



(22) Date de dépôt/Filing Date: 1991/09/20
(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 1992/04/02
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/06/01
(62) Demande originale/Original Application: 2 092 097
(30) Priorité/Priority: 1990/09/21 (FR90/11670)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A01H 5/00* (2006.01),
A01H 1/02 (2006.01), *C07H 21/00* (2006.01)

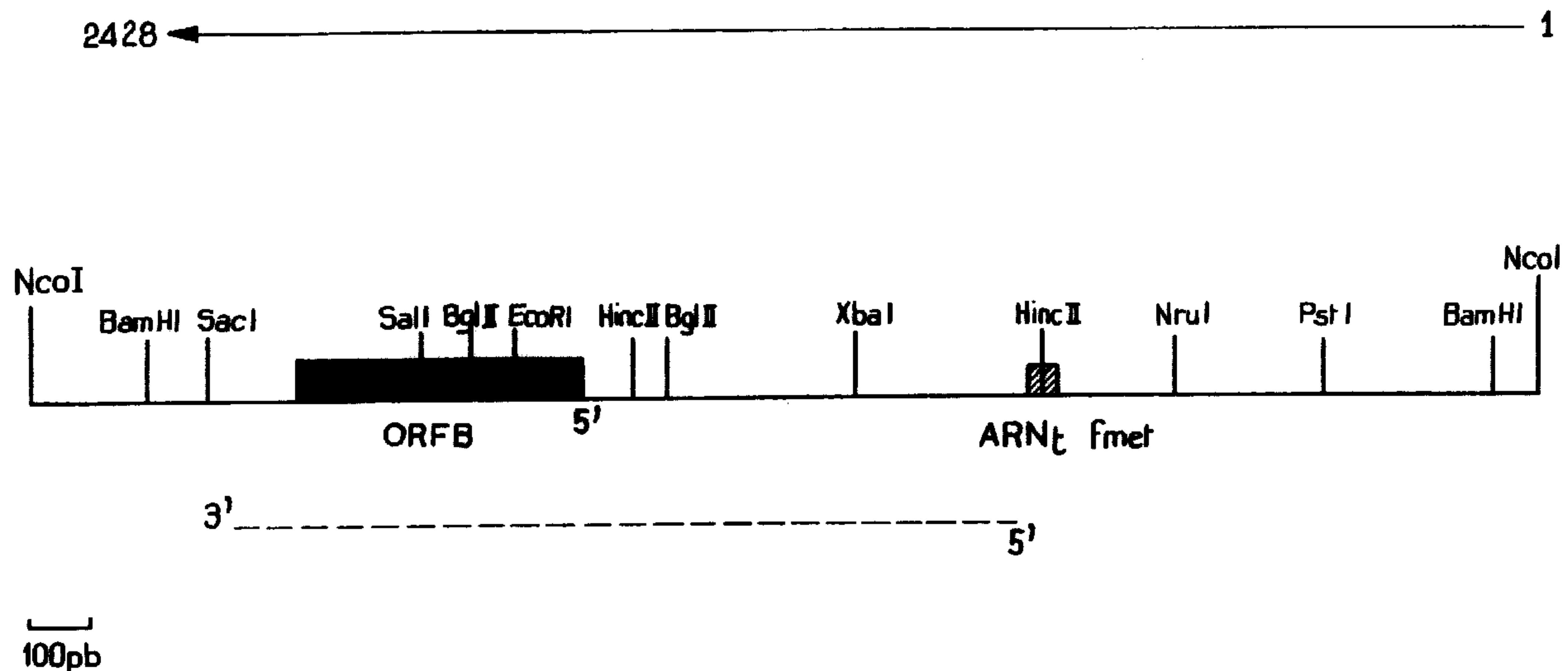
(72) Inventeurs/Inventors:
BONHOMME, SANDRINE, FR;
BUDAR, FRANCOISE, FR;
LANCELIN, DOMINIQUE, FR;
PELLETIER, GEORGES, FR

(73) Propriétaire/Owner:
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE, FR

(74) Agent: OGILVY RENAULT LLP/S.E.N.C.R.L.,S.R.L.

(54) Titre : SEQUENCE D'ADN CONFERANT UNE STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE, GENOME MITOCHONDRIAL, GENOME NUCLEAIRE, MITOCHONDRIE ET PLANTE CONTENANT CETTE SEQUENCE, ET PROCEDE DE PREPARATION D'HYBRIDES

(54) Title: DNA SEQUENCE IMPARTING CYTOPLASMIC MALE STERILITY, MITOCHONDRIAL GENOME, NUCLEAR GENOME, MITOCHONDRIA AND PLANT CONTAINING SAID SEQUENCE AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF HYBRIDS



(57) Abrégé/Abstract:

La présente invention concerne une séquence d'ADN stérilité Ogura qui confère lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante. Elle concerne également un génome mitochondrial un génome nucléaire, une mitochondrie et un cytoplasme contenant cette séquence. Elle concerne aussi une plante appartenant au genre Brassica contenant ce génome et un procédé de préparation de plantes hybrides utilisant une telle plante, ainsi qu'un hybride ainsi obtenu.



PRECIS DE DIVULGATION

La présente invention concerne une séquence d'ADN stérilité Ogura qui confère lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante. Elle concerne également un génôme mitochondrial un génôme nucléaire, une mitochondrie et un cytoplasme contenant cette séquence. Elle concerne aussi une plante appartenant au genre Brassica contenant ce génôme et un procédé de préparation de plantes hybrides utilisant une telle plante, ainsi qu'un hybride ainsi obtenu.

1

**SEQUENCE D'ADN CONFERANT UNE STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE,
GENOME MITOCHONDRIAL, GENOME NUCLEAIRE, MITOCHONDRIE ET
PLANTE CONTENANT CETTE SEQUENCE, ET PROCEDE DE PREPARATION
D'HYBRIDES**

La présente invention se rapporte à un matériel biologique possédant une stérilité mâle utile pour le développement de variétés hybrides d'espèces d'intérêt agronomique.

5 Elle concerne en particulier une plante appartenant à la famille des cruciféracées dont le cytoplasme des cellules contient des organites possédant des séquences nucléotidiques conférant une stérilité mâle et de bonnes caractéristiques agronomiques.

10 Le développement de variétés hybrides peut être facilité ou rendu possible par l'utilisation d'un système de stérilité mâle cytoplasmique. Les hybrides sont obtenus par la fécondation croisée entre deux populations parentales, l'une jouant le rôle de mâle, l'autre de femelle. L'un des écueils rencontrés lorsque l'on souhaite obtenir des variétés hybrides de qualité uniforme par croisement sexué sur des espèces autogames, est la capacité de la plante à s'auto-polliniser. Les systèmes de
15 stérilité mâle permettent d'obtenir des plantes femelles incapables de s'autoféconder et sur lesquelles après pollinisation on peut récolter directement les graines qui sont toutes hybrides sans avoir recours à des techniques laborieuses telle que la castration des fleurs.

20 Parmi les déterminants génétiques de la stérilité mâle, il en est qui sont portés par le cytoplasme. A chaque génération sexuée ils sont transmis exclusivement par la mère. On obtient ainsi 100 % de mâle-stériles à chaque génération avec un système de stérilité-mâle cytoplasmique (CMS). Ces déterminants génétiques sont portés par le génôme des mitochondries.

25 Un système de stérilité mâle cytoplasmique approprié chez les cruciféracées est défini par les caractéristiques suivantes :

- 30 1) La stérilité mâle doit être totale, c'est à dire que quelles que soient les conditions de culture et quelle que soit la lignée que l'on veut utiliser comme parent femelle, il ne doit pas y avoir de production de pollen. Dans le cas contraire, les graines récoltées sur ces plantes femelles seraient en partie issues d'autofécondation et ne seraient donc pas du type hybride FI.

- 2) La production de ces graines doit être réalisée en profitant des vecteurs naturels du pollen, c'est à dire dans le cas de ces espèces des hyménoptères, des diptères, et le vent. Le pollen doit être transporté des plantes pollinisatrices sur les plantes mâle-stériles (femelles). En fait seuls les insectes peuvent assurer ce transport à distance chez les cruciféracées.

Les plantes femelles, par conséquent, doivent être suffisamment attractives pour les insectes qui viennent y chercher le nectar. La morphologie des fleurs doit contraindre l'insecte à effectuer cette recherche par le sommet de la fleur de façon à ce que son thorax, principalement, entre en contact avec le stigmate. Pratiquement cela revient à dire que la base des pétales doit former une sorte de tube autour de la base du pistil.

- 3) La morphologie des organes femelles (pistil) doit être identique à celle d'une plante fertile, en particulier un seul pistil par fleur et de forme rectiligne. En effet, il arrive souvent que des stérilités mâles se traduisent aussi par une féminisation des anthères qui se transforment en pseudopistils et même par la transformation des nectaires en fleurs complètes. Il arrive aussi que le ou les pistils ainsi produits soient déformés. Toutes ces aberrations ne permettent pas une bonne production de graines, et l'on peut parler d'une certaine stérilité femelle.

- 4) Pour la production de variétés hybrides F1 chez les espèces dont on récolte les graines, comme le colza ou les moutardes, il est indispensable que le parent mâle de l'hybride annule totalement l'effet du cytoplasme mâle stérile, de telle sorte que les plantes hybrides soient facilement pollinisées.

Chez les Cruciféracées le premier cas de cytoplasme mâle stérile ou CMS a été décrit par Ogura (1968) chez le radis, *Raphanus sativus*. Bannerot (1974, 1977) a transféré le cytoplasme Ogura chez les Brassicacées, obtenant ainsi des plantes qui possèdent une stérilité mâle cytoplasmique. Ces mêmes plantes ne présentaient pas des caractéristiques agronomiques satisfaisantes (chlorose lors de l'abaissement des températures, mauvaise fertilité femelle) d'où un mauvais rendement les rendant inaptes à l'utilisation commerciale.

Chez les crucifères pour éviter cette chlorose, il convient d'associer dans la même cellule les génomes nucléaires et chloroplastiques d'un même genre. Ainsi des plantes de Brassicacées possédant l'un des génomes chloroplastiques des Brassicacées ne présentent plus de chlorose. Si elles possèdent la totalité du génome mitochondrial Ogura elles présentent une stérilité mâle cytoplasmique totale mais cependant les fleurs auront une morphologie aberrante rendant impossible leur pollinisation par les vecteurs naturels.

En outre, pour les espèces où l'intérêt réside dans les graines, il convient de restaurer la fertilité mâle des variétés hybrides que l'on commercialise par l'intermédiaire de gènes nucléaires dits restaurateurs.

Il est difficile de restaurer la fertilité mâle de plantes possédant la totalité du génome mitochondrial Ogura car il est nécessaire de faire intervenir simultanément plusieurs gènes restaurateurs.

Nous nous sommes proposé d'obtenir un système de stérilité mâle approprié en éliminant les gènes responsables des caractères indésirables du cytoplasme Ogura tout en gardant une stérilité mâle efficace et facile à restaurer.

C'est pourquoi la présente invention se rapporte à une séquence d'ADN que nous appellerons "stérilité Ogura", caractérisée en ce que :

a) elle est portée par une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1, ou

b) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),

et confère, lorsqu'elle est présente dans le génome mitochondrial ou nucléaire d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

En particulier, la présente invention a pour objet une séquence d'ADN stérilité Ogura, caractérisée en ce que :

- c) elle est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, ou
 - 5 d) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en c)
- et en ce qu'elle est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles

10 La présente invention a également pour objet une cellule de plante comportant une séquence d'ADN stérilité Ogura, caractérisée en ce que ladite séquence est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, ou en ce que ladite séquence présente au moins 50 % d'identité avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, et en ce que ladite séquence est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles.

15 La présente invention a également aussi pour objet une culture cellulaire de plante caractérisée en ce qu'elle comporte des cellules telles que définies plus haut.

La présente invention a également pour objet une culture cellulaire comportant des cellules telles que définies ci-haut, lesdites cellules étant capable de régénérer une plante.

20 La présente invention a pour objet une méthode de préparation d'une plante de stérilité mâle cytoplasmique, ladite méthode comprenant :

- transformer des cellules de plantes avec une séquence d'ADN comprenant une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 de la figure 1 ; et
- 25 - régénérer ladite plante à partir desdites cellules transformées.

La présente invention a également pour objet une méthode de préparation d'une plante de stérilité mâle cytoplasmique, ladite méthode comprenant :

- fusionner des protoplastes obtenus à partir de (i) cellules telles que définies ci-haut ou à partir de culture cellulaire telles que définies ci-haut avec des (ii) protoplastes d'une espèce compatible;
- 30 - cultiver les protoplastes fusionnés pour régénérer ladite plante.

Dans ce qui suit, on se référera aux figures suivantes :

FIGURE 1 : Séquence nucléotidique du fragment d'ADN mitochondrial de radis Ogura portant le caractère CMS.

FIGURE 2 : Carte de restriction du fragment d'ADN mitochondrial décrit
5 fig. 1.

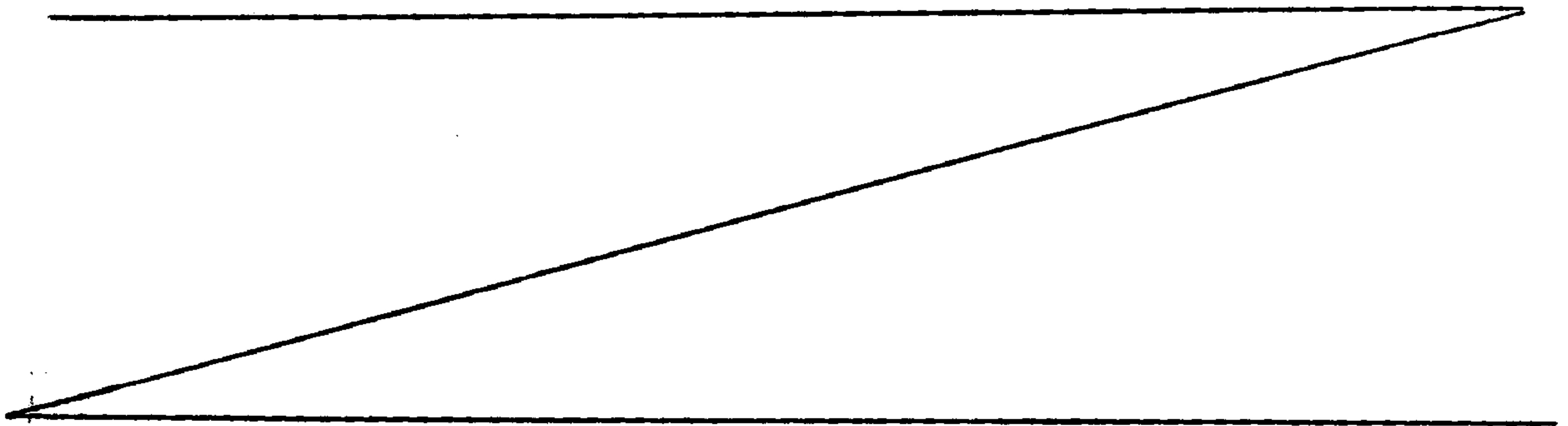
FIGURE 3 : Electrophorèse d'ADN mitochondrial après digestion par BglI (3a) et NruI (3b). Les bandes révélées correspondent à une hybridation avec une sonde CoxI. (Hiesel et al. 1987).

FIGURE 4 : Electrophorèse d'ADN mitochondrial après digestion par SalI.
10 Les bandes révélées correspondent à une hybridation avec une sonde délimitée par les nucléotides n° 389 et 1199 de la séquence décrite fig. 1.

FIGURE 5 : Fruits produits par des plantes de chou portant différents génômes cytoplasmiques.

FIGURE 6 : Electrophorèse d'ARN mitochondrial. Les bandes révélées
15 correspondent à une hybridation avec une sonde, fragment EcoRI - Bam HI, incluant une partie de la séquence dite ORF B.

La séquence d'ADN stérilité Ogura est définie par rapport à la séquence délimitée par les nombres 1 et 2428 sur la figure 1. Elle est portée par une séquence transcrite dont les extrémités 3' et 5' sont reliées
20 par un pointillé sur la figure 2, et qui est observée uniquement chez les plantes mâle-stériles. ORF B correspond à un cadre de lecture ouvert ; cette appellation a été donnée d'après l'homologie observée avec une séquence décrite par Brennicke. Sur la figure 2, on a représenté en hachuré la séquence correspondant à l'un des deux gènes de l'ARN de transfert
25 formylméthionine.



La séquence d'ADN délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 2273 sur la figure 1 correspond à un transcrit qui peut être visualisé par hybridation moléculaire (1,4) comme on le voit sur la figure 6. Sur cette figure 6, chaque puits correspond à une plante fertile (F) ou mâle-stérile (S). Seules les plantes mâle-stériles synthétisent un transcrit d'environ 1400 bases. Ce transcrit débute à la position 928 (± 10 bases) de la séquence figure 1 et se termine à la position 2273 (± 5) (l'initiation et l'arrêt de transcription peuvent se produire à différentes positions dans les mitochondries végétales).

De manière préférée, la présente invention se rapporte à un cytoplasme comportant une séquence d'ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1 conférant le caractère CMS ou un cytoplasme comportant une séquence d'ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, et transcrite en ARN, conférant le caractère CMS et caractérisé en ce qu'il comporte :

- des chloroplastes de la même espèce que le génôme nucléaire ou d'une autre espèce mais compatibles avec ce génôme nucléaire,
- ne comporte pas tout ou partie de l'un ou l'autre (ou des deux) fragments du génôme mitochondrial Ogura, défini ci-après :
 - . portant l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formyl-méthionine servant à l'initiation de la traduction,
 - . portant le gène Cox1, codant pour la sous unité n° 1 de la cytochrome oxydase.

L'absence de ces fragments, dits "séquences indésirables", est nécessaire pour obtenir des génômes mitochondriaux correspondant à une stérilité mâle de bonne qualité, répondant aux 4 caractéristiques définies plus haut.

Selon un autre de ses aspects, l'invention se rapporte à un génôme nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura,

a) qui est portée par une séquence d'ADN comprise entre les nucléotides 928 et 2273 de la séquence représentée sur la figure 1, ou

b) qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en a),
et confère lorsqu'il est présent dans le cytoplasme d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

5 En particulier, l'un des objets de la présente invention, est un génôme nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura,

c) qui est portée par une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1,

10 d) qui présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en c)

et confère, lorsqu'elle est présente dans le cytoplasme d'une plante et est transcrite en ARN, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

15 Un génôme nucléaire ou mitochondrial selon l'invention peut être caractérisé en ce que ledit génôme recombiné est dépourvu de tout ou partie des fragments de génôme Ogura :

- portant l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine servant à l'initiation de la traduction,
- portant le gène *cox1*, codant pour la sous unité n°1 de la cytochrome oxydase,

20 ou dans lequel lesdits fragments sont inactifs.

Plus précisément, un génôme nucléaire ou mitochondrial recombiné selon l'invention peut être caractérisé:

25 1) en ce qu'il est dépourvu de tout ou partie d'un fragment d'environ 10,7 kb après digestion par *Bgl*I ou d'un fragment d'environ 11 kb après digestion par *Nru*I, porteurs du gène *cox1*.

Ceci est mis en évidence notamment sur la figure 3, par hybridation moléculaire avec une sonde portant la séquence *Cox1*.

30 2) en ce qu'il est dépourvu de tout ou partie d'un fragment de 5,1 kb après digestion par *Sal*I, ou d'un fragment d'environ 15 kb après digestion par *Nru*I, ou environ 18,5 kb après digestion par *Bgl*I, porteurs de l'un des deux gènes de l'ARN de transfert formylméthionine.

Ceci est mis en évidence notamment sur la figure 4, par

hybridation moléculaire avec une sonde délimitée par les nucléotides n° 389 et 1199 de la séquence décrite figure1.

Sur les figures 3 et 4, les génotypes désignés par des chiffres correspondent à des plantes présentant un système de stérilité mâle cytoplasmique approprié.

	GENOTYPES	CHLOROPLASTES	MITOCHONDRIES
	B.n	B. napus	B. napus
	27	B. napus	B. napus/Ogura
10	OGU.	R. sativus (OGU)	R. sativus (OGU)
	9, 17, 21, 24, 27c	B. oleracea	B. oleracea/Ogura
	B.o	B. oleracea	B. oleracea

Par ailleurs, l'existence d'un catactère CMS de bonne qualité nécessite la présence d'une séquence d'ADN qui peut être repérée par des hybridations ADN/ADN sur des digestions. C'est ainsi que la présente invention se rapporte à une séquence d'ADN telle qu'elle a pu être définie et caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence qui après digestion par NcoI donne un fragment de 2,5 kb, après digestion par NruI donne un fragment de 6,8 kb, et après digestion par Sall donne un fragment de 4,4 kb.

Cette séquence peut également être repérée par des hybridations sur l'ARN total de plantes mâle-stériles. Un transcrit d'environ 1400 paires de bases est mis en évidence. Il est absent des plantes retournant à la fertilité.

La définition des séquences nucléotidiques "indésirables" et de séquences nucléotidiques "indispensables" à une stérilité Ogura selon l'invention permet de sélectionner, par des techniques d'hybridation d'ADN connues de l'homme de métier, un matériel végétal portant des chloroplastes compatibles avec le génôme nucléaire et portant des mitochondries de bonne qualité sans attendre d'avoir une plante adulte et l'apparition des fleurs et des fruits. On a donc un outil très performant pour sélectionner des plantes possédant un cytoplasme mâle-stérile ayant de bonnes caractéristiques agronomiques.

Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à une mitochondrie caractérisée en ce qu'elle contient une séquence nucléotidique correspondant à un ADN présentant au moins 50 % d'homologie avec la séquence délimitée par les bases numérotées 928 et 2273 sur la figure 1 et
5 codant pour la stérilité mâle cytoplasmique d'Ogura ; ou bien la mitochondrie contient une séquence d'ADN portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 à 1569 de la figure 1 ou présentant 50 % d'homologie avec cette séquence, et qui est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles. Cet ADN peut présenter en outre
10 les caractéristiques définies plus haut, notamment l'absence des séquences indésirables.

La présente invention se rapporte également à un cytoplasme de Cruciféracée, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN "stérilité Ogura" présente dans le génôme mitochondrial ; ce cytoplasme
15 contient en outre des chloroplastes de la même espèce ou d'une autre espèce mais compatibles avec le génôme nucléaire.

La séquence stérilité Ogura est caractérisée en ce que :

- a) elle est portée par la séquence d'ADN de 2428 paires de bases représentée sur la figure 1,
- 20 b) elle est délimitée par les nucléotides 928 et 2273 de la figure 1 et correspond à un transcrit indiqué par les pointillés figure 2 et visualisé par hybridation moléculaire (1,4) figure 6,
- c) elle présente au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence mentionnée en b), et confère lorsqu'elle est présente dans le génôme
25 mitochondrial d'une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante,
- ou
- d) elle est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 à 1569 de la figure 1 et est transcrite en ARN dans les mitochondries de
30 plantes stériles, ou
- e) elle présente au moins 50 % d'homologie avec la séquence décrite en d) et est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes stériles.

La présente invention se rapporte également à une plante de la famille des Cruciféracées, caractérisée en ce qu'elle contient des
35

chloroplastes et un noyau de la même espèce ou compatibles, et des mitochondries portant un génôme conférant le caractère CMS tel que défini ci-dessus.

5 Plus précisément, la présente invention se rapporte également à une plante appartenant au genre *Brassica*, caractérisée en ce qu'elle contient des chloroplastes et un noyau de *Brassica*, et des mitochondries portant un génôme conférant le caractère CMS tel qu'il a été défini ci-dessus.

10 Ce génôme mitochondrial doit également porter un certain nombre de gènes de l'espèce *Brassica* considérée. Ceci est obtenu par recombinaison entre le génôme *Ogura* et le génôme *Brassica*.

15 En particulier, la présente invention se rapporte à une plante appartenant à l'espèce *Brassica napus*, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de *Brassica*, et que le cytoplasme renferme des chloroplastes de *Brassica* et des mitochondries mâle-stériles portant un ADN selon la présente invention tel qu'il a été défini plus haut ; ces mitochondries peuvent porter également la plupart des gènes mitochondriaux de *Brassica napus* (18S, Atp9, Atp6, CoxII, ndh1, cob). *Brassica napus* correspond au Colza, ou Canola et Rutabaga.

20 La présente invention se rapporte à une plante de l'espèce *Brassica oleracea*, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de *Brassica* et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de *Brassica* et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

25 *Brassica oleracea* recouvre les divers types de choux : choux pommés, de Bruxelles, raves, brocolis, fourragers et choux fleurs.

La présente invention se rapporte également à une plante de l'espèce *Brassica campestris*, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de *Brassica* et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de *Brassica* compatibles avec le génôme nucléaire et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

30 *Brassica campestris* correspond à navette, navets, choux chinois, de Pékin et japonais.

De manière analogue, la présente invention se rapporte à une plante choisie dans le groupe comprenant : *B. juncea*, *B. nigra*, *B. hirta*, *carinata*, caractérisée en ce qu'elle comporte un noyau de Brassica et en ce que le cytoplasme renferme des chloroplastes de Brassica compatibles avec le génôme nucléaire et des mitochondries comportant une séquence d'ADN codant pour le caractère CMS telle qu'elle a été définie.

Selon un autre de ses aspects, la présente invention a pour objet une plante appartenant au genre Brassica et dont le génôme nucléaire comporte une séquence stérilité Ogura telle que définie ci-dessus, ainsi que des éléments assurant son expression et le transport du produit de traduction dans la mitochondrie. Cette plante peut notamment appartenir à l'une des espèces suivantes : *B. napus*, *B. oleracea*, *B. campestris*, *B. nigra*, *B. juncea*, *B. hirta* et *B. carinata*.

La présence de la "séquence stérilité Ogura" est nécessaire et suffisante pour induire une absence totale de pollen en l'absence de gènes de restauration. La pollinisation de ces plantes est assurée normalement grâce à une bonne production de nectar.

La morphologie des organes femelles est normale et les fruits (siliques) formés contiennent un nombre normal de graines. La figure 5 montre la morphologie observée chez une plante normale témoin (z), une plante à morphologie aberrante possédant le génôme Ogura entier (z(6)) et des chloroplastes Brassica oleracea, une plante de chou portant des chloroplastes Brassica napus et des mitochondries mâle-stériles ayant des gènes Brassica napus (z(A)), et des plantes portant des chloroplastes Brassica oleracea et des mitochondries recombinaées ne contenant plus les séquences indésirables (z(9) et z(17)). Les plantes ont les caractéristiques suivantes :

GENOTYPE	CHLOROPLASTES	MITOCHONDRIES
z	<i>B. oleracea</i>	<i>B. oleracea</i>
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

Les génotypes z(A) et z(6) ne présentent pas un système de

stérilité mâle cytoplasmique approprié.

De telles plantes peuvent être obtenues par exemple par la technique de fusion de protoplastes ou par toutes autres techniques qui assurent une bonne recombinaison entre le génôme mitochondrial de l'espèce considérée et le génôme mitochondrial Ogura. Chez de telles plantes la fertilité est restaurée par un seul gène de restauration, appelé Rfl, provenant du radis, ce qui n'est pas le cas des plantes qui portent la totalité du génôme mitochondrial non approprié.

De telles plantes peuvent également être obtenues par reproduction sexuée naturelle ou artificielle.

Des plantes possédant un génôme mitochondrial selon l'invention peuvent également être obtenues par transfert de gène dans la mitochondrie.

Dans tous les cas, ces plantes possèdent un système CMS approprié à savoir :

- une stérilité mâle totale,
- une morphologie permettant une bonne pollinisation et une bonne production de graines comme illustré tableau 1 et tableau 2.

C'est pourquoi la présente invention concerne également un procédé de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce que l'on croise une plante présentant un caractère CMS approprié, comportant la séquence stérilité Ogura dans son génôme mitochondrial ou nucléaire avec une plante normale quand il s'agit d'une culture potagère ou fourragère, ou avec une plante apportant un gène restaurateur de fertilité, Rfl, lorsqu'il s'agit de récolter des graines. Elle concerne également une plante hybride obtenue par ce procédé.

D'une manière générale, les meilleures caractéristiques agronomiques sont obtenues pour des plantes mâle-stériles, possédant des chloroplastes de la même espèce que le noyau et des mitochondries présentant un système de stérilité mâle approprié.

Le tableau 1 représente la productivité d'une lignée de choux sur différents cytoplasmes, (les génotypes z9 ou z 17 sont appropriés). Le tableau 2 représente la productivité d'une lignée de colza sur différents cytoplasmes (les génotypes Fu 27, Fu 58 et Fu 85 sont appropriés).

TABEAU 1 : PRODUCTIVITE DE LA LIGNEE z (CHOU A CHOUROUTE) SUR DIFFERENTS CYTOPLASMES

<u>Cytoplasme</u>		<u>Génotypes</u>	<u>Récolte de semences</u>
<u>Chloroplaste</u>	<u>Mitochondries</u>		<u>Grammes/plantes</u>
B. oleracea	B. oleracea	(z)	53,1
	(témoin fertile)		
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	<u>(z9 ou z17)</u>	91,8

TABEAU 2 : PRODUCTIVITE DE LA LIGNEE DARMOR (COLZA D'HIVER) SUR DIFFERENTS CYTOPLASMES

* Rendement

. Colza d'hiver DARMOR mâle-fertile et mâle-stérile (Fu)

	<u>Rendement (% DARMOR)</u>	<u>Chloroplastes</u>	<u>Mitochondries</u>
DARMOR			
Fu 27	100 (35 qx)	B. napus	B. napus
Fu 58	118	B. napus	B. napus/ogura
Fu 77	120	B. napus	B. napus/ogura
Fu 85	96	B. campestris	Ogura
Fu 118	114	B. napus	B. napus/ogura
BIENVENU	103	B. napus	B. napus/ogura
JET NEUF	108		
	89		

TABLEAU 2 (suite)

Composantes du rendement (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 : Nombre de siliques/m² - PIS : Poids d'une silique (mg) - NGPS : Nombre de graines/silique
NG : Nombre de graines/m² - PIG : Poids d'une graine (mg) -MST : Matière Sèche Totale (g/m²)
HI : Indice de récolte (%) - RDT : Rendement (qx/ha) - HT : Hauteur (cm)

* Ces plantes présentent souvent des fruits (siliques) déformés.

La présente invention a également pour objet une sonde comportant une séquence d'au moins 10 bases, de préférence 15 bases, d'une séquence comprise entre les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1 ; ladite sonde peut être marquée par exemple au moyen d'une base radioactive ou par tout autre moyen, comme par exemple par fluorescence. Cette sonde peut être utilisée pour la mise en évidence de la stérilité mâle et peut être utilisée notamment dans la sélection de clones.

Des caractéristiques et avantages de la présente invention seront mieux mis en évidence dans les exemples suivants.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE LA SEQUENCE D'ADN RESPONSABLE DE LA STERILITE MALE CYTOPLASMIQUE OGURA.

1. Plante.

Par "cybride" on désigne des formes obtenues par la fusion de protoplastes isolés, suivie par la régénération de la plante entière. Ce mode d'obtention permet le mélange dans la cellule d'informations cytoplasmiques provenant des deux parents. Le cybride n° 13 a été obtenu parmi 820 plantes régénérées par fusions de protoplaste entre un cybride de B. Napus résistant à la triazine, Ogura cms (descendance du cybride 77 décrit dans Pelletier et al., 1983 et Chétrit et al., 1985) et la variété d'origine Brutor, sensible à la triazine, et fertile. Un test de résistance à la triazine (Ducruet et Gasquez, 1978) réalisé sur un échantillon de feuille de chaque régénérant a permis de déterminer le type de chloroplaste (chloroplastes résistants à la triazine provenant du parent 77 ou chloroplastes sensibles à la triazine provenant de la lignée Brutor). On a cultivé les plantes et observé le stade de floraison. Les plantes présentant des combinaisons non parentales (soit sensible/mâle stérile ou résistant/mâle fertile) ont été sélectionnées comme cybrides. Le cybride n° 13 était du type sensible/mâle stérile. Le cybride 1 était du type résistant/mâle fertile.

2. Isolement des acides nucléiques.

L'ADN total a été isolé à partir de feuilles provenant de plantes de 4 semaines selon la méthode décrite par Dellaporta (1983). L'ADN mitochondrial a été extrait de feuilles de plantes âgées de 8 semaines ainsi qu'il a été décrit par Vedel et Mathieu, 1982, avec les variantes suivantes :

les mitochondries n'ont pas été purifiées sur gradient de saccharose avant la lyse, et la lyse a été réalisée dans du sarcosyl à 4%, avec protéinase K 0,5 mg/ml (Boehringer Mannheim GmbH), dans du Tris pH 8, 50 mM, EDTA 20 mM. Après précipitation, l'ADN mitochondrial a été purifié par centrifugation en gradient bromure d'éthidium-chlorure de caesium (methode 1- Vedel et Mathieu 1982) dans des tubes de centrifugation en pollyallomère.

Les ARN totaux ont été isolés à partir de feuilles ou de bourgeons floraux selon Logemann et al., 1987.

Les ARN mitochondriaux ont été extraits de choux-fleurs âgés de 8 semaines, selon la technique de Stern et Newton, 1986.

3. Analyses par restriction de l'ADN mitochondrial et électrophorèse en gel d'agarose.

Elles ont été réalisées ainsi qu'il est décrit dans Pelletier et al., 1983. Les ARN totaux ou mitochondriaux ont été chargés sur des gels d'électrophorèse contenant du formaldéhyde tel qu'il a été décrit par Sambrook et al., 1989.

4. Hybridation.

Le transfert d'ADN ou d'ARN sur des filtres de nylon (Hybond-N,* Amersham) a été mené par absorption capillaire respectivement avec 6xSSC ou 10xSSPE, suivant les instructions du fabricant. La préhybridation et l'hybridation ont été conduites selon Amersham, en

utilisant des sondes marquées par le système de marquage d'ADN multiamorce (Amersham) après purification sur colonnes de Sephadex^{*} G50 (Sambrook et al., 1989).

5. Clonage de l'ADN mitochondrial.

Deux banques génomiques de lignées cybride mâle stérile (13-7) et révertant (13-6) ont été construites dans un vecteur phage lambda EMBL3, cultivé sur la souche restrictive d'E. Coli Nm539 (Frischauf et al., 1983). On a obtenu environ $2,5 \times 10^4$ clones par μg d'ADN mitochondrial.

Les banques d'ADN mitochondrial ont été titrées et étalées afin d'isoler les plaques qui ont été transférées sur les filtres de nylon ainsi qu'il est décrit dans Sambrook et al., 1989. La sonde d'hybridation utilisée pour screener les deux banques d'ADN mitochondrial était préparée comme suit : le fragment d'ADN mitochondrial spécifique de la cms a été élué en utilisant la procédure Gene cleanTM (BIO 101 INC.) à partir d'un produit de digestion d'ADN mitochondrial chargé sur un gel d'agarose préparatif. L'ADN élué a été ensuite marqué ainsi qu'il a été décrit.

L'extraction d'ADN Lambda, le sous-clonage du fragment NcoI 2,5 dans le site NcoI de pTrc99A (Amann et al., 1988) et les extractions d'ADN plasmidique ont été menés selon les protocoles de Sambrook et al., 1989. Les plasmides recombinants ont été introduits dans une souche d'E. Coli NM522 (Gough et Murray, 1983).

6. Etude génétique du cybride 13 et de ses descendants.

Dans la première génération de descendants obtenus par pollinisation du cybride 13 avec Brutor, composée de 13 plantes, 5 sont totalement mâles stériles (y compris des plantes 13-2 et 13-7), une est mâle fertile (n° 13-6) et 7 sont pratiquement entièrement stériles avec quelques fleurs mâles fertiles.

* Marque de commerce

La plante fertile 13-6 a été auto-pollinisée et croisée avec Brutor. Dans les deux cas on obtient uniquement des plantes fertiles (43 et 42 respectivement).

5 Dans les croisements entre la plante mâle stérile n° 13-7 et Brutor, 24 descendants sont entièrement stériles et 6 présentent quelques fleurs fertiles, résultat similaire à celui obtenu avec le cybride lui-même. La plante 13-2 a été croisée avec la lignée restauratrice RF qui est hétérozygote pour les gènes spécifiques de restauration pour la stérilité mâle Ogura (Chétrit et al., 1985). La descendance de ce croisement est
10 composée de 53 plantes mâles stériles, 37 plantes mâles fertiles et 9 plantes pratiquement entièrement stériles bien que présentant quelques fleurs fertiles. Ces résultats suggèrent que les plantes mâles stériles de la famille cybride 13 contiennent le déterminant Ogura cms, comme les autres cybrides étudiés auparavant avec un profil de restauration plus simple
15 (Chétrit et al., 1985).

A ce stade de l'étude, deux possibilités peuvent être envisagées: soit le cybride 13 contient un mélange de génomes mitochondriaux mâle fertiles et mâle-stériles, et l'on peut sélectionner davantage
20 pour purifier les deux phénotypes, soit le cybride 13 contient un génome mitochondrial recombiné de structure instable qui retourne à une configuration "fertile" plus stable, et il sera impossible de maintenir un phénotype mâle stérile homogène parmi les générations ultérieures.

25 Des plantes mâles stériles obtenues à partir de la descendance de la plante mâle stérile n° 13-7 ont été développées à la fois par bouture et par croisement sexué avec Brutor. Après un nombre variable de génération (1 à 5) par les deux méthodes, toutes les familles donnent des plantes fertiles. Par contre, les plantes entièrement fertiles ainsi obtenues
30 ne redonnent jamais de plantes stériles.

A la lumière de ces résultats, on peut considérer que la seconde explication proposée ci-dessus c'est à dire que le cybride 13 porte un génome mitochondrial instable qui perd le déterminant Ogura cms pendant le processus conduisant à une configuration "fertile", sans
5 possibilité de retour à un phénotype stérile, est la bonne.

7. Comparaison entre les ADN mitochondriaux de mâle-stériles et de révertants fertiles. Isolement d'un fragment spécifique des plantes mâle-stériles.

10

L'ADN mitochondrial a été extrait des feuilles de descendants 13-7 mâle-stériles et de révertants fertiles (descendants 13-6 ou 13-7) et digéré avec plusieurs enzymes de restriction, afin de comparer leur profil de restriction. Les génomes mitochondriaux des deux types sont très
15 semblables puisqu'aucune différence ne peut être observée entre les profils de restriction des mitochondries mâle-stériles et révertants fertiles en utilisant différents enzymes. Cependant un fragment de restriction de 6,8 kb a été détecté dans le profil de restriction de l'ADN mitochondrial des plantes mâle-stériles digéré avec NruI et n'a jamais été observé dans les
20 profils des révertants fertiles correspondants.

Le fragment (appelé N6,8) a été élué d'un gel d'agarose, marqué, et utilisé comme sonde sur des profils de restriction d'ADN mitochondrial NruI : un signal important à 6,8 kb a été observé chez tous
25 les descendants mâle-stériles du cybride 13, alors qu'aucun fragment de cette taille n'a hybridé à la sonde dans les génomes de mitochondries de révertants fertiles. En outre, la sonde N6,8 hybride avec un fragment de 6,8 kb dans l'ADN mitochondrial Ogura digéré avec NruI, mais pas dans celui de B. Napus cv Brutor, montrant l'origine Ogura de ce fragment.

30

Une banque lambda contenant des extraits d'ADN mitochondrial provenant de plantes mâles stériles (13-7) a été testée avec le fragment marqué élué, et parmi 8 clones hybridant, 2 phages recombinants

35

ont été isolés, contenant le fragment N6,8 entier et des séquences adjacentes. Une carte de restriction détaillée de cette région a été obtenue. L'hybridation des profils de restriction de l'ADN mitochondrial provenant de descendants fertiles et stériles du cybride 13 avec N6,8
5 comme sonde a permis de limiter la région spécifique du génotype mâle stérile à un fragment NcoI de 2,5 kb.

Le fragment NcoI de 2,5 kb a été marqué et utilisé comme sonde vis-à-vis d'ADN mitochondrial provenant de descendants 13-7 et 13-6 digéré avec NcoI. Outre le signal à 2,5 kb qui est spécifique du profil mâle
10 stérile, plusieurs fragments NcoI hybrident à la fois dans les profils de révertant fertile et de mâle-stérile, ces fragments sont à 2,2, 10 et 14 kb. Un fragment NcoI de 2,7 kb hybride fortement dans le génome mitochondrial des descendants fertiles et pas dans celui des descendants stériles. L'analyse de ce profil d'hybridation conduit à la conclusion que le fragment
15 NcoI de 2,5 kb, bien que spécifique de l'ADN mitochondrial mâle-stérile, contient des séquences qui sont répétées ailleurs dans le génome mitochondrial (sur des fragments de 2,2, 10, et 14 kb après digestion par NcoI) et ces séquences répétées sont aussi présentes dans l'ADN mitochondrial de révertants fertiles outre le fragment spécifique de 2,7 kb.

20

Les ARN totaux sont extraits de feuilles ou de bourgeons de descendants de cybrides 13, ou de cybrides (provenant d'autres expériences de fusion) mâle stérile ou fertile et de lignée Brutor. Les Northern blots ont été réalisés et hybridés avec une sonde correspondant à l'insert du
25 clone Lambda contenant N6,8 décrit dans l'exemple 3. Un transcrit majeur de 1,4 kb a été détecté chez tous les cybrides mâle-stériles, y compris le cybride 13-7, alors qu'on n'a observé aucun transcrit de cette taille dans la lignée Brutor, ni dans les deux cybrides fertiles (différents de 13). Par ailleurs, des plantes fertiles présentent un transcrit de 1,1 kb hybridant
30 avec la sonde qui est absent ou présent à un niveau très bas dans tous les cybrides mâle-stériles testés. Plusieurs transcrits communs à tous les échantillons hybrident faiblement avec la sonde, à cause de la taille

35

importante de l'insert marqué. On a vérifié que les transcrits mitochondriaux peuvent être détectés dans des échantillons d'ARN totaux par hybridation du même Northern blot avec un fragment d'ADN contenant la séquence du gène atpa.

5 Le même transcrit spécifique de 1,4 a été trouvé dans les ARN mitochondriaux Ogura extraits de choux-fleurs, en utilisant le fragment NcoI2,5 comme sonde. Les limites exactes de ce transcrit ont été déterminées en utilisant comme sonde des sous clones du fragment NcoI 2,5.

10

8. Etude du cybride 1 et de ses descendants

Le cybride 1 était mâle fertile. Dans sa descendance, la plante 1.12 était fertile et la plante 1.18 stérile. La plante 1.12 a donné dans sa
15 descendance des plantes stériles (S_3) et des plantes fertiles (RF_3). La plante 1.18 a donné des plantes stériles (S_2) et un rameau fertile (RF_2). Les plantes S_2 et S_3 sont restaurées par le même gène nucléaire de restauration de la fertilité pollinique que le cybride 13 stérile.

L'ADN mitochondrial des plantes S_2 et S_3 , par hybridation
20 avec le fragment NcoI de 2,5 kb marqué, ne donne pas un signal à 2,5 kb sur une digestion NcoI, ni un signal à 6,8 kb sur une digestion NruI.

De même l'hybridation sur les ARN totaux (Northern) avec une sonde correspondant à la séquence ORFB ne donne pas un signal à 1,4 kb comme chez le cybride 13 stérile. Par contre, une sonde correspondant à la
25 séquence comprise entre les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1 donne un signal en Northern à environ 1,3 kb. Ce signal est absent sur l'ARN des plantes RF_1 , RF_2 , RF_3 ou Brutor. De même il est possible d'utiliser cette séquence (928-1569) comme sonde en dot blot d'ARN totaux et dans ce cas, seules, et toutes, les plantes mâle-stériles donnent un signal.

30 Ces résultats indiquent que les plantes S_2 et S_3 , bien que mâle-stériles, n'ont pas conservé la séquence nucléotidique, décrite dans la figure 1, dans sa conformation originale et ils démontrent que, dans cette

35

séquence, la partie comprise entre les nucléotides 928 et 1569 est celle qui porte le déterminant spécifique "stérilité Ogura", qui rend les plantes mâle-stériles, lorsque cette séquence est transcrite.

5 Cette séquence n'a pas d'homologie significative avec les séquences présentes dans les banques de données.

EXEMPLE 2 : MISE EN EVIDENCE DE SEQUENCES INDESIRABLES DANS LE GENOME MITOCHONDRIAL OGURA.

10 Une collection de cybrides a été obtenue dans l'espèce *B. napus* par fusion de protoplastes entre un colza porteur du cytoplasme Ogura et un colza normal. Le premier est mâle-stérile et déficient chlorophyllien à basse température, le second est normalement vert et fertile. Les cybrides ont été triés parmi les plantes régénérées et l'on a
15 retenu ceux qui étaient mâle-stériles et normalement verts.

De la même manière une collection de cybrides a été obtenue dans l'espèce *B. oleracea* par fusion de protoplastes entre un chou porteur du cytoplasme Ogura et un chou normal. On a retenu parmi les plantes régénérées les cybrides qui étaient mâle-stériles et normalement verts.

20 Ces cybrides ont été croisés avec différentes variétés, de colza dans le premier cas, de chou dans le second. Les croisements ont été répétés à chaque génération avec les mêmes variétés de façon à obtenir un génotype défini, proche de celui de la variété récurrente.

25 Ces différentes variétés, converties ainsi sur les cytoplasmes de différents cybrides ont été soumis à des essais agronomiques pour mesurer la production de graines, qui dépend de plusieurs facteurs : une production de nectar suffisante pour assurer une pollinisation par les insectes, une morphologie florale normale pour que cette pollinisation soit efficace et que les fruits se développent normalement.

30 La collection de cybrides a ainsi pu être divisée en deux lots :
- un lot de cybrides présentant une stérilité mâle appropriée à la production commerciale de semences.

- un lot de cybrides ne présentant pas toutes les caractéristiques favorables à une bonne production commerciale de semencés.

Au premier lot appartiennent par exemple les cybrides de colza n° 27, 58, 85 et les cybrides de chou n° 9, 17, 21, 24, 27c.

5 Au deuxième lot appartiennent par exemples les cybrides de colza n° 23s, 77, 118 et les cybrides de chou n° 1, 6, 14.

10 Les ADN totaux de ces cybrides ont été soumis à des digestions enzymatique par Sall, NcoI, NruI, BglI, PstI, KpnI. Les Southern blots obtenus ont été hybridés avec différentes sondes mitochondriales Atpa, Cob, CoxI, Atp6, 26S, 18S, et deux fragments du génôme Ogura de 2,5 kb issu d'une digestion NcoI et de 19,4 kb issu d'une digestion NruI.

Les deux lots de cybrides se distinguent en ce que :

- 15 a) les n° 23s, 77, 11s, chez le colza et 1, 6, 11, chez le chou possèdent la région du génôme Ogura qui entoure le gène coxI reconnaissable par des fragments BglI de 10.7 kb ou NruI de 11 kb et la région du génôme Ogura qui entoure un des gènes de l'ARN de transfert formylméthionine reconnaissable par des fragments Sall de 5,1 kb ou NruI de 15 kb.
- 20 b) les n° 27, 58, 85 chez le colza et 9, 17, 21, 24, 27c chez le chou ne possèdent pas les régions correspondantes qui ont été remplacées, du fait de recombinaisons entre les génômes des deux parents qui ont été fusionnés, par des régions analogues du génôme mitochondrial de colza chez les n° 27, 58, 85, de chou chez les n° 9, 17, 21, 24, 27c.

25 On en déduit que les deux régions en question du génôme Ogura sont indésirables si l'on veut avoir un système de stérilité mâle approprié à la production commerciale de semences.

EXEMPLE 3

30 Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance des séquences "stérilité mâle Ogura" et des séquences indésirables pour effectuer un tri immédiat des cybrides obtenus sans avoir à attendre plusieurs années de rétrocroisement et des tests agronomiques.

On fusionne des protoplastes d'une plante de Brassica portant le cytoplasme Ogura avec des protoplastes de l'espèce Brassica considérée. Les colonies issues de fusion sont cultivées in vitro et mises à régénérer sur un milieu qui favorise la formation de bourgeons (voir Pelletier et al. 1983).

A partir d'un gramme de matière fraîche qu'il s'agisse d'un cal ou d'un fragment de la plantule régénérée, il est possible par les techniques décrites précédemment d'isoler l'ADN total. Après digestion par Sall, l'hybridation de type Southern avec la sonde comprise entre les nucléotides n° 389 et 1199 (voir figure 1) ne doit donner un signal que pour une taille de 4,4 kb (ne doit pas donner de signal à 5,1 kb). De même après digestion par NruI et hybridation avec une sonde portant le gène coxI, on doit obtenir un signal pour une taille différente de 11 kb.

Ces hybridations permettent de prédire qu'on a bien une plante qui sera mâle stérile et qui sera appropriée à la production commerciale de semence.

EXEMPLE 4

Cet exemple est une variante de l'exemple 3 ou l'on imagine qu'au lieu de réaliser des fusions de protoplastes, on réalise un croisement sexué entre les deux parents dans des conditions particulières ou avec des génotypes particuliers de telle sorte que, contrairement aux processus connus de la fécondation chez les végétaux, il y a mélange des cytoplasmes de l'oosphère et du tube pollinique ou du gamète mâle. Si de tels procédés étaient décrits, on pourrait de la même manière effectuer un tri précoce, sur de jeunes plantes issues de ces fécondations artificielles en utilisant les mêmes sondes et les mêmes critères que dans l'exemple 3.

EXEMPLE 5

Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance de la séquence stérilité Ogura dans un type de manipulation génétique qui a déjà
5 été décrit chez la levure (Johnston et al. 1988).

A partir d'une plante de Brassica normale on bombarde des méristèmes ou bien des cellules in vitro avec des microparticules recouvertes d'ADN portant la séquence stérilité Ogura. Les plantes
10 obtenues dans la descendance des méristèmes traités ou des plantules régénérées seront mâle-stériles cytoplasmiques si l'ADN a pu pénétrer dans les mitochondries et s'intégrer au génôme de ces organites. On évitera ainsi les problèmes posés par les séquences indésirables, qu'il s'agisse des chloroplastes du radis Ogura ou des séquences ainsi définies du génôme mitochondrial Ogura.

15

EXEMPLE 6

Cet exemple illustre l'intérêt de la connaissance de la séquence "stérilité Ogura" dans la construction par génie génétique d'une
20 stérilité mâle nucléaire, à hérédité mendélienne et non plus cytoplasmique.

A partir de la séquence d'ADN mitochondrial délimitée par les nucléotides 928 et 1569, on peut construire un gène chimérique qui sera après transformation génétique de cellules de Brassica ou d'un autre genre, transcrit dans le noyau des cellules des plantes transformées obtenues. Si le
25 gène chimérique contient une préséquence qui permet l'importation dans la mitochondrie de son produit de traduction en protéine, ces transformants seront mâle-stériles, et ce caractère se comportera comme un caractère mendélien dominant.

30

35

R E F E R E N C E S

- 5
 Amann E, Ochs B, Abel K-J (1988) *Gene* 69:301-315
 Bannerot H, Bouldard L, Cauderon Y, Tempé J (1974) *Proc Eucarpia Meeting Cruciferae* 25:52-54
 Bannerot H, Bouldard L, Chupeau Y (1977) *Eucarpia Cruciferae Newsl*: 2-16
 10 Chétrit P, Mathieu C, Vedel F, Pelletier G, Primard C (1985) *Theor Appl Genet* 69:361-366
 Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21
 Ducruet JM and Gasquez J (1978) *Chemosphere* 8:691-696
 Frischauf AM, Lehrach H, Poutska A, Murray N (1983) *J Mol Biol* 170:827-842
 15 Gough J and Murray N (1983) *J Mol Biol* 166:1-19
 Hiesel R, Shobel W, Schuster W, Brennicke A (1987) *EMBO J* 6:29-34
 Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA (1988) *Science* 240:1538-1541
 Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) *Analytical Biochem* 163:16-20
 20 Ogura H (1968) *Mem Fac Agric Kagoshima Univ* 6:39-78
 Pelletier G, Primard C, Vedel F, Chétrit P, Rémy R, Rousselle P, Renard M (1983) *Mol Gen Genet* 191:244-250
 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
 25 Stern DB and Newton KJ (1986) *Methods Enzymol* 118:488-496
 Vedel F and Mathieu C (1982) *Anal Biochem* 127:1-8

30

35

1. Cellule de plante comportant une séquence d'ADN stérilité Ogura, caractérisée en ce que ladite séquence est portée par la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, ou en ce que ladite séquence présente au moins 50 % d'identité avec la séquence délimitée par les nucléotides 928 et 1569 de la figure 1, et en ce que ladite séquence est transcrite en ARN dans les mitochondries de plantes mâle-stériles.

2. Cellule de plante selon la revendication 1, caractérisée en ce que :

- a) elle est portée par une séquence d'ADN délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 2273 sur la figure 1, ou
- b) elle présente au moins 50 % d'identité avec ladite séquence mentionnée en a),

et confère, lorsque ladite séquence est présente dans le génome mitochondrial ou nucléaire, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

3. Cellule de plante comportant un génome nucléaire ou mitochondrial végétal recombiné, ledit génome étant caractérisé en ce qu'il comporte une séquence d'ADN stérilité Ogura, qui consiste :

- a) en une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 sur la figure 1, ou
- b) en une séquence présentant au moins 50 % d'identité avec ladite séquence mentionnée en a),

et confère, lorsque ladite cellule est présente dans une plante, une stérilité mâle cytoplasmique à ladite plante.

4. Cellule de plante selon la revendication 3, caractérisée en ce que ledit génome est dépourvu d'une partie de la séquence qui est portée par un fragment de 10,7 kb, après digestion par BglI, et un fragment de 11 kb après digestion par NruI, révélés par hybridation avec une sonde coxI.

5. Cellule de plante selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que ledit génome est dépourvu d'une partie de la séquence qui après digestion par

Nrul donne un fragment de 15 kb, après digestion par Sall donne un fragment de 5,1 kb, et après digestion par BglI donne un fragment de 18,5 kb, et qui est révélé par hybridation avec une sonde correspondant à la séquence comprise entre les bases 389 à 1199 de la séquence représentée sur la figure 1.

6. Cellule de plante selon l'une des quelconques revendications 3 à 5, caractérisée en ce que ledit génome est un génome nucléaire comportant, outre ladite séquence d'ADN stérilité Ogura, une préséquence permettant l'importation dans les mitochondries du produit de traduction de ladite séquence.

7. Cellule de plante selon l'une des quelconques revendications 3 à 5, caractérisée en ce que ledit génome est un génome mitochondrial.

8. Cellule de plante selon la revendication 6 comprenant des chloroplastes de la même espèce que le génome nucléaire ou d'une autre espèce mais compatibles avec ce génome nucléaire.

9. Culture cellulaire de plante, caractérisée en ce qu'elle comporte des cellules selon l'une des quelconques revendications 1 à 8.

10. Culture cellulaire comportant des cellules selon l'une des quelconques revendications 1 à 8, lesdites cellules étant capables de régénérer une plante.

11. Cellule de plante selon la revendication 7, caractérisée en ce que ladite plante appartient au genre *Brassica*, et en ce qu'elle contient des chloroplastes de *Brassica* compatibles avec le génome nucléaire de ladite cellule.

12. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica napus*.

13. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica oleracea*.

14. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica campestris*.
15. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica juncea*.
16. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica nigra*.
17. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica hirta*.
18. Cellule de plante selon la revendication 11, caractérisée en ce que ladite plante appartient à l'espèce *Brassica carinata*.
19. Cellule de plante selon l'une des revendications 11 à 18, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par transfert génétique dans la mitochondrie.
20. Une méthode de préparation d'une plante de stérilité mâle cytoplasmique, ladite méthode comprenant :
 - transformer des cellules de plantes avec une séquence d'ADN comprenant une séquence délimitée par les nucléotides numérotés 928 et 1569 de la figure 1 ; et
 - régénérer ladite plante à partir desdites cellules transformées.
21. Une méthode de préparation d'une plante de stérilité mâle cytoplasmique, ladite méthode comprenant :
 - fusionner des protoplastes obtenus à partir de (i) cellules de l'une des quelconques revendications 1-8 ou 11-19 ou à partir de culture cellulaire de la revendication 9 ou 10 avec des (ii) protoplastes d'une espèce compatible;
 - cultiver les protoplastes fusionnés pour régénérer ladite plante.

Application number / numéro de demande: 2393476

Figures: _____

Pages: 11-12-13-14

Unscannable items
received with this application
(Request original documents in File Prep. Section on the 10th floor)

Documents reçu avec cette demande ne pouvant être balayés
(Commander les documents originaux dans la section de préparation des dossiers au
10^{ème} étage)

FIG. 1

481 TAAGGGATAGCTGTTTAACCATTTGTAATGGAAATGGGATGTTGATCCTCCTTGGAAATAAT 540
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTCCTATCGACAAATTGGTAAACATTACCTTACCCTACAAGTAGGAGGAACCTTATTA

3/14

FIG. 1

MBS			M		F
asn	M	X	bb	T	n
caa	m	m	os	a	us
IAB	e	n	Ir	q	4p
III	I	I	II	I	Hi
					II

/
 ACGTATATAAGAAGATTTTCATTCCAGTTGGAAAGCAATCGAGAAAACGCCGCCCAATA
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
 TGCATATATTCTTCTAAAAGTAAGGTCAACCTTTCGTTAGCTCTTTTGCGGCGGGTTTAT

A							
fbm	C		HB			B	
lsap	v	P	is	NT	M	MBsM	
Iaem	i	l	np	rh	l	ssmc	
IAII	J	e	fm	ua	y	paAr	
IIII	I	I	II	II	I	IIII	
//			/			//	

CGCTTCGCCACGTGTAGCCCTGTATGGACTCGCGAAGCAGGTCTCCGGTCCGTGTCCAAG
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
 GCGAAGCGGTGCACATCGGGACATACCTGAGCGCTTCGTCCAGAGGCCAGCCACAGGTTC

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

ATTTGATCTAACTATTGAGTGAGGACTACTTACCGATTGATAGAATAATACGTATATAAG
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
 TAACTAGATTGATAACTCACTCCTGATGAATGGCTAACTATCTTATTATGCATATATTC

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

//
 AAGAAGCTCTTTGTGGAGTGATCTTTCTCGAAATGAATTAAGTAAGGCGCTATGTTTCAG
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
 TTCTTCGACGAAACACCTCACTAGAAAGAGCTTTACTTAATTCAATTCGCGATACAGTC

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

ATTCTGAACCAAGCACTAGTTGAGGTCTGAAGCCTTATGAGCAGAAGTAATAAATACCT
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
 TAAGACTTGGTTTCGTGATCAACTCCAGACTTCGGAATACTCGTCTTCATTATTTATGGA

5/14

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

1141 ATATTTGGCTAAGCTGGTTTTCTAACAACCAACATTGTTTACGAACCATGAGACGATCTA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 TATAAACCGATTTCGACCAAAGATTGTTGGTTGTAACAAATGCTTGGTACTCTGCTAGAT

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

1201 GAGAAGTTAAAATTCCATATGAATTTCAAGTATGGGTGGCTAGGTGTCAAATTACAATA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 CTCTTCAATTTTAAAGGTATACTTAAAGTCATACCCACCGATCCACAGTTTAAATGTTAT

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

1261 AAATCAAATGTACCTAACGATGAAGTGACGAAAAAGTCTCACCTATCATTAAAGGGGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TTTAGTTTACATGGATTGCTACTTCACTGCTTTTTTTCAGAGTGGATAGTAATTTCCCCTT

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

1321 ATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 TATCTCCCCTTTCTCCTTTTTTTTCTCCCCTTTCCCCTTTATCTCCCCTTTCTCCTTTTT

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

1381 AAAGAGGGGAAAGGGGAAATAGAGGGGAAAGAGGAAAAAAGAGGTGGAAATTGACCG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 TTTCTCCCCTTTCCCCTTTATCTCCCCTTTCTCCTTTTTTTTCTCCACCTTTTAACTGGC

FIG_1

6/14

FIG.1

T
a
q
I
I
-
l

T
Ms
fp
eE
II
/

S
BB a
gsDu
ltp3
IYnA
IIII
/
/

N
l
a X
I c
I m
I I

1441 AGAAAATAATGCTTTGTGAACCCAATTGCTTTGACAAAAATAAAGAAAGAAGCAAAATCT 1500
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTTTATTACGAAACACTTGGGTAAACGAAACTGTTTTTATTTCTTTCTTCGTTTTAGA

1501 CATTCAATTTGAAATAGAAGAGATCTCTATGCCCCCTGTTCTTGGTTTTCTCCCATGCTT 1560
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAAGTTAACTTTATCTTCTCTAGAGATACGGGGGACAAGAACC AAAAGAGGGGTACGAA

1561 TTGTTGGTCAACAACCAACCACAACCTTTCTATAGTTCTTCACTACTCCTAGAGGCTTGAC 1620
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACAACCAGTTGTTGGTTGGTGTGAAAGATATCAAGAAGTGATGAGGATCTCCGAACTG

1621 GGAGTGAAGCTGTCTGGAGGGAATCATTTTGTGAAATCAATTAATCTAATCATGCCTCA 1680
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCTCACTTCGACAGACCTCCCTTAGTAAACAACCTTTAGTTAATTAGATTAGTACGGAGT

1681 ACTGGATAAATTCACCTTATTTTTCACAAATCTTCTGGTTATGCCTTTTCTTCTTTACTTT 1740
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGACCTATTTAAGTGAATAAAAAGTGTTAAGAAGACCAATACGGAAAAGAAGAAATGAAA

FIG. 1

		S	E
		a	C
		u	O E T
N	RS	D	P A C S
d	SC	p	l l o p
e	aa	n	5 w R E
I	II	I I	I II I

	B S		E	B	S	E	S
	F	SMNC	C	b	yb	AONPa	vllpu
ad	o	ascr	o	v	Lo	a0au9	c
II	k	JpiF	P	I	TI	I9IM6	X
VI	I	IIII	I	I	II	IIVII	I
	///					/ //	

S				
BB a	M			B
gsDu	b	B	M	S
ltp3	o	s	a	c
IYnA	I	r	e	B
IIII	I	I	I	I
//				

		H	H		S
	B	Ca	i		a
T	c	ve	SANT	M	u
a	e	iI	acca	n	3
q	f	JI	lcIq	l	A
I	I	II	IIII	I	I
/		/	/		

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

1981 GATCTCTTGTTTCGGAGAAATAAGTGGCTCACGAGGAATGGAAGAAACATATTATATAA 2040
-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTAGAGAACAAAGCCTCTTTATTCACCGAGTGCTCCTTACCTTTCTTTGTATAATATATT

FIG. 1

8/14

S
a
T

T M B u D A s
a n s 3 p l p
q l r A n w E
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 eIlJJelIyo fi ●
I II IIIIIIIII II I

////

2101 TGACATAATGCTAATCCATGTTGTACATGGCCAAGGAAGCATAAAATGATTCTTTCATTC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2160
ACTGTATTACGATTAGGTACAACATGTACCGGTTTCCTTCGTATTTTACTAAGAAAGTAAG

E
C
O
R
l
2 B
4F MT s
/a nh p
3u la C
II II I
/ /

E M
C n
O l
N I
I I

2161 TATAGATACCTCTGGTAGGTAAAGCACTCTACTGTGCTTTATTGAAAGTTCCCATCGCGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2220
ATATCTATGGAGACCATCCATTTTCGTGAGATGACACGAAATAACTTTCAAGGGTAGCGCC

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 I II

2221 GGGCGAGGATACTTGCCTTCGCGGTTTCGACTTTCTTTTCAGGCTTGACTCATTATTTTCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2280
CCCGCTCCTATGAACGGAGCGCCAAGCTGAAAGAAAGTCCGAACTGAGTAATAAAAGG

B
S
P
S CB1H
fAva2gS
alin8is
NuJI6Ac
IIIIIII

S
Aa
vu M
a9 n
I6 l
II I

/ ///

2281 GGTCTCTCACACCCCTTTAGAGCTCTTTATGATGCCCACTGAGTAAGATTCTGGGGGCTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2340
CCAGGAGAGTGTGGGGAAATCTCGAGAAATACTACGGGTGACTCATTCTAAGCCCCCGAA

9/14

FIG.1

N

S	B	C		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
//		/		/	// /		/

2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2400
 CCCGGCGCAGAAGCTCATTCTGAACCGCGGGAACCTTCGTCTCTTCGACACAAACGTTTT
 GGGCCGCGTCTTCGAGTAAGACTTGGCGCCCTTGAAGCAGAGAAGCTGTGTTTGCAAAA

S

	C	M	BBB N a
	v	M b	A sasDlHu
	i	n o	l amtpap3
	J	l I	w BHYNiHa
	I	I I	I IIIIVII
			/ / /

2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2428
 ATGAAGAGGCTGATGGTGATGAGGATCC
 TACTTCTCCGACTACCACTACTCCTAGG

Enzymes qui coupent:

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

Enzymes ne coupant pas :

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

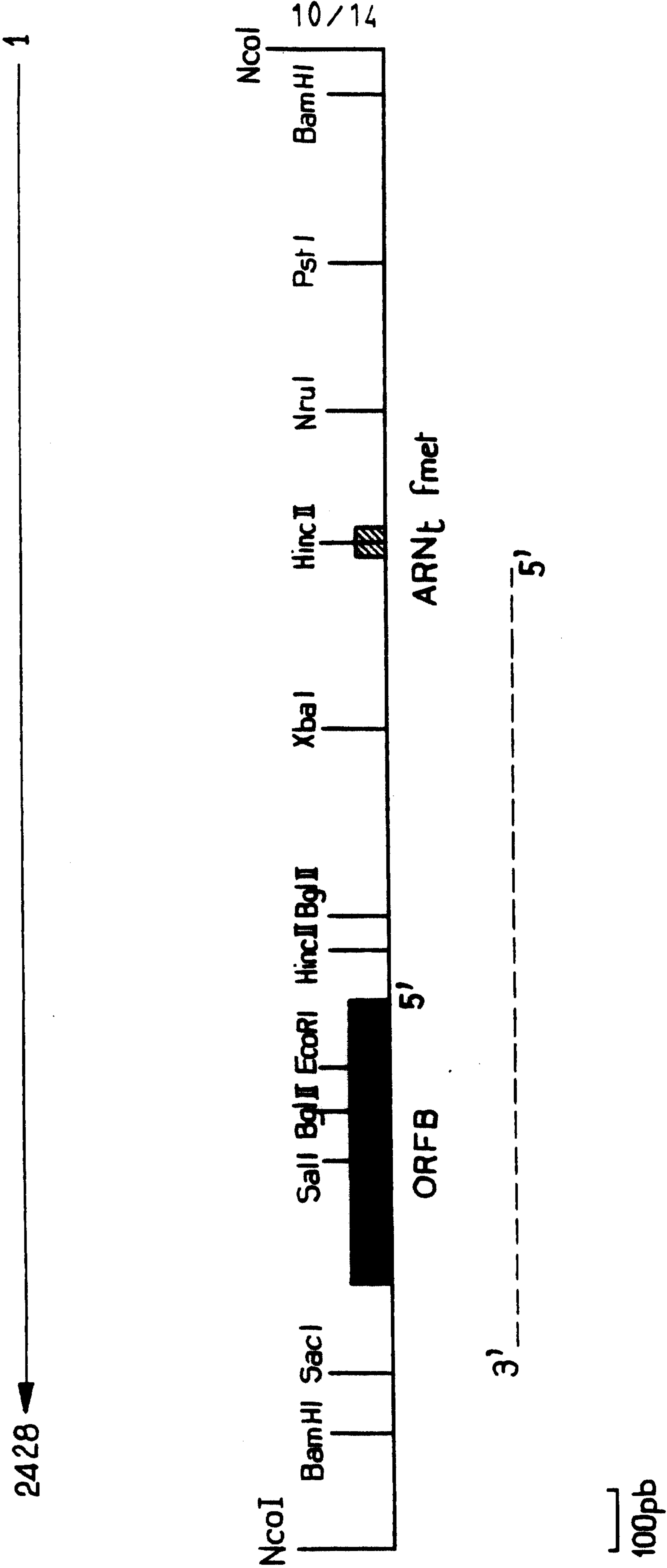
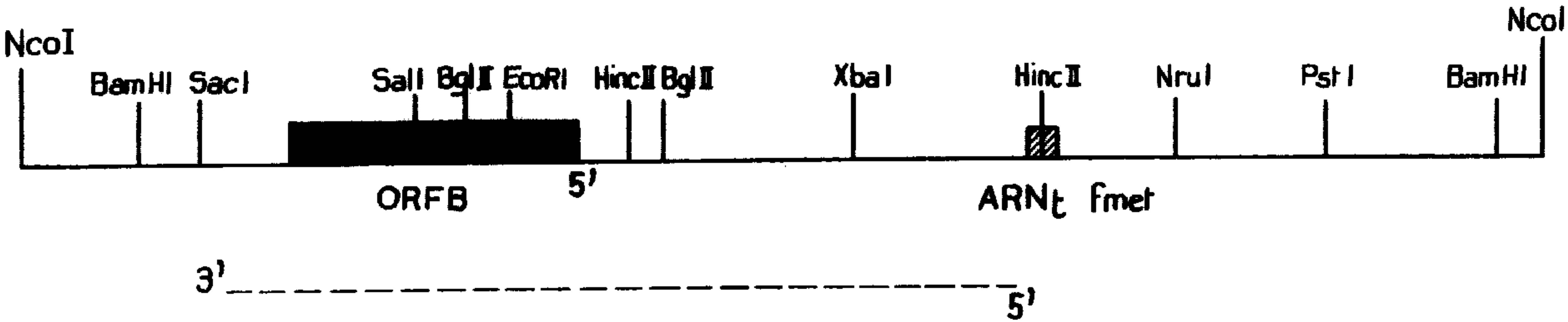


FIG. 2

2428 ← 1



100pb