



(110) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 99 024

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5) C12N015/00

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| (22) <i>Data de depósito:</i> 1991.09.23                                                                                                                                                                                                                                        | (73) <i>Titular(es):</i><br>Inst. Nac. de la Recherche Agronomique |
| (30) <i>Prioridade:</i> 1990.09.21<br>FR 90 11670                                                                                                                                                                                                                               |                                                                    |
| (43) <i>Data de publicação do pedido:</i><br>1992.08.31                                                                                                                                                                                                                         | (72) <i>Inventor(es):</i>                                          |
| (45) <i>Data e BPI da concessão:</i>                                                                                                                                                                                                                                            | (74) <i>Mandatário(s):</i><br>Vitor Hugo Ramalho da Costa França   |
| (54) <i>Epígrafe:</i> Processo de obtenção de uma sequência de ADN que confere uma esterilidade masculina citoplasmática, de um genoma mitocondrial, de um genoma nuclear de uma mitocôndria, de uma planta que contém esta sequência e processo para a preparação de híbridos. |                                                                    |

[Fig.]

99024

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE ADN QUE CONFERE UMA ESTERILIDADE MASCULINA CITOPLASMÁTICA, DE UM GENOMA MITOCONDRIAL, DE UM GENOMA NUCLEAR, DE UMA MITOCÔNDRIA, DE UMA PLANTA QUE CONTEM ESTA SEQUÊNCIA E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HÍBRIDOS"

para que

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

O presente invento refere-se a um processo de obtenção de uma sequência de ADN que confere uma esterilidade masculina citoplasmática, de um genoma mitocondrial, de um genoma nuclear, de uma mitocôndria, de uma planta que contem esta sequência e a um processo para a preparação de híbridos.

21

O presente invento refere-se também a um material biológico que possui uma esterilidade masculina útil para o desenvolvimento de variedades híbridas de espécies de interesse agronómico.

O invento refere-se em particular a uma planta pertencente à família das crucíferas cujo citoplasma das células contem orgânitos das sequências nucleotídias que conferem uma esterilidade masculina e de boas características agronómicas.

O desenvolvimento de variedades híbridas pode ser facilitado ou tornado possível através da utilização de um sistema de esterilidade masculina citoplasmática. Os híbridos são obtidos pela fecundação cruzada entre duas populações parentes, uma desempenhando o papel masculino, a outra o papel feminino. Um dos obstáculos encontrados quando se deseja obter variedades híbridas de qualidade uniforme por cruzamento sexuada em espécies autógamas, é a capacidade de a planta se auto-polinizar. Os sistemas de esterilidade masculina permitem obter plantas femininas incapazes de se auto-fecundar e nas quais, após a polinização, se podem recolher directamente os grãos que são todos híbridos sem se ter recorrido a técnicas laboriosas, tais como a castração das flores.

Entre as determinantes genéticas da esterilidade masculina, algumas há que são suportadas pelo citoplasma. Em cada geração sexuada eles são transmitidos exclusivamente pela mãe. Obtêm-se assim 100% de estéreis-masculinas em cada geração com um sistema de esterilidade masculina citoplasmática (CMS). Estas determinantes genéticas são suportadas pelo genoma das mitocôndrias.

Um sistema de esterilidade masculina citoplasmática apropriado nas crucíferas é definido pelas seguintes características:

- 1) A esterilidade masculina deve ser total, isto é, quaisquer

que sejam as condições de cultura e qualquer que seja a linhagem que se queira utilizar como parente feminina, não deve haver produção de pólen. Caso contrário os grãos recolhidos nas plantas femininas seriam em parte provenientes de autofecundação e não seriam, portanto, do tipo híbrido FI.

2) A produção destes grãos deve ser efectuada aproveitando vectores naturais do pólen, isto é, no caso destas espécies, himenópteros, dípteros e o vento. O pólen deve ser transportado das plantas polinizadoras para as plantas de esterilidade masculina (femininas). De facto, apenas os insectos podem assegurar este transporte à distância nas crucíferas.

As plantas femininas, por consequência, devem ser suficientemente atractivas para os insectos que vêm procurar aí o pólen. A morfologia das flores deve obrigar o insecto a fazer esta procura pela parte de cima da flor de modo a que o seu torax, principalmente, entre em contacto com o estigma. Praticamente isto equivale a dizer que a base das pétalas deve formar uma espécie de tubo em torno da base do pistilo.

3) A morfologia dos órgãos femininos (pistilo) deve ser idêntica à de uma planta fértil, em particular um único pistilo por flor e de forma rectilínea. Com efeito, acontece muitas vezes que as esterilidades masculinas se traduzem também por uma feminização das anteras que se transformam em

pseudopistilos e mesmo pela transformação dos nectários em flores completas. Acontece também que o ou os pistilos assim produzidos sejam deformados. Todas estas aberrações não permitem uma boa produção de grãos e pode falar-se de uma certa esterilidade feminina.

4) Para a produção de variedades híbridas F1 nas espécies de que se recolhem os grãos, como a colza ou as mustardas, é indispensável que o parente masculino do híbrido anule totalmente o efeito do citoplasma masculino estéril, de tal maneira que as plantas híbridas sejam facilmente polinizadas.

Nas crucíferas o primeiro caso de citoplasma masculino estéril ou CMS foi descrito por Ogura (1968) no rabanete, *Raphanus sativus*. Bannerot (1974, 1977) transferiu o citoplasma Ogura nas Brassicae, obtendo assim plantas que possuem uma esterilidade masculina citoplasmática. Estas mesmas plantas não apresentavam características agronómicas satisfatórias (clorose quando do abaixamento das temperaturas, má fertilidade feminina) daí um mau rendimento que as torna inaptas para a utilização comercial.

Nas crucíferas para evitar esta clorose, convem associar na mesma célula genomas nucleares e cloroplásticos de um mesmo género. Assim, plantas Brassicae que possuem um dos genomas cloroplásticos das Brassicae já não apresentam clorose. Se possuem a totalidade do genoma mitocondrial Ogura, apresentam

uma esterilidade masculina citoplasmática total mas, no entanto, as flores terão uma morfologia aberrante que torna impossível a sua polinização através dos vectores naturais.

Além disso, para as espécies em que o interesse reside nos grãos, convém restaurar a fertilidade masculina das variedades híbridas que se comercializam por intermédio de genes nucleares ditos restauradores.

É difícil restaurar a fertilidade masculina de plantas que possuem a totalidade do genoma mitocondrial Ogura porque é necessário fazer intervir simultaneamente vários genes restauradores.

Propusemo-nos obter um sistema de esterilidade masculina apropriada eliminando os genes responsáveis dos caracteres indesejáveis do citoplasma Ogura conservando uma esterilidade masculina eficaz e fácil de restaurar.

É por esta razão que o presente invento se refere a uma sequência de ADN a que chamaremos "esterilidade Ogura", caracterizada por:

- a) ser suportada por uma sequência de ADN delimitada pelos nucleotídios com os números 928 e 2273 na Figura 1, ou
  - b) apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a sequência referida em a),
- e conferir, quando se encontra presente no genoma

mitocondrial ou nuclear de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta.

Em particular, o presente invento tem por objecto uma sequência de ADN esterilidade Ogura, caracterizada por:

- c) por a sequência de ADN ser suportada pela sequência delimitada pelos nucleotídios 928 e 1569 da Figura 1, ou
  - d) apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência mencionada em c)
- e por ser transcrita em ARN nas mitocôndrias de plantas masculinas estéreis.

Na descrição que se segue, far-se-á referência às seguintes figuras:

**FIGURA 1:** Sequência nucleotídica do fragmento de ADN mitocondrial de rabanete Ogura, que suporta o caracter CMS.

**FIGURA 2:** Mapa de restrição do fragmento de ADN mitocondrial descrito na Figura 1.

**FIGURA 3:** Electroforese de ADN mitocondrial após digestão por BglI (3a) e NruI (3b). As faixas reveladas correspondem a uma hibridação com uma sonda Cox1. (Hiesel e outros 1987).

**FIGURA 4:** Electroforese de ADN mitocondrial após digestão por Sall. As faixas reveladas correspondem a uma hibridação com

uma sonda delimitada pelos nucleotídios n°. 389 e 1199 da sequência descrita na Figura 1.

**FIGURA 5:** Frutos produzidos por plantas de couve que possuem diferentes genomas citoplásmicos.

**FIGURA 6:** Electroforese de ARN mitocondrial. As faixas reveladas correspondem a uma hibridação com uma sonda, fragmento EcoRI - Bam HI, que inclui uma parte da sequência dita ORF B.

A sequência de ADN esterilidade Ogura é definida em relação à sequência delimitada pelos números 1 e 2428 na Figura 1. A referida sequência é suportada por uma sequência transcrita cujas extremidades 3' e 5' estão ligadas por um ponteador na Figura 2 e que é observada unicamente nas plantas masculinas estéreis. ORF B corresponde a um quadro de leitura aberta; esta denominação foi dada de acordo com a homologia observada com uma sequência descrita por Brennicke. Na Figura 2, representou-se a tracejado a sequência correspondente a um dos dois genes do ARN de transferência formilmetionina.

A sequência de ADN delimitada pelos nucleotídios com os números 928 e 2273 na Figura 1, corresponde a uma transcrição que pode ser visualizada por hibridação molecular (1,4) como se observa na Figura 6. Nesta Figura 6, cada poço corresponde a uma planta fértil (F) ou masculina-estéril (S).

Apenas as plantas masculinas-estéreis sintetizam uma transcrição de cerca de 1400 bases. Esta transcrição começa na posição 928 ( $^{+}_{-}10$  bases) da sequência da Figura 1 e termina na posição 2273 ( $^{+}_{-}5$ ) (o início e o fim da transcrição podem produzir-se em diferentes posições nas mitocôndrias vegetais).

De modo preferido, o presente invento refere-se a um citoplasma que compreende uma sequência de ADN que apresenta, pelo menos, 50% de homologia com a sequência delimitada pelos nucleotídios 928 e 2273 da Figura 1 que confere o caracter CMS ou um citoplasma que compreende uma sequência de ADN que apresenta, pelo menos, 50% de homologia com a sequência delimitada pelos nucleotídios 928 e 1569 da Figura 1 e transcrita em ARN, que confere o caracter CMS, e é caracterizado por compreender:

- cloroplastos da mesma espécie que o genoma nuclear ou de uma outra espécie, mas compatíveis com o genoma nuclear,
- não compreender todo ou parte de um ou de outro (ou ambos) dos fragmentos do genoma mitocondrial Ogura, a seguir definido:
  - . que suporta um dos dois genes do ARN de transferência formilmetionina que serve para o início da tradução,
  - . que suporta o gene Cox1, que é codificado, por esse motivo, sob a unidade 1 do citocromo oxidase.

A ausência destes fragmentos, chamados "sequências indesejáveis", é necessária para se obterem genomas mitocondriais correspondentes a uma esterilidade masculina de boa qualidade, que responde às quatro características definidas mais acima.

De acordo com outro dos seus aspectos, o presente invento refere-se a um genoma nuclear ou mitocondrial recombinado, caracterizado por compreender uma sequência de ADN esterilidade Ogura,

a) que é suportada por uma sequência de ADN compreendida entre os nucleotídios 928 e 2273 da sequência representada na Figura 1, ou

b) que apresenta, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência mencionada em a),

e confere, quando se encontra presente no citoplasma de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta.

Em particular, um dos objectos do presente invento, é um genoma nuclear ou mitocondrial vegetal recombinado, caracterizado por compreender uma sequência de ADN esterilidade Ogura,

c) que é suportada por uma sequência delimitada pelos nucleotídios com os números 928 e 1569 na Figura 1,

d) que apresenta, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência mencionada em c)

e confere, quando se encontra presente no citoplasma de uma

planta e é transcrita em ARN, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta.

Um genoma nuclear ou mitocondrial de acordo com o presente invento pode ser caracterizado por o referido genoma recombinado ser desprovido de todos ou parte dos fragmentos de genoma Ogura:

- que suporta um dos dois genes do ARN de transferência formilmetionina que serve para o início da tradução,
  - que suporta o gene *cox1*, que, por esse motivo, é codificado sob a unidade nº. 1 do citocromo oxidase,
- ou no qual os referidos fragmentos são inactivos.

Mais precisamente, um genoma nuclear ou mitocondrial recombinado de acordo com o presente invento pode ser caracterizado:

- 1) por ser desprovido de todo ou parte de um fragmento de cerca de 10,7 kb após digestão por *BglI* ou de um fragmento de cerca de 11 kb após digestão por *NruI*, portadores do gene *cox1*.

Isto é posto em evidência, nomeadamente na Figura 3, por hibridação molecular com uma sonda que suporta a sequência *Cox1*.

- 2) por ser desprovido de todo ou parte de um fragmento de 5,1 kb após digestão por *SallI*, ou de um fragmento de cerca de 15 kb após digestão por *NruI*, ou cerca de 18,5 kb após digestão por *BglI*, portadores de um dos dois genes do ARN de transferência formilmetionina.

Isto é posto em evidência nomeadamente na Figura 4, através de hibridação molecular com uma sonda delimitada pelos nucleotídios nº. 389 e 1199 da sequência descrita na Figura 1.

Nas Figuras 3 e 4, os genótipos designados por algarismos correspondem a plantas que apresentam um sistema de esterilidade masculina citoplasmática apropriada.

| GENOTIPOS          | CLOROPLASTOS     | MITOCONDRIAS      |
|--------------------|------------------|-------------------|
| 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       |

Além disso, a existência de um caracter CMS de boa qualidade necessita da presença de uma sequência de ADN que pode ser referenciado por hibridações ADN/ADN em digestões. É deste modo que o presente invento se refere a uma sequência de ADN tal como pôde ser definida e caracterizada por compreender uma sequência que, após digestão por NcoI dá um fragmento de 2,5 kb, após digestão por NruI dá um fragmento de 6,8 kb e, após digestão por Sall dá um fragmento de 4,4 kb.

Esta sequência pode igualmente ser referenciada por hibridações no ARN total de plantas masculinas estéreis. Uma

transcrição de cerca de 1400 pares de bases é posta em evidência. Está ausente das plantas que voltam à fertilidade.

A definição das sequências nucleotídicas "indesejáveis" e de sequências nucleotídicas "indispensáveis" a uma esterilidade Ogura de acordo com o presente invento permite seleccionar, por técnicas de hibridação de ADN conhecidas na técnica, um material vegetal que contém cloroplastos compatíveis com o genoma e que contém mitocôndrias de boa qualidade sem esperar ter uma planta adulta e o aparecimento das flores e dos frutos. Possui-se, por isso, um utensílio de muito bom desempenho para seleccionar plantas que possuem um citoplasma masculino estéril que possui boas características agronómicas.

Segundo um outro aspecto, o presente invento refere-se a uma mitocôndria caracterizada por conter uma sequência nucleotídica correspondente a um ADN que apresenta, pelo menos 50% de homologia com a sequência delimitada pelas bases numeradas com os números 928 e 2273 na Figura 1 e codificante para a esterilidade masculina citoplasmática de Ogura; ou a + mitocôndria contém uma sequência de ADN suportada pela sequência delimitada pelos nucleotídios 928 a 1569 da Figura 1 ou que apresenta 50% de homologia com esta sequência, e que é transcrita em ARN nas mitocôndrias de plantas masculinas estéreis. Este ADN pode apresentar, além disto, as características definidas acima, nomeadamente a ausência das sequências indesejáveis.

O presente invento refere-se igualmente a um citoplasma de Crucífera, caracterizado por compreender uma sequência de ADN "esterilidade Ogura", presente no genoma mitocondrial; este citoplasma contém, além disso, cloroplastos da mesma espécie ou de uma outra espécie, mas compatíveis com o genoma nuclear.

A sequência esterilidade Ogura é caracterizada por:

- a) ser suportada pela sequência de ADN de 2428 pares de bases representada na Figura 1,
- b) ser delimitada pelos nucleotídios 928 e 2273 da Figura 1 e corresponder a uma transcrição indicada pelos ponteados da Figura 2 e visualizada pela hibridação molecular (1,4) Figura 6,
- c) apresentar, pelo menos 50% de homologia com a referida sequência mencionada em b) e conferir, quando se encontra presente no genoma mitocondrial de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta, ou
- d) ser suportada pela sequência delimitada pelos nucleotídios 928 a 1569 da Figura 1 e ser transcrita em ARN nas mitocôndrias de plantas estéreis, ou

e) apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a sequência descrita em d) e ser transcrita em ARN nas mitocôndrias de plantas estéreis.

O presente invento refere-se igualmente a uma planta da família das Crucíferas, caracterizada por conter cloroplastos e um núcleo da mesma espécie ou compatíveis e mitocôndrias que suportam um genoma que confere o caracter CMS tal como se definiu acima.

Mais precisamente, o presente invento refere-se igualmente a uma planta que pertence ao género Brassica, caracterizada por a referida planta conter cloroplastos e um núcleo de Brassica e mitocôndrias que suportam um genoma que confere o caracter CMS tal como definido acima.

Este genoma mitocondrial deve igualmente conter um certo número de genes da espécie Brassica em questão. Isto obtém-se através da recombinação entre o genoma Ogura e o genoma Brassica.

Em particular, o presente invento refere-se a uma planta que pertence à espécie Brassica napus, caracterizada por compreender um núcleo de Brassica e por o citoplasma conter cloroplastos de Brassica e mitocôndrias masculinos-estéreis que suportam um ADN de acordo com o presente invento, tal como se definiu mais acima; estas mitocôndrias podem

igualmente conter a maioria dos genes mitocondriais de *Brassica napus* (18S, Atp9, Atp6, CoxII, ndh1, cob). *Brassica napus* corresponde a Colza, ou Canola e Rutabaga.

O presente invento refere-se a uma planta da espécie *Brassica oleracea*, caracterizada por compreender um núcleo de *Brassica* e por o citoplasma conter cloroplastos de *Brassica* e mitocôndrias que compreendem uma sequência de ADN codificante para o caracter CMS tal como foi definido.

A *Brassica oleracea* cobre os diversos tipos de couves: repolho, couve Bruxelas, rábanos, brócolos, e couve-flor.

O presente invento refere-se igualmente a uma planta da espécie *Brassica campestris*, caracterizada por compreender um núcleo de *Brassica* e por o citoplasma conter cloroplastos de *Brassica* compatíveis com o genoma nuclear e mitocôndrias que compreendem uma sequência de ADN codificante para o caracter CMS tal como foi definido.

A *Brassica campestris* corresponde a nabo silvestre, nabo, +couve chinesa, de Pequim e japonesa.

Analogamente, o presente invento refere-se a uma planta escolhida de entre o grupo que compreende: *B. juncea*, *B. nigra*, *B. hirta*, *carinata*, caracterizada por compreender um núcleo de *Brassica* e por o citoplasma conter cloroplastos de

Brassica compatíveis com o genoma nuclear e mitocôndrias que compreendem uma sequência de ADN codificante para o caracter CMS tal como foi definida.

De acordo com um outro dos seus aspectos, o presente invento tem por objecto uma planta que pertence ao género Brassica e cujo genoma nuclear compreende uma sequência esterilidade Ogura tal como se definiu acima, assim como os elementos que asseguram a sua expressão e o transporte do produto de tradução na mitocôndria. Esta planta pode, nomeadamente pertencer a uma das espécies seguintes: B. napus, B. oleracea, B. campestris, B. nigra, B. juncea, B. hirta e B. carinata.

A presença da "sequência esterilidade Ogura" é necessária e suficiente para induzir uma ausência total de pólen na ausência de genes de restauração. A polinização destas plantas é assegurada normalmente por uma boa produção de néctar.

A morfologia dos órgãos femininos é normal e os frutos (siliquas) formados contem um número normal de grãos. A Figura 5 mostra a morfologia observada numa planta normal testemunha (z), uma planta com uma morfologia aberrante que possui o genoma Ogura inteiro (z(6)) e cloroplastos Brassica oleracea, uma planta de couve que suporta cloroplastos Brassica napus e mitocôndrias masculinas-estéreis que possuem

genes *Brassica napus* (z(A)) e plantas que suportam cloroplastos *Brassica oleracea* e mitocôndrias recombinadas que já não contêm sequências indesejáveis (z(9)) e (z(17)). As plantas têm as seguintes características:

| GENÓTIPO | CLOROPLASTOS       | MITOCONDRIAS             |
|----------|--------------------|--------------------------|
| z        | <i>B. oleracea</i> | <i>B. oleracea</i>       |
| z(A)     | <i>B. napus</i>    | <i>B. napus/ogura</i>    |
| z(6)     | <i>B. oleracea</i> | Ogura                    |
| z(9)     | <i>B. oleracea</i> | <i>B. oleracea/Ogura</i> |
| z(17)    | <i>B. oleracea</i> | <i>B. oleracea/Ogura</i> |

Os genótipos z(A) e z(6) não apresentam um sistema de esterilidade masculina citoplasmática apropriada.

Tais plantas podem ser obtidas por exemplo pela técnica de fusão de protoplastos ou por quaisquer outras técnicas que assegurem uma boa recombinação entre o genoma mitocondrial da espécie considerada e o genoma mitocondrial Ogura. Em tais plantas a fertilidade é restaurada por um único gene de restauração, chamado Rf1, proveniente do rábano, o que não se verifica em plantas que suportam a totalidade do genoma mitocondrial não apropriado.

Tais plantas podem igualmente ser obtidas por reprodução sexuada natural ou artificial.

As plantas que possuem um genoma mitocondrial de acordo com o presente invento podem igualmente ser obtidas por transferência de gene na mitocôndria.

Em qualquer caso, estas plantas possuem um sistema CMS apropriado, a saber:

- uma esterilidade masculina total,
- uma morfologia que permite uma boa polinização e uma boa produção de grãos tal como se ilustrou no quadro I e no quadro 2.

É por isso que o presente invento se refere igualmente a um processo de preparação de plantas híbridas, caracterizado por se cruzar uma planta que apresenta um caracter CMS apropriado, que compreende a sequência esterilidade Ogura no seu genoma mitocondrial ou nuclear com uma planta normal quando se trata de uma cultura de horta ou de forragem, ou com uma planta que traz um gene restaurador de fertilidade, Rf1, quando se trata de recolher os grãos. Refere-se igualmente a uma planta híbrida obtida por este processo.

De um modo geral, as melhores características agronómicas são obtidas para plantas masculinas-estéreis, que possuem cloroplastos da mesma espécie que o núcleo e mitocôndrias que apresentam um sistema de esterilidade masculina apropriado.

O quadro 1 representa a produtividade de uma linhagem de couves em diferentes citoplasmas, (os genótipos z9 ou z 17 são apropriados). O quadro 2 representa a produtividade de uma linhagem de colza em diferentes citoplasmas (os genótipos Fu 27, Fu 58, e Fu 85 são apropriados).

QUADRO 1: PRODUTIVIDADE DA LINHAGEM Z (COUVE A COUVE PICADA) EM

DIFERENTES CITOPLASMAS

| <u>Citoplasma</u> |                     | <u>Genotipos</u> | <u>Recolha de sementes</u> |
|-------------------|---------------------|------------------|----------------------------|
| Cloroplasto       | Mitocôndrias        |                  | Gramas/plantas             |
| -----             | -----               |                  | -----                      |
| B. oleracea       | B. oleracea         | (z)              | 53,1                       |
|                   | (testemunha fértil) |                  |                            |
| B. napus          | Ogura               | (zC)             | 0                          |
| B. napus          | Ogura/napus         | (zA)             | 22,7                       |
| B. oleracea       | Ogura               | (z6)             | 9,3                        |
| Ogura             | Ogura               | (z0)             | 20,1                       |
| B. oleracea       | Ogura/oleracea      | (z9 ou z17)      | 91,8                       |

QUADRO 2: PRODUTIVIDADE DA LINHAGEM DARMOR (COLZA DE INVERNO) EM DIFERENTES

CITOPLASMAS

\* Rendimento

. Colza de Inverno DARMOR masculina-fértil e masculina-estéril (Fu)

|            | <u>Rendimento</u><br><u>(% DARMOR)</u> | <u>Cloroplastos</u> | <u>Mitocôndrias</u> |
|------------|----------------------------------------|---------------------|---------------------|
| DARMOR     | 100 (35 qx)                            | B. napus            | B. napus            |
| Fu 27      | 118                                    | B. napus            | B. napus/ogura      |
| Fu 58      | 120                                    | B. napus            | B. napus/ogura      |
| Fu 77      | 96                                     | B. campestris       | Ogura               |
| Fu 85      | 114                                    | B. napus            | B. napus/ogura      |
| Fu 118     | 103                                    | B. napus            | B. napus/ogura      |
| "BIENVENU" | 108                                    |                     |                     |
| "JET NEUF" | 89                                     |                     |                     |

QUADRO 2 (continuação)

Componentes do rendimento (Clermont-Ferrand)

|                | NS   | PIS  | NGPS | NG     | PIG  | MST  | HI    | RDT  | HT  |
|----------------|------|------|------|--------|------|------|-------|------|-----|
| DARMOR         | 7183 | 81,9 | 9,9  | 70028  | 4,31 | 1077 | 0,256 | 31,6 | 120 |
| "BIENVENU"     | 7334 | 80,7 | 11,2 | 81841  | 3,88 | 1064 | 0,269 | 30,7 | 109 |
| JET NEUF       | 7977 | 87,7 | 8,6  | 67291  | 4,98 | 1176 | 0,262 | 33,3 | 115 |
| Fu 27 DARMOR   | 9292 | 82,8 | 11,6 | 106188 | 4,09 | 1337 | 0,293 | 42,2 | 122 |
| Fu 58 DARMOR   | 8617 | 76,5 | 11,7 | 99947  | 3,65 | 1228 | 0,270 | 36,0 | 131 |
| Fu 118 DARMOR* | 8389 | 84,6 | 11,0 | 92428  | 4,11 | 1243 | 0,276 | 38,1 | 132 |

NS: Número de silíquas/m<sup>2</sup> - PIS: Peso de uma silíqua (mg) - NGPS: Número de grãos/silíqua<sup>2</sup>NG: Número de grãos/m<sup>2</sup> - PIG: Peso de um grão (mg) - MST: Matéria seca total (g/m<sup>2</sup>)

HI: índice de recolha (%) - RDT: Rendimento (qx/ha) - HT: Altura (cm)

\* Estas plantas apresentam muitas vezes frutos (silíquas) deformados.

O presente invento tem igualmente por objecto uma sonda que compreende uma sequência de, pelo menos, 10 bases, de preferência 15 bases, de uma sequência compreendida entre os nucleotídeos com os números 928 e 1569 na Figura 1; a referida sonda pode ser marcada, por exemplo, por meio de uma base radioactiva ou por qualquer outro meio, como por exemplo por fluorescência. Esta sonda pode ser utilizada pondo em evidência a esterilidade masculina e pode ser utilizada nomeadamente na selecção de clones.

As características e vantagens do presente invento serão postas em evidência nos exemplos seguintes.

**EXEMPLO 1: EVIDENCIAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE ADN RESPONSÁVEL PELA  
ESTERILIDADE MASCULINA CITOPLASMÁTICA OGURA**

**1. Planta**

Designam-se por cihíbrido as formas obtidas pela fusão de protoplastos isolados, seguida pela regeneração de toda a planta. Este modo de obtenção permite a mistura na célula de informações citoplásmicas provenientes de dois parentes. O cihíbrido nº. 13 foi obtido de entre 820 plantas regeneradas por fusões de protoplasto entre um cihíbrido de *B. napus* resistente à triazina, Ogura cms (descendente do cihíbrido 77 descrito em Pelletier e outros, 1983 e Chétrit e outros, 1985) e a variedade de origem Brutor, sensível à triazina, e fértil.

Um ensaio de resistência à triazina (Ducruet e Gasquez, 1978) efectuado numa amostra de folha de cada regenerante permitiu determinar o tipo de cloroplasto (cloroplastos resistentes à triazina proveniente do parente 77 ou cloroplastos sensíveis à triazina proveniente da linhagem Brutor). Cultivaram-se as plantas e observou-se o estágio de floração. As plantas apresentando combinações isentas de parentesco (quer seja sensível/masculina estéril ou resistente/masculina fértil) foram seleccionadas como cihíbridos. O cihíbrido nº. 13 era do tipo sensível/masculina estéril. O cihíbrido 1 era do tipo resistente/masculina fértil.

## 2. Isolamento dos ácidos nucleicos.

O ADN total foi isolado a partir de folhas provenientes de plantas de 4 semanas, de acordo com o método descrito por Dellaporta (1983). O ADN mitocondrial foi extraído de folhas de plantas com 8 semanas, tal como foi descrito por Vedel e Mathieu, 1982, com as seguintes variantes:

as mitocôndrias não foram purificadas em gradiente de sacarose antes da lisagem e a lisagem foi realizada em sarcosil a 4%, com proteinase K 0,5 mg/ml (Boehringer Mannheim GmbH), em Tris pH 8, 50 mM, EDTA 20 mM. Após precipitação, o ADN mitocondrial foi purificado por centrifugação em gradiente brometo de etídio-cloreto de cézio (método 1- Vedel e Mathieu 1982) em tubos de centrifugação em polialómero.

Os ARN totais foram isolados a partir de folhas ou de rebentos de flores segundo Logeman e outros, 1987.

Os ARN mitocondriais foram extraídos de couves-flor com 8 semanas, de acordo com a técnica de Stern e Newton, 1986.

### **3. Análise por restrição do ADN mitocondrial e electroforese em gele de agarose.**

Foram realizadas tal como descrito em Pelletier e outros, 1983. Os ARN totais ou mitocondriais foram carregados em geles de electroforese contendo formaldeído, tal como foi descrito por Sambrook e outros, 1989.

### **4. Hibridação.**

A transferência de ADN ou de ARN em filtros de "nylon" (Hybond-N, Amersham) foi praticada por absorpção capilar respectivamente com 6xSSC ou 10xSSPE, de acordo com as instruções do fabricante. A prehibridação e a hibridação foram conduzidas segundo Amersham, utilizando sondas marcadas pelo sistema de marcação de ADN "multiamorce" (Amersham), após purificação em colunas de Sephadex G50 (Sambrook outros, 1989).

## 5. Clonagem do ADN mitocondrial.

Dois bancos genómicos de linhagens cihíbrido masculina estéril (13-7) e revertente (13-16) foram construídos num vector fago lambda EMBL3, cultivado na cepa restrictiva de E. coli Nm539 (Frischauf e outros, 1983). Obtiveram-se cerca de  $2,5 \times 10^4$  de "clones" por  $\mu\text{g}$  de ADN mitocondrial.

Os bancos de ADN mitocondrial foram titulados e espalhados a fim de isolar as placas que foram transferidas para os filtros de "nylon", tal como foi descrito por Sambrook e outros, 1989. A sonda de hibridação utilizada para examinar os dois bancos de ADN mitocondrial foi preparada como a seguir se indica: o fragmento de ADN mitocondrial específico da cms foi eluído utilizando o processo "Gene clean<sup>TM</sup>" (BIO 101 INC.) a partir de um produto de digestão de ADN mitocondrial carregado num gele de agarose de preparação. O ADN eluído foi, em seguida, marcado tal como se descreveu.

A extracção de ADN Lambda, a sub-clonagem do fragmento NcoI 2,5 em NcoI de pTrc99A (Amman e outros, 1988) e as extracções de ADN plasmídico foram efectuadas segundo os protocolos de Sambrook e outros, 1989. Os plasmídios recombinantes foram introduzidos numa cepa de E. coli NM522 (Gough e Murray, 1983).

## 6. Estudo genético do cihíbrido 13 e dos seus descendentes.

Na primeira geração de descendentes obtidos por polinização do cihíbrido 13 com Brutor, composto por 13 plantas, 5 são totalmente masculinas estéreis (inclusive as plantas 13-12 e 13-17), uma é masculina fértil (nº. 13-6) e 7 são quase inteiramente estéreis com algumas flores masculinas férteis.

A planta fértil 13-6 foi auto-polinizada e cruzada com Brutor. Em dois casos obtêm-se unicamente plantas férteis (43 e 42 respectivamente). Em cruzamentos entre a planta masculina estéril nº. 13-7 e Brutor, 24 descendentes são inteiramente estéreis e 6 apresentam algumas flores férteis, resultado semelhante ao que se obteve com o próprio cihíbrido. A planta 13-2 foi cruzada com a linhagem restauradora RF heterozigótica para os genes específicos de restauração para a esterilidade masculina Ogura (Chétrit e outros, 1985). A descendência deste cruzamento é composto por 53 plantas masculinas estéreis, 37 plantas masculinas férteis e 9 plantas quase inteiramente estéreis, se bem que apresentando algumas flores férteis. Estes resultados sugerem que as plantas masculinas estéreis da família cihíbrido 13 contêm o determinante Ogura cms, tal como os outros cihíbridos estudados anteriormente com um perfil de restauração mais simples (Chétrit e outros, 1985).

Neste estágio do estudo, duas possibilidades podem ser encaradas: ou o cihíbrido 13 contém uma mistura de genomas mitocondriais masculinos férteis e masculinos-estéreis e pode-se seleccionar ainda mais para purificar os dois fenótipos, ou o cihíbrido 13 contém um genoma mitocondrial recombinado de estrutura instável que volta a uma configuração "fértil" mais estável e será impossível manter um fenótipo masculino estéril homogêneo entre as gerações ulteriores.

Plantas masculinas estéreis obtidas a partir da descendência da planta masculina estéril nº. 13-7 foram desenvolvidas simultaneamente por estacas e por cruzamento sexuada com Brutor. Após um número variável de geração (1 a 5) pelos dois processos, todas as famílias dão plantas férteis. Pelo contrário, as plantas inteiramente férteis assim obtidas não voltam a dar plantas estéreis.

A luz destes resultados, pode considerar-se que a segunda explicação acima proposta, i.e., em que o cihíbrido 13 possui um genoma mitocondrial instável que perde o determinante Ogura cms durante o processo que conduz a uma configuração "fértil", sem possibilidade de retorno a um fenótipo estéril, é a indicada.

**7. Comparação entre os ADN mitocondriais de masculinas-estéreis e de revertentes férteis. Isolamento de um fragmento específico das plantas masculinas-estéreis.**

O ADN mitocondrial foi extraído das folhas de descendentes 13-7 masculinos-estéreis e de revertentes férteis (descendentes 13-6 ou 13-7) e digerido com várias enzimas de restrição, a fim de comparar o seu perfil de restrição. Os genomas mitocondriais dos dois tipos são muito semelhantes, visto que não pode ser observada qualquer diferença entre os perfis de restrição das mitocôndrias masculinas-estéreis e revertentes férteis utilizando diferentes enzimas. Contudo foi detectado um fragmento de restrição de 6,8 kb no perfil de restrição do ADN mitocondrial das plantas masculinas-estéreis digerido com NruI e nunca foi observado nos perfis revertentes férteis correspondentes.

O fragmento (chamado N6,8) foi eluído com um gel de agarose, marcado e utilizado como sonda em perfis de restrição de ADN mitocondrial NruI: um sinal importante de 6,8 kb foi observado em todos os descendentes masculinos-estéreis do híbrido 13, se bem que nenhum fragmento deste tamanho tenha fecundado por hibridação pela sonda em genomas de mitocôndrias de revertentes férteis. Além disso, a sonda N6,8 fecunda por hibridação com um fragmento de 6,8 kb no ADN mitocondrial Ogura digerido com NruI, mas não no de B. napus ou Brutor, que mostra a origem Ogura deste fragmento.

Um banco lambda contendo os extractos de ADN mitocondrial proveniente de plantas masculinas estéreis (13-7) foi ensaiado com o fragmento marcado eluído e, entre 8 clones de hibridação, foram isoladas 2 fagos recombinantes, contendo o fragmento N6,8 inteiro e as sequências adjacentes. Obteve-se uma carta de restrição pormenorizada desta região. A hibridação dos perfis de restrição do ADN mitocondrial proveniente de descendentes férteis e estéreis do cihíbrido 13 com N6,8 como sonda permitiu limitar a região específica do genótipo masculino estéril a um fragmento NcoI de 2,5 kb.

O fragmento NcoI de 2,5 kb foi marcado e utilizado como sonda face ao ADN mitocondrial proveniente de descendentes 13-7 e 13-6 digerido com NcoI. Além do sinal de 2,5 kb que é específico do perfil masculino estéril, vários fragmentos NcoI fecundam por hibridação simultaneamente em perfis de "révertant" fértil e masculino estéril, sendo estes fragmentos de 2,2, 10 e 14 kb. Um fragmento NcoI de 2,7 kb fecunda por hibridação fortemente no genoma mitocondrial dos descendentes férteis e não no dos descendentes estéreis. A análise deste perfil de hibridação leva à conclusão de que o fragmento NcoI de 2,5 kb, embora específico do ADN mitocondrial masculino estéril, contém sequências que são repetidas algures no genoma mitocondrial (em fragmentos de 2,2, 10 e 14 kb após digestão por NcoI) e estas sequências repetidas encontram-se também presentes no ADN mitocondrial de revertentes férteis, além do fragmento específico de 2,7 kb.

Os ARN totais são extraídos de folhas ou de rebentos de descendentes de cíhíbridos 13, ou de cíhíbridos (provenientes de outras experiências de fusão) masculina estéril ou de linhagem Brutor. Os "Northern blots" foram realizados e fecundados por hibridação com uma sonda correspondente à inserção do clone Lambda que contem N6,8 descrito no exemplo 3. Uma transcrição principal de 1,4 kb foi detectado em todos os cíhíbridos masculinas estéreis, inclusive o cíhíbrido 13-7, se bem que não se tenha observado qualquer transcrição deste tamanho na linhagem Brutor, nem nos dois cíhíbridos férteis (diferentes de 13). Além disso, plantas férteis apresentam uma transcrição de 1,1 kb que fecunda por hibridação com a sonda que se encontra ausente ou presente a um nível muito baixo em todos os cíhíbridos masculinos-estéreis ensaiados. Várias transcrições comuns a todos as amostras fecundam por hibridação de modo muito fraco com a sonda, por causa do tamanho significativo da inserção marcada. Verificou-se que as inscrições mitocondriais podem ser detectadas em amostras de ARN totais por hibridação do mesmo "Northern blot" com um fragmento de ADN que contem a sequência do gene apta.

A mesma transcrição específica de 1,4 foi encontrada nos ARN mitocondriais Ogura extraídos de couves-flor, utilizando o fragmento NcoI12,5 como sonda. Os limites exactos desta transcrição foram determinados utilizando como sonda sub-clones do fragmento NcoI2,5.

### Estudo do cihíbrido 1 e dos seus descendentes.

O cihíbrido 1 era masculino fértil. Na sua descendência, a planta 1.12 era fértil e a planta 1.18 estéril. A planta 1.12 deu na sua descendência plantas estéreis ( $S_3$ ) e plantas férteis ( $RF_3$ ). A planta 1.18 deu plantas estéreis ( $S_2$ ) e um ramo fértil ( $RF_2$ ). As plantas  $S_2$  e  $S_3$  são restauradas pelo mesmo gene nuclear de restauração da fertilidade polínica que o cihíbrido 13 estéril.

O ADN mitocondrial das plantas  $S_2$  e  $S_3$ , por hibridação com o fragmento  $NcoI$  de 2,5 kb marcado, não dão um sinal a 2,5 kb numa digestão  $NcoI$ , nem um sinal a 6,8 kb numa digestão  $NruI$ .

Do mesmo modo, a hibridação nos ARN totais (Northern) com uma sonda correspondente à sequência ORFB não dá um sinal a 1,4 kb como no cihíbrido 13 estéril. Pelo contrário, uma sonda correspondente à sequência compreendida entre os nucleotídios 928 e 1569 da Figura 1 dá um sinal em "Northern" de cerca de 1,3 kb. Este sinal está ausente no ARN das plantas  $RF_1$ ,  $RF_2$ ,  $RF_3$  ou Brutor. Do mesmo modo é possível utilizar esta sequência (928-1569) como sonda em mancha de ARN totais e neste caso, isolados e todas as plantas masculinas-estéreis dão um sinal.

Estes resultados indicam que as plantas  $S_2$  e  $S_3$ , se bem que masculinas-estéreis, não conservaram a sequência

nucleotídica descrita na Figura 1, na sua conformação original e demonstram que, nesta sequência, a parte compreendida entre os nucleotídios 928 e 1569 é a que contém a determinante específica "esterilidade Ogura", que torna as plantas masculinas estéreis quando esta sequência é transcrita.

Esta sequência não possui homologia significativa com as sequências presentes em bancos de dados.

**EXEMPLO 2: EVIDENCIAÇÃO DE SEQUÊNCIAS INDESEJÁVEIS NO GENOMA MITOCONDRIAL OGURA.**

Foi obtida uma colecção de cihíbridos na espécie *B. napus* por fusão de protoplastos entre um colza portador do citoplasma Ogura e um colza normal. O primeiro é masculino-estéril e deficiente clorofiliano a baixa temperatura, o segundo é normalmente verde e fértil. Os cihíbridos foram triados entre as plantas regeneradas e retiveram-se os que eram masculinos-estéreis e normalmente verdes.

Do mesmo modo foi obtida uma colecção de cihíbridos na espécie *B. oleracea* por fusão de protoplastos entre uma couve portadora do citoplasma Ogura e uma couve normal. Entre as plantas regeneradas retiveram-se os cihíbridos que eram masculinos-estéreis e normalmente verdes.

Estes cihíbridos foram cruzados com diferentes variedades, de colza no primeiro caso, de couve no segundo. Os cruzamentos foram repetidos em cada geração com as mesmas variedades de modo a obter-se um genótipo definido, próximo do da variedade recorrente.

Estas diferentes variedades, assim convertidas nos citoplasmas de diferentes cihíbridos foram submetidos a ensaios agronómicos para medir a produção de grãos, que depende de vários factores: uma produção de nectar suficiente para assegurar uma polinização pelos insectos, uma morfologia floral normal para que esta polinização seja eficaz e para que os frutos se desenvolvam normalmente.

A colecção de cihíbridos pôde, deste modo, ser dividida em dois lotes:

- um lote de cihíbridos que apresentam uma esterilidade masculina apropriada à produção comercial de sementes.
- um lote de cihíbridos que não apresentam todas as características favoráveis a uma boa produção comercial de sementes.

Ao primeiro lote pertencem, por exemplo, os cihíbridos de colza n.ºs. 27, 58, e os cihíbridos de couve n.ºs. 9, 17, 21, 24, 27c.

Ao segundo lote pertencem, por exemplo, os cihíbridos de

colza n°s. 23s, 77, 118 e os cihíbridos de couve n°s. 1, 6, 14.

Os ADN totais destes cihíbridos foram submetidos a digestões enzimáticas por SalI, NcoI, NruI, BglI, PstI, KpnI. Os "Southern blots" obtidos foram fecundados por hibridação com diferentes sondas mitocondriais Atpa, Cob, CoxI, Atp6, 26S, 18S e dois fragmentos do genoma Ogura de 2,5 kb resultante de uma digestão NcoI e de 19,4 kb resultante de uma digestão NruI.

Os dois lotes de cihíbridos distinguem-se por:

- a) os n°s 23s, 77, 11s, na colza e 1, 6, 11 na couve possuïrem a região do genoma Ogura que envolve o gene coxI reconhecível através de fragmentos BglI de 10,7 kb ou NruI de 11 kb e a região do genoma Ogura que envolve um dos genes do ARN de transferência formilmetionina reconecível através de fragmentos SalI de 5,1 kb ou NruI de 15 kb .
- b) os n°s. 27, 58, 83 na colza e 9, 17, 21, 24, 27c na couve não possuïrem as regiões correspondentes que foram substituídas, pelo facto de as recombinações entre os genomas dos dois parentes que foram fundidos, por regiões análogas do genoma mitocondrial de colza nos n°s. 27, 58, 85, de couve nos n°s. 9, 17, 21, 24, 27c.

Deduz-se daí que as duas regiões em questão do genoma Ogura são indesejáveis se se pretende ter um sistema de esterilidade masculina apropriada à produção comercial de sementes.

### EXEMPLO 3

Este exemplo ilustra o interesse do conhecimento das sequências "esterilidade masculina Ogura" e das sequências indesejáveis para efectuar uma triagem imediata dos híbridos obtidos sem ter de se esperar vários anos de retrocruzamento e de ensaios agronómicos.

Fundem-se protoplastos de uma planta de Brassica que suporta o citoplasma Ogura com protoplastos da espécie Brassica considerada. As colónias resultantes da fusão são cultivadas "in vitro" e colocadas a regenerar num meio que favorece a formação de rebentos (ver Pelletier e outros, 1983).

A partir de um grama de matéria fresca, quer se trate de um calo ou de um fragmento da plântula regenerada, é possível, através das técnicas descritas anteriormente, isolar o ADN total. Após digestão por SalI, a hibridação de tipo "Southern" com a sonda compreendida entre os nucleotídios n°. 389 e 1199 (ver Figura 1) apenas deve dar um sinal para um tamanho de 4,4 kb (não deve dar sinal a 5,1 kb). Do mesmo modo, após digestão por NruI e hibridação com uma sonda que

suporta o gene *coxI*, deve obter-se um sinal para uma tamanho diferente de 11 kb.

Estas hibridações permitem prever se se tem uma planta que será masculina estéril e que será apropriada para a produção comercial de semente.

#### **EXEMPLO 4**

Este exemplo é uma variante do exemplo 3 em que se imagina que, em vez de se realizarem fusões de protoplastos, se realiza um cruzamento sexuado entre os dois parentes em condições particulares ou com genótipos particulares de tal modo que, contrariamente aos processos conhecidos da fecundação nos vegetais, há mistura de citoplasmas da oosfera e do tubo polínico ou do gâmeta masculino. Se se descrevessem tais processos poder-se-ia, do mesmo modo efectuar uma triagem precoce em jovens plantas resultantes destas fecundações artificiais utilizando as mesmas sondas e os mesmos critérios que no Exemplo 3.

#### **EXEMPLO 5**

Este exemplo ilustra o interesse do conhecimento da sequência esterilidade *Ogura* num tipo de manipulação genética que foi já descrita quanto à levedura (Johnston e outros 1988).

A partir de uma planta de Brassica normal bombardeiam-se meristemas ou células "in vitro" com micropartículas recobertas com ADN que suporta a sequência esterilidade Ogura. As plantas obtidas na descendência dos meristemas tratados ou das plântulas regeneradas serão masculinas estéreis citoplásmicas se o ADN puder penetrar nas mitocôndrias e integrar-se no genoma destes orgânitos. Evitar-se-ão assim os problemas colocados pelas sequências indesejáveis, quer se trate de cloroplastos do rabanete Ogura ou das sequências assim definidas do genoma mitocondrial Ogura.

#### EXEMPLO 6

Este exemplo ilustra o interesse do conhecimento da sequência "esterilidade Ogura" na construção por génio genético de uma esterilidade masculina nuclear, por hereditariedade mendeliana e já não citoplásmica.

A partir da sequência de ADN mitocondrial delimitada pelos nucleotídios 928 e 1569, pode-se contruir um gene quimérico que será, após transformação genética de células de Brassica ou de outro género, transcrito para o núcleo das células das plantas transformadas obtidas. Se o gene quimérico contiver uma presequência que permite a importação para a mitocôndria do seu produto de tradução em proteína, estes transformantes serão masculinos-estéreis e este caracter comportar-se-á como um caracter mendeliano dominante.

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1ª. - Processo de obtenção de uma sequência de ADN esterilidade Ogura, caracterizado por a sequência:

a) ser suportada por uma sequência de ADN delimitada pelos nucleotídios com os números 928 e 2273 na Figura 1, ou

b) apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a sequência referida em a),

e conferir, quando se encontra presente no genoma mitocondrial ou nuclear de uma planta, uma esterilidade masculina à referida planta.

2ª. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a sequência de ADN ser suportada pela sequência delimitada pelos nucleotídios 928 e 1569 da Figura 1, ou por apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência e por ser transcrita em ARN nas mitocôndrias de plantas masculinas estéreis.

3ª. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou mitocondrial vegetal recombinado, caracterizado por compreender uma sequência de ADN esterilidade Ogura,

a) que é suportada por uma sequência delimitada pelos nucleotídios com os números 928 e 1569 na Figura 1, ou

b) que apresenta, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência mencionada em a) e por conferir, quando se encontra presente no citoplasma de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta.

4\*. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou mitocondrial vegetal recombinado de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por compreender uma sequência de ADN esterilidade Ogura, que é suportada por uma sequência delimitada pelos nucleotídeos com os números 928 e 1569 na Figura 1, ou por apresentar, pelo menos, 50% de homologia com a referida sequência.

5\*. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou mitocondrial de acordo com qualquer das reivindicações 3 e 4, caracterizado por o referido genoma recombinado não compreender todo ou parte de um e/ou de outro dos dois fragmentos do genoma Ogura:

- que suporta um dos dois genes do ARN de transferência formilmetionina que serve para o início da tradução,

- que suporta o gene *cox1*, sendo codificado por isso sob a unidade 1 do citocromo-oxidase,

ou no qual os referidos fragmentos são inactivos.

6\*. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou

mitocondrial de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 5, caracterizado por ser desprovido de uma parte da sequência que é suportada por um fragmento de 10,7 kb, após digestão por Bgl1 e um fragmento de 11 kb após digestão por Nru1, revelados por hibridação com uma sonda cox1.

7ª. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou mitocondrial de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 6, caracterizado por ser desprovido de uma parte da sequência que, após digestão por Nru1, dá um fragmento de 15 kb, após digestão por Sal1 dá um fragmento de 5,1 kb e após digestão por Bgl1 dá um fragmento de 18,5 kb e que é revelado por hibridação com uma sonda correspondente à sequência compreendida entre as bases 389 a 1199 da sequência representada na Figura 1.

8ª. - Processo de obtenção de um genoma nuclear ou mitocondrial de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 7, caracterizado por compreender uma sequência que, após digestão por Nco1 dá um fragmento de 2,5 kb, após digestão por Nru1 dá um fragmento de 6,8 kb e após digestão por Sal1 dá um fragmento de 4,4 kb.

9ª. - Processo de obtenção de um genoma nuclear, caracterizado por compreender, além da sequência de ADN de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, uma pré-sequência que permite a importação para as mitocôndrias do

produto de tradução da referida sequência.

10\*. - Processo de obtenção de um genoma de acordo com qualquer das reivindicações 3 a 8, caracterizado por ser um genoma mitocondrial.

11\*. - Processo de obtenção de uma mitocôndria, caracterizado por compreender um genoma de acordo com a reivindicação 10.

12\*. - Processo de obtenção de um citoplasma, caracterizado por compreender um genoma mitocondrial de acordo com a reivindicação 10 e por compreender cloroplastos da mesma espécie que o genoma nuclear ou de uma outra espécie, mas compatíveis com este genoma nuclear.

13\*. - Processo de obtenção de uma planta pertencente ao género Brassica, caracterizado por a referida planta conter cloroplastos de Brassica compatíveis com o genoma nuclear da referida planta e mitocôndrias de acordo com a reivindicação 11.

14\*. - Processo de obtenção de uma planta pertencente ao género Brassica, caracterizado por o genoma nuclear da referida planta compreender um genoma obtido de acordo com a reivindicação 9, assim como elementos que asseguram a sua expressão e o transporte do produto de tradução na mitocôndria.

15\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica napus*.

16\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica oleracea*.

17\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica campestris*.

18\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica juncea*.

19\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica nigra*.

20\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica hirta*.

21\*. - Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por a referida planta pertencer à espécie *Brassica carinata*.

22<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por a referida planta pertencer a uma das espécies seguintes: *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* e *B. carinata*.

23<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 22, caracterizado por a referida planta ser obtida por fusão de protoplastos.

24<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 22, caracterizado por a planta ser obtida por reprodução sexuada.

25<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 21, caracterizado por a referida planta ser obtida por transferência de gene na mitocôndria.

26<sup>a</sup>. - Processo para a preparação de plantas híbridas, caracterizado por se cruzar uma planta que apresenta o caracter citoplasma masculino estéril de acordo com qualquer das reivindicações 13 a 25, com uma planta da mesma espécie que, eventualmente, possui um gene restaurador de fertilidade Rf1.

27<sup>a</sup>. - Processo de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por se utilizar uma sonda de ADN que contém uma sequência de, pelo menos, 10 bases da sequência compreendida

entre os nucleotídios com os números 928 e 1569 representados na Figura 1, marcada por um meio radioactivo ou não.

Lisboa,

PELA REQUERENTE

O AGENTE OFICIAL

- R E S U M O -

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE ADN QUE CONFERE UMA ESTERILIDADE MASCULINA CITOPLASMÁTICA, DE UM GENOMA MITOCONDRIAL, DE UM GENOMA NUCLEAR, DE UMA MITOCÔNDRIA, DE UMA PLANTA QUE CONTEM ESTA SEQUÊNCIA E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HÍBRIDOS"

O presente invento refere-se a um processo de obtenção de uma sequência de ADN esterilidade Ogura que confere, quando se encontra presente no citoplasma de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática á referida planta. Refere-se também à obtenção de um genoma mitocondrial, de um genoma nuclear, de uma mitocôndria e de um citoplasma que contem esta sequência. Refere-se ainda à obtenção de uma planta do género Brássica contendo este genoma e a um processo para a preparação de plantas híbridas utilizando uma tal planta, assim como a um híbrido assim obtido.



|   |   | F     |   |   |        |
|---|---|-------|---|---|--------|
|   |   | Cn    |   | E | MBS    |
| B | M | AvuBF | M | C | RasnRS |
| b | s | li4sa | n | O | seaasp |
| v | e | uJHmu | l | N | aIABal |
| I | I | IIIII | I | I | IIIII  |
|   |   | //    |   |   | //     |

|   |     |  |     |   |   |   |
|---|-----|--|-----|---|---|---|
|   |     |  | B   |   |   |   |
|   | E   |  | s   |   |   |   |
|   | F c |  | p   |   |   | N |
|   | n o |  | lM  |   | B | l |
| M | u P |  | 2aB | M | s | a |
| w | 4 1 |  | 8eb | w | p | I |
| o | H 5 |  | 6lv | o | M | I |
| I | I I |  | III | I | I | I |
|   |     |  | /   |   |   |   |

|     |  |            |   |   |     |
|-----|--|------------|---|---|-----|
|     |  | F F        |   |   | E   |
|     |  | CnBn C     |   |   | cBS |
| M B |  | AvusuPAvS  | B | S | osc |
| n b |  | li4p4slif  | b | f | Rar |
| l v |  | uJHCHtuJe  | v | e | IJF |
| I I |  | IIIIIIIIII | I | I | III |
|     |  | // //      |   |   |     |

|    |    |    |     |   |   |    |   |
|----|----|----|-----|---|---|----|---|
| B  |    |    |     |   |   |    |   |
| s  |    |    |     |   |   |    |   |
| p  | S  | H  | C   |   |   |    |   |
| 1H | Ba | Ca | f   | C |   |    | M |
| 2g | su | ve | rMM | v | F | HT | E |
| 81 | p9 | iI | lns | i | a | hh | a |
| 6A | C6 | JI | 0lp | J | u | aa | r |
| II | II | II | III | I | I | II | I |
| /  |    | /  | /   |   | / |    |   |

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

481 TAAGGGATAGCTGTTTAACCATTGTGAATGGAATGGGATGTTGATCCTCCTTGGAAATAAT 540  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ATTCCTTATCGACAAATTGGTAAACATTACCTTACCCTACAACCTAGGAGGAACCTTATTA

FIG. 1

MBS M X M n  
asn M X bB T uS  
ēaa m m os a 4p  
IAB e n Ir q Hi  
III I I II I II  
/  
ACGTATATAAGAAGATTTTCATTCCAGTTGGAAAGCAATCGAGAAAACGCCGCCAAATA  
-----+-----+-----+-----+-----+ 600  
TGCATATATTCTTCTAAAAGTAAGGTCAACCTTTCGTTAGCTCTTTTGCGGCGGGTTTAT  
  
A  
fBM C HB B  
lsaP v P is NT M MBsM  
Iaem i l np rh l ssmc  
IAIl J e fM ua y paAr  
IIII I I II II I IIII  
// / //  
CGCTTCGCCACGTGTAGCCCTGTATGGACTCGCGAAGCAGGTCTCCGGTCCGGTGTCCAAG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 660  
GCGAAGCGGTGCACATCGGGACATACCTGAGCGCTTCGTCCAGAGGCCAGCCACAGGTTTC  
  
S  
a MBS  
u D M asnB  
3 p n eaab  
A n l IABv  
I I I IIII  
/  
ATTTGATCTAACTATTGAGTGAGGACTACTTACCGATTGATAGAATAATACGTATATAAG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 720  
TAAACTAGATTGATAACTCACTCCTGATGAATGGCTAACTATCTTATTATGCATATATTC  
  
F S  
Cn M a T H H  
Avu b u D T sM Ha i  
li4 o 3 p a ps he n  
uJH I A n q Ee aI f  
III I I I II II I  
//  
AAGAAGCTGCTTTGTGGAGTGATCTTTCTCGAAATGAATTAAGTAAGGCGCTATGTTTCAG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 780  
TTCTTCGACGAAACACCTCACTAGAAAGAGCTTTACTTAATTCATTCCGCGATACAAGTC  
  
E  
A D C c B  
T l r MSM v M o sA  
f w d npa i w 5 av  
i N I lee J o 7 Ja  
I I I III I I I II  
ATTCTGAACCAAAGCACTAGTTGAGGTCTGAAGCCTTATGAGCAGAAGTAATAAATACCT  
-----+-----+-----+-----+-----+ 840  
TAAGACTTGGTTTCGTGATCAACTCCAGACTTCGGAATACTCGTCTTCATTATTTATGGA

## FIG. 1

841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900  
GCCCTTCTTCGCCCCATCTCCTTAACCAGTTGAGTAGTCCGAGTACTGGACTTCTAATG

901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960  
TCCAAGTTT TAGGACAGGGGCGTGGCATCAAAGTAAGACGTAGTGAGAGGGACAGCAATAG

[illegible]

1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
TATATTTACGTTACTAATGGAAAAAGCTTTTTTAACAGGTGAAAAACAGTATTAGAGTGAG

1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
GATGACTTACATTTC AATCACATTATTCAAAGAAAGAAAATCGAAAAAATGATTACCGGG

FIG\_1

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

1441 AGAAAATAATGCTTTGTGAACCCAATTGCTTTGACAAAAATAAAGAAAGAAGCAAAATCT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500  
 TCTTTTATTACGAAACACTTGGGTAAACGAAACTGTTTTATTCTTTCTTCGTTTTAGA

|   |   |      |   |  |  |     |
|---|---|------|---|--|--|-----|
|   |   |      | S |  |  | N   |
| T |   | BB a | M |  |  | l   |
| s | E | gsDu | b |  |  | a X |
| p | a | ltp3 | o |  |  | I c |
| E | r | IYnA | I |  |  | I m |
| I | I | IIII | I |  |  | I I |
|   |   | / /  |   |  |  |     |

1501 CATTCAATTTGAAATAGAAGAGATCTCTATGCCCCCTGTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560  
 GTAAGTTAAACTTTATCTTCTCTAGAGATACGGGGGACAAGAACCAAAAGAGGGTACGAA

|   |  |    |  |   |     |
|---|--|----|--|---|-----|
| H |  |    |  |   |     |
| i |  | M  |  |   | C   |
| n |  | bS |  | M | M v |
| c |  | of |  | n | a i |
| I |  | Ie |  | l | e J |
| I |  | II |  | I | I I |

1561 TTGTTGGTCAACAACCAACCACAACCTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGAC  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1620  
 AACAACCAGTTGTTGGTTGGTGTGAAAGATATCAAGAAGTGATGAGGATCTCCGAAC TG

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

1621 GGAGTGAAGCTGTCTGGAGGGAATCATTTTGTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCA  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1680  
 CCTCACTTCGACAGACCTCCCTTAGTAAAACAACCTTTAGTTAATTAGATTAGTACGGAGT

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

1681 ACTGGATAAATTCACCTTATTTTTCACAATTCTTCTGGTTATGCCTTTTCTTCTTTACTTT  
 -----+-----+-----+-----+-----+ 1740  
 TGACCTATTTAAGTGAATAAAAAGTGTTAAGAAGACCAATACGGAAAAGAAGAAATGAAA

FIG. 1

[illegible][illegible]

|      |                                                                       |   |  |   |  |   |  |   |      |
|------|-----------------------------------------------------------------------|---|--|---|--|---|--|---|------|
|      | S                                                                     |   |  |   |  |   |  |   |      |
|      | BB a                                                                  | M |  |   |  |   |  | B |      |
|      | gsDu                                                                  | b |  | B |  | M |  | s |      |
|      | ltp3                                                                  | o |  | s |  | a |  | t |      |
|      | IYnA                                                                  | I |  | r |  | e |  | B |      |
|      | IIII                                                                  | I |  | I |  | I |  | I |      |
|      | / /                                                                   |   |  |   |  |   |  |   |      |
|      | GGAAGATCTCTTGAGAAAAGGTTTTAGCACTGGTGTATCCTATATGTATGCTAGTTTATT          |   |  |   |  |   |  |   |      |
| 1861 | - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + - - - - + |   |  |   |  |   |  |   | 1920 |
|      | CCTTCTAGAGAACTCTTTTCCAAAAATCGTGACCACATAGGATATACATACGATCAAATAA         |   |  |   |  |   |  |   |      |

[illegible]

D C  
M vB  
P n is  
n l Ji  
I I II

GATCTCTTGTTTCGGAGAAATAAGTGGCTCACGAGGAATGGAAGAACATATTATATAA  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
CTAGAGAACAAGCCTCTTTATTCAACCGAGTGCTCCTTACCTTTCTTTGTATAATATATT

1981 2040

FIG. 1

2041

|   |    |
|---|----|
| N |    |
| l |    |
| a | XR |
| I | CS |
| I | ma |
| I | II |

2101

E C O N I M N L I

2161

2221

2281

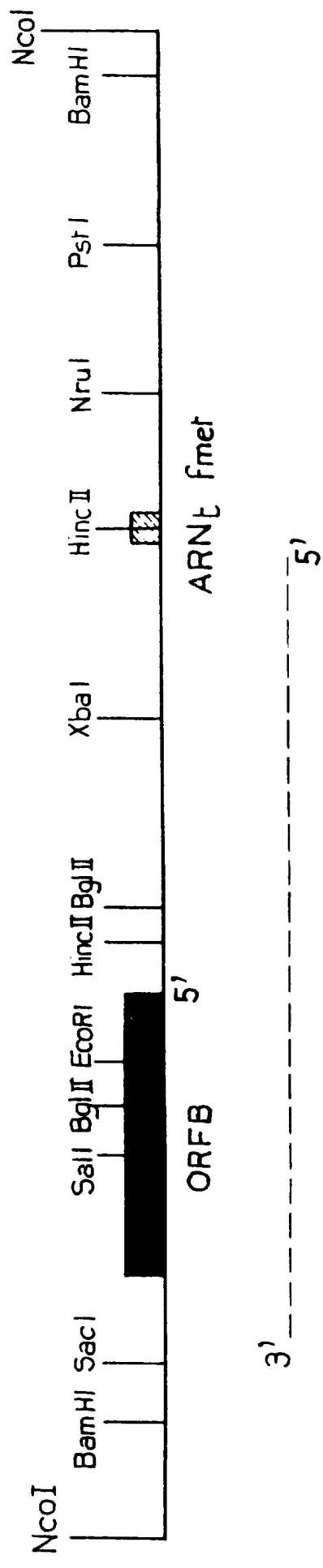
PIG-1

|     | 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 |
| plF | a | C | uJ | u    | JaIIia | 3II | Aq r | I rl |
| III | I | I | II | I    | IIIIII | IVI | II I | I II |
| //  |   | / |    | / // | /      |     |      | /    |

CCCGGGCAGAAAGCTCATTTCTGAACCGCGGGAACCTTCGTCTCTTCGACACAAAACGTTTT  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400

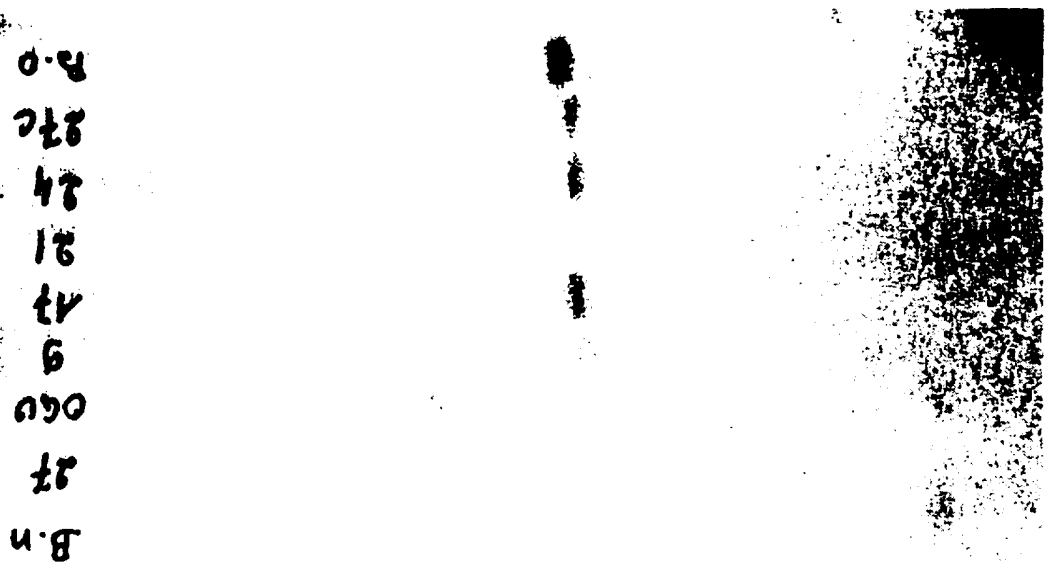
2341 GGGCCGCGTCTTCGAGTAAGACTTGCGGCCCTTGAAGCAGAGAAGCTGTGTTTGCAAAA

2428 ← 1

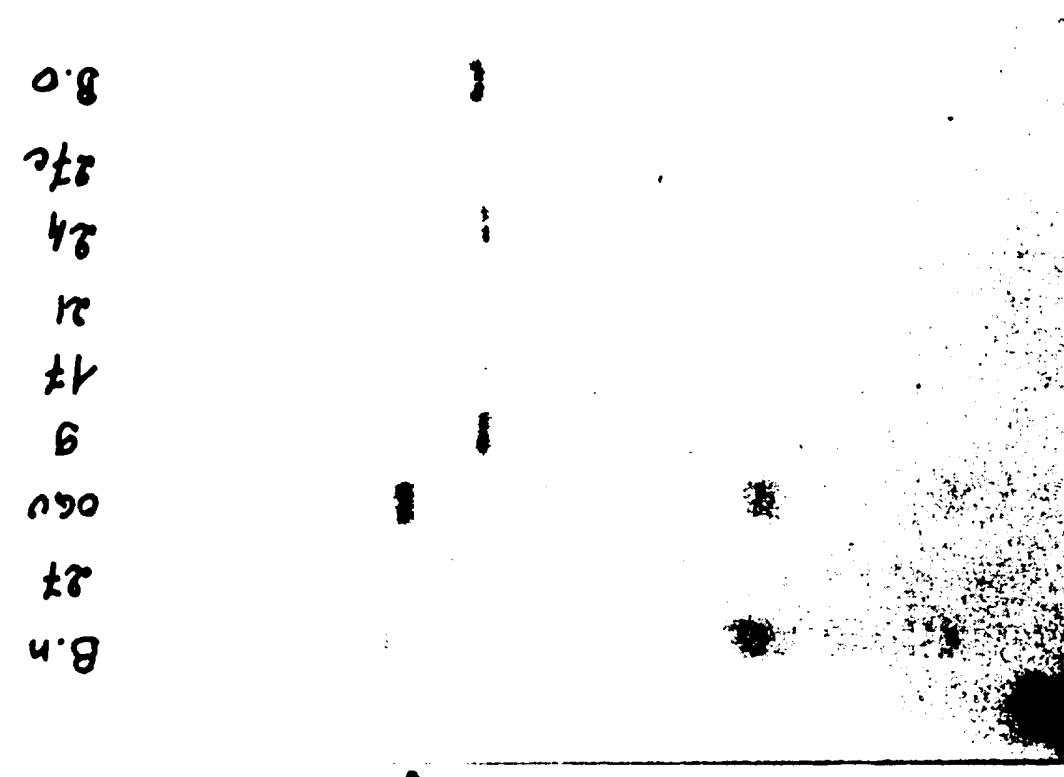


100pb

FIG. 2



Bgl I (a)



Nru I (b)

FIG. 3

B.n. 27 06v 9 17 21 24 27c B.o



Sal I

FIG.4

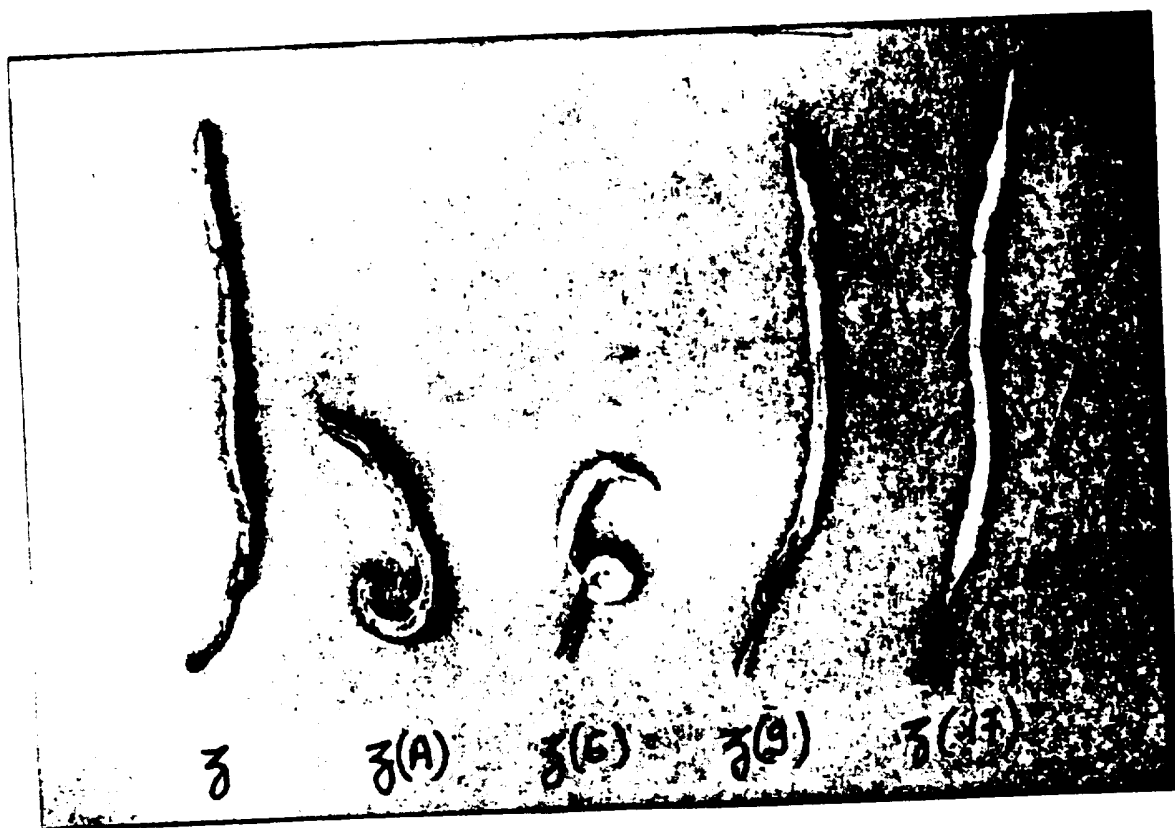


FIG. 5

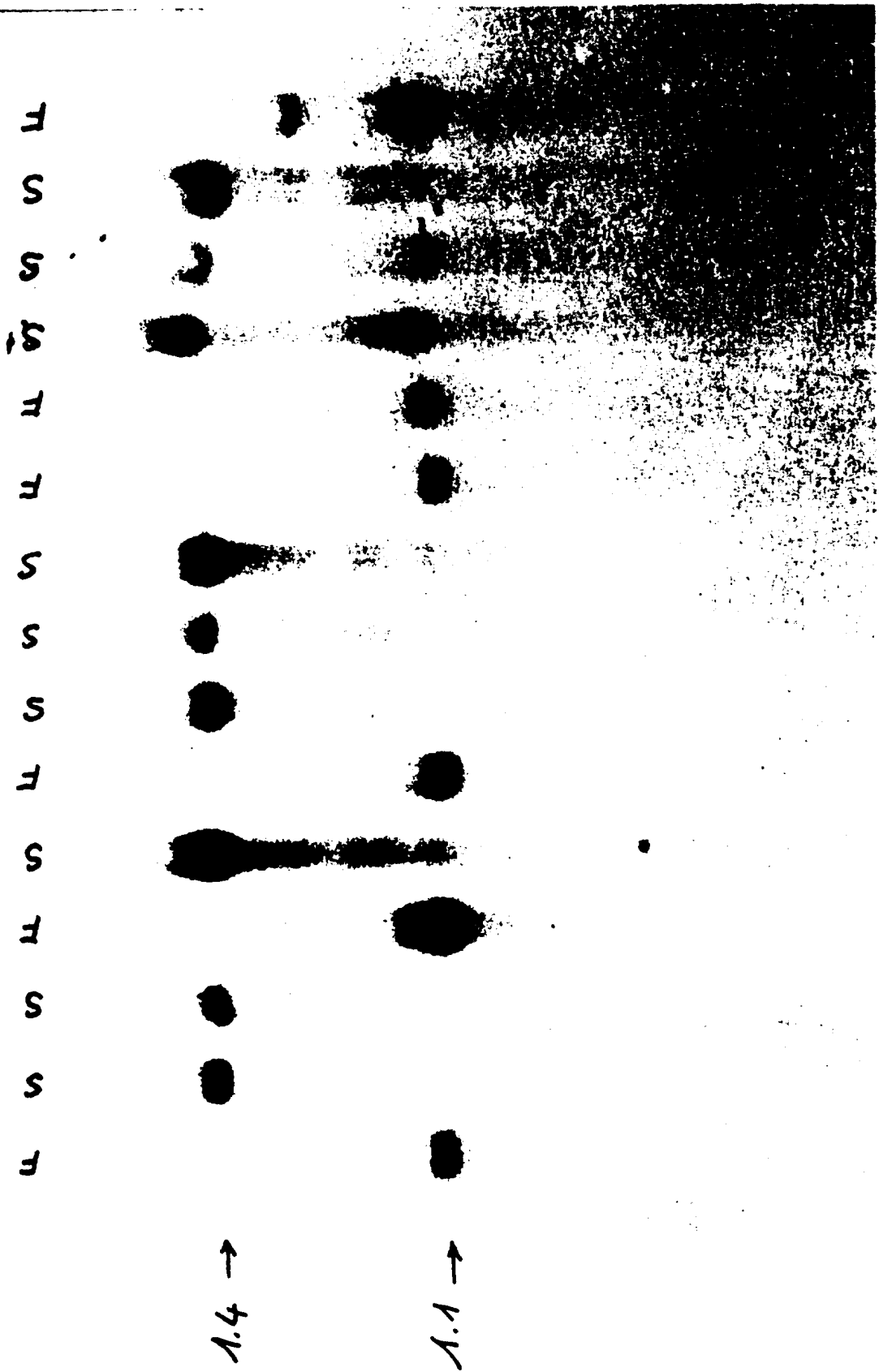


FIG. 6

6/11

1991/09/28 11:53:00

- R E S U M O -

"PROCESSO DE OBTENÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA DE ADN QUE CONFERE UMA ESTERILIDADE MASCULINA CITOPLASMÁTICA, DE UM GENOMA MITOCONDRIAL, DE UM GENOMA NUCLEAR, DE UMA MITOCÔNDRIA, DE UMA PLANTA QUE CONTEM ESTA SEQUÊNCIA E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HÍBRIDOS"

O presente invento refere-se a um processo de obtenção de uma sequência de ADN esteriliada Ogura que confere, quando se encontra presente no citoplasma de uma planta, uma esterilidade masculina citoplasmática à referida planta. Refere-se também à obtenção de um genoma mitocondrial, de um genoma nuclear, de uma mitocôndria e de um citoplasma que contem esta sequência. Refere-se ainda à obtenção de uma planta do género Brassica contendo este genoma e a um processo para a preparação de plantas híbridas utilizando uma tal planta, assim como a um híbrido assim obtido.