cn E MBS
 AvuBF M c RasnRS
 li4sa n o seaasp
 uJHmu l N aIABal
 IIIII I I IIIIII
 // //

241 ACAAACTGTTTACTCTTTTTTAAGAGTTAGCTGCATTCTCGGGGAGGTACGTACGCAAT 300
 TGTTTGACAAATGAGAAAAAATCTCAATCGACGTAAGGACGCCCTCCATGCATGCGTTA

B s
 E c P M l
 n o 1M B l
 M u P 2aB M s a
 w 4 l 8eb w p I
 o H S 6Iv o M I
 : I I III I I I

/
 301 CAAAGCAGCAGGGCACGTTTCGCAACACCTGCTTCAACTTCATGCACATTAGCAACAAGAT 360
 GTTTCGTCGTCGCCGTGCAAGCGTTGTGGACGAAGTTGAAGTACGTGTAATCGTTGTTCTA

F F E
 CnBn C cBS
 AvusuPAvS B S osc
 li4p4slif b f Rar
 uJHChtuJe v e IJF
 IIIIIIII I I III

// //

361 TGGGTAGTTGATTGTTGGGAGGATAGCTGCAGCTCCCTACGGGAGTGAACACAGTTCCA 420
 ACCCATCAACTAACAACCTCCTATCGACGTCGAGGGATGCCCTCAGTTGATGTCAAGGT

B s
 p S H C M
 1H Ba Ca f C b
 2g su ve rMM v F HT E o
 8i p9 II lns i a hh a I
 6A C6 JI Olp J u aa r I
 II II II III I I II I I

/ / / /

421 GGGGAGCAGCAGCAAGGCCAATACCGGCTGTGAGGCGCGTAGCGGGAAGAGATGTATGG 480
 CCCCCTCGTGTCGTTCCCGGTTATGGCCGACACTCCGCGCATCGCCCTCTCTACATACC

S
 C Ba B
 Av M A su D 3FS M
 li s l a3 p aot n
 uJ e w BA n Jky l
 II I I II I III I

/ //

481 TAAGGGATAGCTGTTTAAACCATTTGTAATGGAATGGGATGTTGATCCTCCTTGAATAAT 54
 ATTCCCTATCGACAAATTGGTAACATTACCTTACCTACAACCTAGGAGGAACCTTATTA

Fig. 1 (continuare)

Fig. 1 (continuare)

(51) **Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;**
C 12 Q 1/68;

F M M M T i C B l N
 a n n o s n v s a
 u l l I E I J H I
 I I I I I I I I I

CGGGGAAGAAGCGGGGTAGAGGAATTGGTCAACTCATCAGGCTCATGACCTGAAGATTAC
 841 ----- 900
 GCCCCTTCTTCGCCCCATCTCCTTAACCAGTTGAGTAGTCCGAGTACTGGACTTCTAATG

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

AGGTTCAAATCCTGTCCCCGCACCGTAGTTTCATTCTGCATCACTCTCCCTGTCGTTATC
 901 ----- 960
 TCCAAGTTTAGGACAGGGGCGTGGCATCAAAGTAAGACGTAGTGAGAGGGACAGCAATAG

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

/ / /
 GACATCGCAAGGTTTTTGAACGGCCGAAACGGGAAGTGACAATACCGCTTTTCTTCAGC
 961 ----- 1020
 CTGTAGCGTTCCAAAACTTTGCCGGCTTTGCCCTTCACTGTTATGGCGAAAAAGAAGTCG

B T
 sT s
 ta p
 Bq E
 II I

/
 ATATAAATGCAATGATTACCTTTTTTCGAAAAATTGTCCACTTTTTGTGCATAATCTCACTC
 1021 ----- 1080
 TATATTTACGTTACTAATGGAAAAAGCTTTTTTAACAGGTGAAAAACAGTATTAGAGTGAG

S H
 C aCa
 Av ave
 li 911
 uJ 6J1
 II 111

/ /
 CTACTGAATGTAAAGTTAGTGTAATAAGTTTCTTTCTTTTAGCTTTTTTACTAATGGCCC
 1081 ----- 1140
 GATGACTTACATTTCAATCACATTATTCAAAGAAAGAAAAATCGAAAAAATGATTACCGGG

Fig. 1 (continuare)

	C	C				N	S
	vDE	Av			BD	l	a E
	ids	li			sr	a	u DsMX
	Jep	uJ			md	I	3 ppab
	III	II			AI	I	A n3ea
	/	/			II	I	I IIII
							/ /

1141 ATATTGGCTAAGCTGGTTTTCTAACAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACGATCTA

1200 TATAAACCGATTTCGACCAAAAGATTGTTGGTTGTAACAAATGCTTGGTACTCTGCTAGAT

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

1201 GAGAAGTTAAAAATCCATATGAATTTTCAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAAATTACAATA

1260 CTCTTCAATTTTAAAGGTATACTTAAAGTCATACCCACCGATCCACAGTTTTAATGTTAT

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

1261 AAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAAGTCTCACCTATCATTAAAGGGGAA

1320 TTTAGTTTACATGGATTGCTACTTCAGTCTTTTTCAGAGTGGATAGTAATTTCCCTT

	M		M		M		M		M
	n		n		n		n		n
	l		l		l		l		l
	I		I		I		I		I

1321 ATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAA

1380 TATCTCCCCTTTCTCCTTTTTTCTCCCCTTTCCCCTTTATCTCCCCTTTCTCCTTTT

							T
							s
							p
							E
							I

1381 AAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGTGAAAAATTGACCG

1440 TTTCTCCCCTTTCCCCTTTATCTCCCCTTTCTCCTTTTTTCTCCACCTTTTAACTGGC

Fig. 1 (continuare)

T
a
q
I
I
-
1

T
Ms
fp
eE
II
/

1441 AGAAAAATAATGCTTTGTGAACCCAAATTGCTTTGACAAAAATAAGAAAGAAGCAAAATCT
 TCTTTTATTACGAAACAGTTGGGTTAACGAAACTGTTTTATTCTTTCTTCGTTTTAGA 1500

S
T BB a M N
s E gsDu b a X
p a ltpJ o c
E r IYnA I m
: I IIII I I

/ /

1501 CATTCAATTTGAAATAGAAGAGATCTCTATGCCCCCTGTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTT
 GTAAGTTAAACTTTATCTCTCTAGAGATACGGGGGACAAGAACCAAAAGAGGGTACGAA 1560

H
i
n
C
I
I

M
bS
of
Ie
II

C
v
i
J
I

1561 TTGTTGGTCAACAACCAACCACAACCTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGAC
 AACAACCAGTTGTTGGTTGGTGTGAAAGATATCAAGAAGTGATGAGGATCTCCGAAC TG 1620

C
AvM
lin
uJl
III
//

H
iT
nf
fi
II

G
s
u
I

T
sAM
pss
Eee
III
/

N
l
a
I
I
:

1621 GGAGTGAAGCTGTCTGGAGGGAATCATTGTTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCA
 CCTCACTTCGACAGACCTCCCTTAGTAAACAACCTTTAGTTAATTAGATTAGTACGGAGT 1680

T
BM s
sn p
rl E
II I

M
b
o
I
I

T
s
p
E
I

M
b
o
I
I

/

1681 ACTGGATAAATTCACCTTATTTTTACAAATCTTCTGGTTATGCCCTTTTCTTTACTTT
 TGACCTATTTAAGTGAATAAAAAGTGTTAAGAAGACCAATACGGAAAAGAAGAAATGAAA 1740

Fig. 1 (continuare)

RO 114978 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;
C 12 Q 1/68;

S C E
 a u D P A C s
 3 p 1 lo p
 A n S w R E
 I I I II I
 /
 CTATATTTTCATATGCAATGATGGAGATGGAGTACTTGGGATCAGCAGAATTCATAAACT
 1741 ----- 1800
 GATATAAAAGTATACGTTACTACCTCTACCTCATGAACCCTAGTCGCTTAAAGATTTTGA
 E
 c o S
 ND B S E B tM AONPa B
 lr F SMNC c b yb vllpu s
 ad o ascr o v Lo a0au9 t
 II k JpIF P I TI I9IM6 X
 VI I IIII I I II IIVII I
 /// // //
 ACGGAACCAACTGCTTTACACCGGGGAAGACCATCCAGAGCAAGGACCCCAACAGTTT
 1801 ----- 1860
 TGCCTTGGTTGACGAAAGTGTGGCCCCCTTCTGGTAGGTCTCGTTCCTGGGGTTGTCAAA
 S
 BB a M B
 gsDu b B M s
 ltp3 o s a t
 IYnA I r I B
 IIII I I I I
 / /
 GGAAGATCTCTTGAGAAAAGGTTTTAGCACTGGTGTATCCTATATGTATGCTAGTTTATT
 1861 ----- 1920
 CCTTCTAGAGAACTCTTTTCCAAAATCGTGACCACATAGGATATACATACGATCAAATAA
 H H S
 Ca i a
 ve SAnT M u
 iI acca n 3
 JI lcIq l A
 II IIII I I
 / /
 CGAAGTATCCCAATGGTGTAAAGGCCGTCGACTTATTGGGAAAAAGGAGGAAAAATCACTTT
 1921 ----- 1980
 GCTTCATAGGGTTACCACATTCCGGCAGCTGAATAACCCCTTTTCTCCTTTTAGTGAAA
 C
 M vB
 n is
 l JI
 I II
 GATCTCTGTTTCGGAGAAATAAGTGGCTCACGAGGAATGGAAAGAAACATATTATATAA
 1981 ----- 2040
 CTAGAGAAACAAAGCCTCTTTATTACCGAGTGCTCCTTACCTTTCTTTGTATAATATATT

Fig. 1 (continuare)

S
a
T

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

2041 TATATCGAAGTCCTCTCCTTCAAATACTGGAAGGTGGATCACTTGTAGGAATTGTAGGAA
-----+----- 2100
ATATAGCTTCAGGAGAGGAAGTTTATGACCTTCCACCTAGTGAACATCCTTAACATCCTT

N N H
l l BC a H
a XR EaBsvHeSM iT S
I cs aIaaiaItw nf f
I ma eIlJJeIyo fi e
I II IIIIIIIII II I
////

2101 TGACATAATGCTAATCCATGTTGTACATGGCCAAGGAAGCATAAAATGATTCTTTTCATT
-----+----- 2160
ACTGTATTACGATTAGGTACAACATGTACCGGTTCCCTTCGTATTTTACTAAGAAAGTAAG

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

2161 TATAGATACCTCTGGTAGGTAAAGCACTCTACTGTGCTTTATTGAAAGTCCCATCGCGG
-----+----- 2220
ATATCTATGGAGACCATCCATTTCGTGAGATGACACGAAATAACTTTCAAGGGTAGCGCC

B C H E
s T T P v i M CM
p h a l i n l os
C a q e J f y Dp
I I I I I I I II

2221 GGGCGAGGATACTTGCCCTTCGCGGTTTCGACTTTCTTTTCAGGCTTGACTCATTATTTTCC
-----+----- 2280
CCCCTCTCTATGAACGGAAGCGCCAAAGCTGAAAGAAAAGTCCGAAGTGAAGTAATAAAGG

S
s
P
S S CB1H H C
Aa fAva2gS D iT v
vu n alin8is d nf i
a9 l NuJI6Ac e fi J
I6 I IIIIIII I II I
/ / /

2281 GGTCTCTCACACCCCTTTAGAGCTCTTTATGATGCCCACTGAGTAAGATTTCGGGGGCTT
-----+----- 2340
CCAGGAGAGTGTGGGGAATCTCGAGAAATACTACGGGTGACTCATTCTAAGCCCCCGAA

Fig. 1 (continuare)

RO 114978 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;
C 12 Q 1/68;

```

      S      B      C      N      B sS      ENM      B      M
MNC H s Av F sDpaST slb sT E a EM
scr h p li a asBcph pao ma a e an
pif a C uJ u JaIIia 3II Aq r I rl
III I I II I IIIIII IVI II I I II
// // // // // // // //
CCCCGGCGCAGAAGCTCATTCTGAACCGCGGGAACCTTCGTCTCTTCGACACAAACGTTTT
2341 ----- 2400
GGGCGCGCTCTTCGAGTAAGACTTGGCGCCCTTGAAGCAGAGAAGCTGTGTTTGCAAAA

```

```

      S
C      M      BBB N a
v M b A sasDLHu
i n o l antpap3
J l I w BHyNIhA
I I I I IIIIVII
// // //
ATGAAGAGGCTGATGGTGATGAGGATCC
2401 ----- 2428
TACTTCTCCGACTACCACTACTCCTAGG

```

ENZYME CARE TAIE

AccI	AflIII	AluI	AlwI	AlwNI	AseI	AvaI	AvaII
BalI	BamHI	BanII	BbvI	BbvII	BceI	BglII	Bpu10I
BsaI	BsaAI	BsaBI	BsaJI	BsiI	BsmI	BsmAI	Bsp1286I
BspCI	BspHI	BspMI	BsrI	BstBI	BstXI	BstYI	Cfr10I
CviJI	DdeI	DpnI	DrdII	DsaI	EaeI	EaeI	Eco57I
EcoBI	EcoDI	EcoNI	EcoOI09I	EcoPI	EcoPI5I	EcoRI	EcoRII
EcoRI24/3I	EspI	Esp3I	FauI	FinI	Fnu4HI	FokI	GdiII
GsuI	HaeI	HaeII	HaeIII	HgiAI	HhaI	HincII	HinfI
HphI	HaeI	HaeII	HaeIII	HboII	HcrI	MfeI	MlyI
HmaI	MnlI	MseI	MspI	MwoI	NciI	NcoI	NdeI
NheI	NlaIII	NlaIV	NruI	NspBII	PleI	PmlI	PpuMI
PstI	RsaI	SacII	SalI	Sau96I	Sau3AI	ScaI	SerFI
SfaNI	SfeI	SnaBI	SpeI	SpiI	SplI	SstI	StyI
StyLTI	StySJI	TaqI	TaqII-1	TaqII-2	TfiI	ThaI	Tsp45I
TspEI	TthIII	XbaI	XcmI	XmaIII	XmnI		

ENZYME CARE NU TAIE

AatII	AflII	AgeI	AhaII	ApaI	ApalI	AvrII	BanI
BcgI	BclI	BglI	BspGI	BspMII	BssHII	BstEII	Bsu36I
CfrAI	ClaI	DraI	DraIII	DrdI	EciI	Eco47III	EcoAI
EcoDXXI	EcoEI	EcoKI	EcoRI24I	EcoRV	FseI	FspI	HgaI
HgiEII	HindIII	HinfIII	HpaI	KpnI	MluI	NaeI	NarI
NotI	NsiI	NspI	PflMI	PshAI	PvuI	PvuII	RleAI
RsrII	SfiI	SgrAI	SmaI	SnaI	SphI	SspI	StuI
StySBI	StySPI	StySQI	TthIII	Uba1105I	Uba1108I	XhoI	

Fig. 1 (continuare)

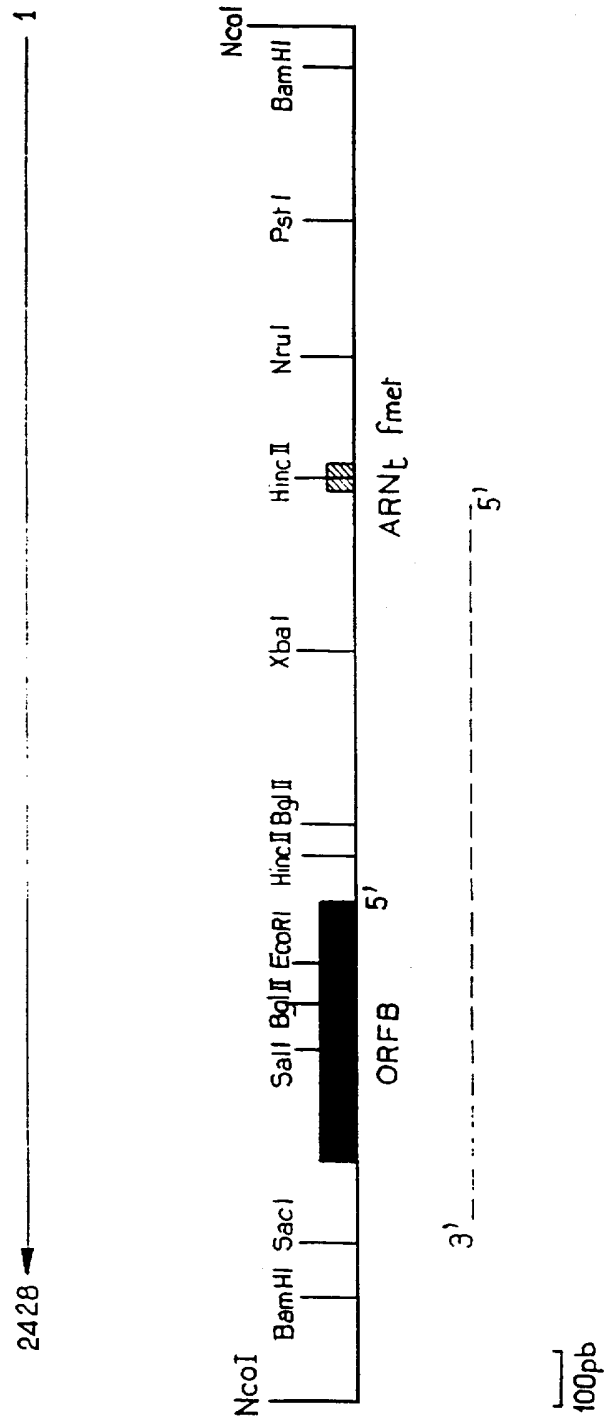


Fig. 2

RO 114978 B1

(51) Int.Cl.⁶ C 12 N 15/11;
C 12 Q 1/68;

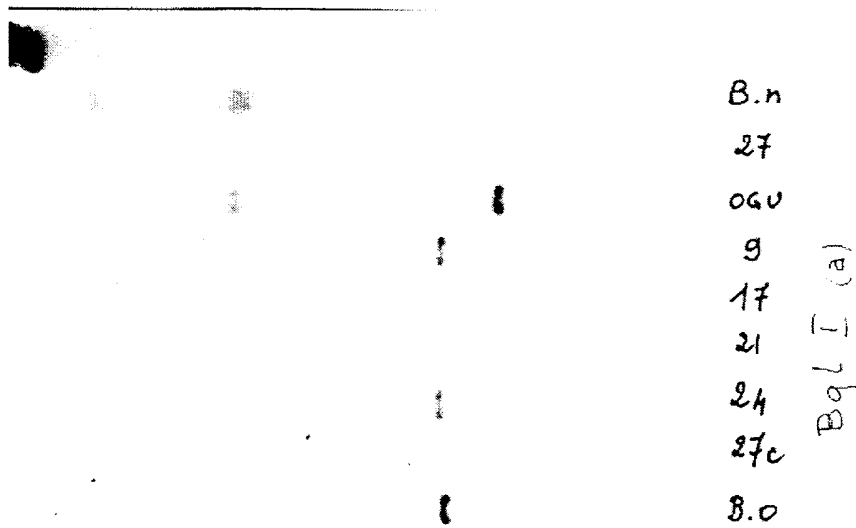


Fig. 3



Sal I

Fig. 4

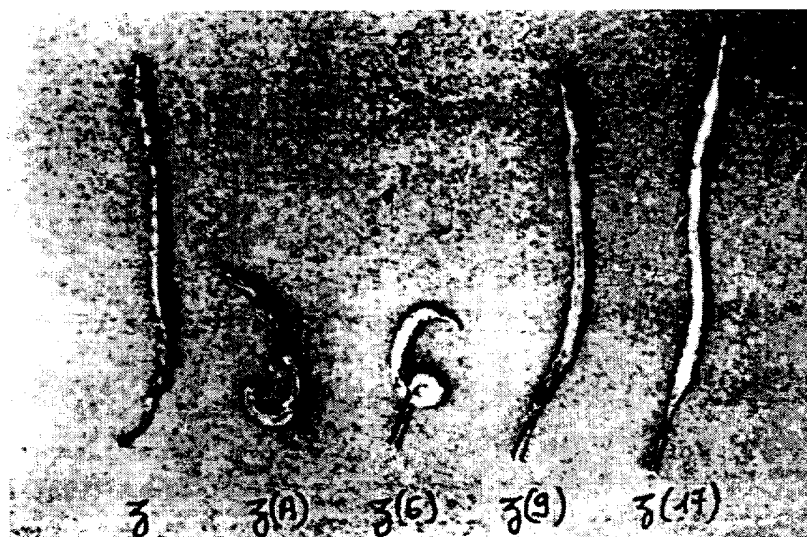


Fig. 5

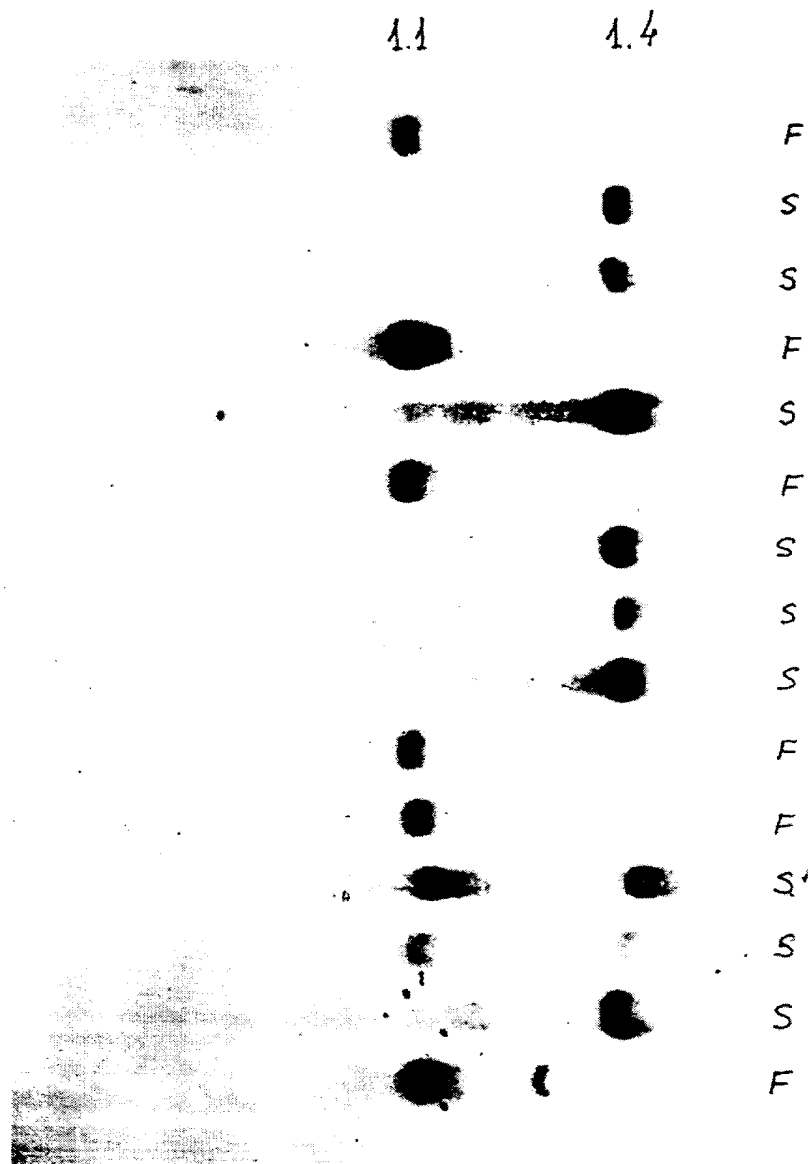


Fig. 6