



(72) DELESALLE, Louis, FR

(72) DHELLEMMES, Charles, FR

(72) DESPREZ, Michel, FR

(71) FLORIMOND DESPREZ VEUVE ET FILS, FR

(51) Int.Cl.⁶ C12N 15/29, C12N 15/82, C12Q 1/68, C12N 5/10, A01H 5/00

(30) 1996/05/31 (96/06725) FR

(54) **RECOMBINANT PLANT GENOME, COMPRISING SPECIFIC
CHICORY GENES AND A NUCLEOTIDE SEQUENCE
CONFERRING MALE STERILITY, AND ITS USE.**

(54) **GENOME VÉGÉTAL RECOMBINÉ, COMPORTANT DES
GENES SPÉCIFIQUES DES CHICORÉES ET UNE SÉQUENCE
NUCLEOTIDIQUE CONFÉRANT UNE STÉRILITÉ MÂLE ET
SON UTILISATION**

(57) La présente invention concerne un génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence orf 522. Elle concerne également une mitochondrie, un cytoplasme ou une cellule végétale recombinée contenant un tel génome. Elle concerne enfin des procédés de production et de sélection de plante du genre *Cichorium* présentant une stérilité mâle cytoplasmique.

(57) The invention discloses a recombinant plant genome, characterised in that it comprises specific chicory genes and a nucleotide sequence conferring male sterility, carried by the *Helianthus annuus* orf 522 sequence, or by a sequence with at least 50 % homology with the said orf 522 sequence. It also features a mitochondrion, a cytoplasm or a recombinant plant cell containing such a genome. Finally it discloses methods for producing and selecting plants of the *Cichorium* genus with cytoplasmic male sterility.

**VERSION
CORRIGEE***

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/82, 5/04 // C07K 14/415	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/45548 (43) Date de publication internationale: 4 décembre 1997 (04.12.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00944 (22) Date de dépôt international: 30 mai 1997 (30.05.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/06725 31 mai 1996 (31.05.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FLORIMOND DESPREZ VEUVE ET FILS [FR/FR]; 3, rue Florimond Desprez, F-59242 Cappelle-en-Pevele (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DELESALLE, Louis [FR/FR]; 1 bis, rue de Thouars, F-59242 Cappelle-en- Pevele (FR). DHELLEMMES, Charles [FR/FR]; 33, rue Ladrière, F-59242 Cappelle-en-Pevele (FR). DESPREZ, Michel [FR/FR]; Les Diablotins, Rue Florimond Desprez, F-59242 Cappelle-en-Pevele (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regim- beau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reques.</i>
(54) Title: RECOMBINANT PLANT GENOME, COMPRISING SPECIFIC CHICORY GENES AND A NUCLEOTIDE SEQUENCE CONFERRING MALE STERILITY, AND ITS USE.		
(54) Titre: GENOME VEGETAL RECOMBINE, COMPORTANT DES GENES SPECIFIQUES DES CHICOREES ET UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CONFERANT UNE STERILITE MALE ET SON UTILISATION		
(57) Abstract		
The invention discloses a recombinant plant genome, characterised in that it comprises specific chicory genes and a nucleotide sequence conferring male sterility, carried by the Helianthus annuus orf 522 sequence, or by a sequence with at least 50 % homology with the said orf 522 sequence. It also features a mitochondrion, a cytoplasm or a recombinant plant cell containing such a genome. Finally it discloses methods for producing and selecting plants of the Cichorium genus with cytoplasmic male sterility.		
(57) Abrégé		
La présente invention concerne un génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 de Helianthus annuus, ou par une séquence présentant au moins 50 % d'homologie avec ladite séquence orf 522. Elle concerne également une mitochondrie, un cytoplasme ou une cellule végétale recombinée contenant un tel génome. Elle concerne enfin des procédés de production et de sélection de plante du genre Cichorium présentant une stérilité mâle cytoplasmique.		

GENOME VEGETAL RECOMBINE, COMPORTANT DES GENES SPECIFIQUES DES CHICOREES ET UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CONFERANT UNE STERILITE MALE ET SON UTILISATION

La présente invention se rapporte à l'utilisation de séquences nucléotidiques permettant de conférer une stérilité mâle de type cytoplasmique à des plantes du genre *Cichorium*.

5 Le genre *Cichorium* rassemble des plantes présentant un grand intérêt agro-alimentaire, comme les divers types de chicorée ou les endives.

Il s'agit de plantes possédant à la fois des systèmes de reproduction mâle et femelle, et qui ont donc une capacité à s'autoféconder. Un tel évènement est indésirable lorsque l'on souhaite effectuer des croisements
10 avec une plante d'une autre variété, en vue de l'obtention d'hybrides.

Chez *Cichorium intybus*, des plantes à stérilité mâle nucléaire ont déjà été proposées. Cependant la stérilité mâle cytoplasmique constitue une solution d'intérêt pour la production d'espèces hybrides.

15 La stérilité mâle cytoplasmique est une caractéristique transmise par le parent femelle d'une plante (hérédité maternelle), et qui prévient la formation de pollen viable. Une stérilité mâle de bonne qualité ne doit pas affecter la fertilité femelle de la plante, pour permettre son croisement avec des plantes mâles fertiles.

20 Il est donc souhaitable de pouvoir disposer d'un système conférant une telle stérilité mâle cytoplasmique, qui soit stable.

Il est également souhaitable de disposer d'un marqueur fiable de cette stérilité mâle cytoplasmique permettant la sélection des cellules végétales avant même le développement d'une plante complète présentant
25 l'ensemble des caractères phénotypiques.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 du tournesol, ou par une séquence
30 présentant au moins 50%, et de manière avantageuse, au moins 90% d'homologie avec ladite séquence orf 522.

La séquence orf 522 est une séquence qui a été mise en évidence chez le Tournesol (*Helianthus*), notamment *H. annuus*, où elle semble associée à une stérilité mâle cytoplasmique (Köhler et al, Mol. Gen. Genet., 1991, 227 : 369-376).

5 La Demanderesse a trouvé que la présence de cette séquence orf 522 dans le génome d'une plante du genre *Cichorium* était liée à une stérilité mâle cytoplasmique.

Des séquences convenant à la mise en oeuvre de l'invention comprennent des séquences portées par la séquence orf 522 telle qu'elle a
10 été précédemment décrite, ainsi que par des séquences présentant au moins 50% et de préférence au moins 80% de similarité. Des séquences appropriées présentent avantageusement 90% de similarité avec ladite séquence orf 522, et comprennent en particulier les séquences codant pour la même protéine, compte tenu de la dégénérescence du code
15 génétique, ou pour une protéine dans laquelle certains acides aminés ont été remplacés par des acides aminés équivalents. Par acides aminés équivalents, on entend des acides aminés présentant un comportement chimique analogue et/ou des poids moléculaires voisins. Elles comprennent également les séquences codant pour une protéine dans
20 laquelle un ou plusieurs acides aminés non essentiels à l'activité ont été délétés ou remplacés.

Le génome peut être de type nucléaire ou mitochondrial.

Lorsque la séquence est présente dans le génome nucléaire, celui-ci comportera en outre une préséquence permettant l'importation dans les
25 mitochondries du produit de traduction de ladite séquence.

De préférence, le génome recombiné est un génome mitochondrial. L'invention a donc également pour objet une mitochondrie comportant un génome recombiné tel que défini précédemment.

En particulier, l'invention a pour objet une mitochondrie
30 caractérisée en ce qu'elle contient au moins un fragment nucléotidique de 347 pb, portée par la séquence orf 522, ou une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec ledit fragment.

La séquence de 347 pb est délimitée, à l'intérieur de la séquence orf 522 (Köhler et al, Mol. Gen. Genet 1991), par les amorces de séquences :

SEQ ID NO 1 : 5' CCCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG 3'
 5 SEQ ID NO 2 : 5' CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCAG 3'

L'invention concerne un cytoplasme végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il contient un noyau comportant le génome du genre *Cichorium*, et un génome recombiné défini ci-dessus, en particulier un
 10 cytoplasme qui contient des mitochondries comportant une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie.

Des cellules végétales recombinées contenant un tel cytoplasme sont comprises dans l'invention, et notamment une cellule végétale qui
 15 contient un noyau comportant substantiellement le génome d'une espèce choisie parmi *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia*.

Parmi ces espèces, on peut citer, sans aucunement y limiter l'invention, les cultigroupes suivants :

- 20 *Cichorium intybus* L : - chicorées "sauvages améliorées"
 - chicorées "Barbe de Capucin"
 - chicorées "Pain de Sucre"
 - chicorées "Chioggia"
 - chicorées "Vérone"
 25 - chicorées "Catalogne"
 - chicorées "Trévise"
 - chicorées "Variegato di Castelfranco"
 - chicorées "Witloof" (ou "de Bruxelles" ou "à chicon")
 30 - chicorées "Soncino"
 chicorées "Industrielles" (à torréfier et à sucres)
 - chicorées "fourragères" ou "à gibiers"...

Cichorium endivia L. : - chicorées "scaroles"
 - chicorées "frisées"...

5 Ce sont des chicorées dites à grosses racines (industrielles
fourragères et Witloof) ou des chicorées dites à salade (vertes, rouges,
panachées, à forcer ou non).

10 L'homme du métier pourra adapter sans difficulté l'invention,
notamment en se référant à "Génétique et Amélioration de la Chicorée
industrielle", DESPREZ et al., Séance spécialisée du 30 novembre 1994 à
l'Académie d'Agriculture de France n° 80 (7) 48-49.

15 Selon un autre aspect, l'invention se rapporte à un procédé pour
produire une plante du genre des Chicorées ou du matériel de reproduction
de cette plante, présentant une stérilité mâle cytoplasmique, caractérisé
en ce qu'on intègre dans le génome cellulaire de cette plante une
séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522 du tournesol, ou par
une séquence présentant au moins 50% et de préférence au moins 90%
d'homologie avec ladite séquence orf 522. La plante (ou le matériel de
reproduction), à l'exception des variétés végétales, est comprise dans
l'invention.

20 Elle concerne également un procédé essentiellement non
biologique de préparation de plantes hybrides, caractérisé en ce qu'on
croise une plante susceptible d'être obtenue par le procédé décrit ci-
dessus, avec une plante de la même espèce, dépourvue de la séquence orf
522 de *Helianthus annuus*, ou d'une séquence présentant au moins 90%
25 d'homologie avec ladite séquence orf 522.

30 Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un procédé de
sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre
Cichorium, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide nucléique
mitochondrial de la plante avec une sonde marquée comprenant au moins
10 nucléotides de la séquence orf 522.

D'autres variantes et caractéristiques de l'invention apparaîtront à
la lecture des exemples qui suivent.

Exemple 1 : Préparation du matériel végétal

Des graines de *Cichorium intybus* L cv Pévèle ont été fournies par les Etablissements Florimond Desprez et des graines de *Helianthus annuus* (à stérilité mâle cytoplasmique ou SMC) ont été achetées dans le commerce.

Les graines de *Cichorium intybus* ont été stérilisées en surface avec une solution à 0,1% (p/v) de HgCl_2 , lavées trois fois dans de l'eau distillée et placées dans des boîtes de Pétri sur un milieu de culture Heller (1953) (sels majeurs et mineurs exempts de FeCl_3) supplémentées avec 19,5 mg/l de Fe-EDTA, 20 g/l de saccharose et 6 g/l d'Agar (Bioakar type E) et cultivées dans les conditions de culture décrites par Rambaud et al (1990). Les semis aseptiques ont été ensuite transférés dans des tubes de culture sur le même milieu. Les semences de *Helianthus annuus* ont été stérilisées avec une solution d'hypochlorure de calcium à 50 g/l, puis lavées trois fois dans de l'eau distillée et transférées dans une solution saccharose (10 g/l) / agar (0,6%).

Les feuilles de chicorée ont été récoltées sur des plantes de 12 à 14 jours. Les feuilles ont été coupées en morceaux et incubées dans une solution contenant 15 g/l de caylase 345, 0,5 g/l de caylase M2 (Cayla, Toulouse, France) et 90 g/l de mannitol.

Pour les semis de tournesol, les hypocotyles ont été prélevés 6 à 10 jours après la germination et incubés dans la même solution de macération.

Les protoplastes ont été incubés pendant 5 h 30 min. à 30° C dans l'obscurité sans agitation, purifiés par filtration à travers des tamis à mailles de 50 μm , récoltés et lavés trois fois par centrifugation à basse vitesse (100 x g) pendant 15 min.

Après l'élimination de la couche supérieure avec une pipette Pasteur, les protoplastes ont été mélangés dans le rapport 1:3 (tournesol/chicorée) afin d'obtenir une suspension contenant entre 7 et 11.10^6 protoplastes/ml.

Les protoplastes ont été fusionnés selon la méthode de Kao (Wetter LRL and Constabel F (eds) Plant Tissue Culture Methods, ch 7, pp 49-56, 1982) avec les modifications suivantes : un volume d'une solution de mélange de protoplastes a été placé dans une boîte de Pétri et trois volumes
5 de solution à 30% de polyéthylène glycol (PEG 4000 Serva) avec 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été ajoutés goutte à goutte. Après une homogénéisation douce, on a laissé la solution reposer pendant trois minutes. Une minute plus tard on ajoute à nouveau 3,5 volumes de la solution numéro 3 de Kao (1982). Puis 3,5 volumes de solution numéro 3 de
10 Kao (1982) sont ajoutés et 3 min plus tard 6 x 3,5 volumes de milieu de lavage (Saksi N et al. CR Acad. Sci. Paris 302 : 165-170, 1986) sont ajoutés. On récupère les protoplastes après 10-15 min, par centrifugation (8 min, 100 x g) ; ils sont ensuite lavés 3 fois par des aliquots de 8 ml du milieu de lavage et remis en suspension dans le milieu de culture MC1 (Saksi et al, 1986)
15 dans lequel la concentration d'acide 1-naphthylacétique (NAA) est de 2 mg/l, celle de l'inositol 250 mg/l et de KNO₃ 144 mg/l.

Après un ou deux jours de culture dans ce milieu à une densité de 2.10⁴ protoplastes/ml, les hétérokaryocytes isolés sont cultivés à basse densité (12/100 µl) à 30° C dans un milieu MC1 modifié (0,5 mg/l NAA)
20 auxquels sont ajoutés de l'acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique (MES) (5 mM), de l'hydrolysate de caséine (150 mg/l) et du lait de coco (2% ; v/v).

Un mois plus tard, les colonies dérivées des fusions de protoplastes hétéroplasmiques sont transférées sur un milieu de prolifération puis sur un milieu de régénération (Rambaud et al. 1990). Après enracinement, les
25 plantes ont été transférées en serre pour quelques semaines puis transplantées dans les champs.

Les plantes obtenues présentent un phénotype de chicorée. Parmi celles-ci, la lignée désignée par CT 52/3 présente une stérilité mâle par défaut de déhiscence des anthères ; la lignée CT 41/1 présente une stérilité
30 mâle par absence complète d'anthère.

Exemple 2

Matériels et méthodes

Matériel végétal

5 Seize populations de chicorées industrielles à cytoplasme normal numérotées FD1 à FD16, la chicorée industrielle cv. Pévèle, et une famille de chicorée industrielle (CT 41/1) 20540 U à stérilité mâle cytoplasmique (SMC) fournies par la société Florimond-Desprez, une chicorée CT 52/3 (SMC), le tournesol cv. Mirasol (SMC). Les jeunes feuilles ont été prélevées
10 sur des plantules élevées en serre et conservées à -80° C.

ADN

Adaptation des protocoles du Laboratoire de Dellaporta (Plant. Mol. Report., 1983) pour la miniextraction d'ADN total : les opérations ont lieu à
15 4° C. Broyer finement avec de l'azote liquide un fragment foliaire de 150 à 200 mg en poids frais. Transférer dans un microtube de 2 ml. Ajouter 940 µl de solution tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 50 mM, NaCl 0,5 M, β-mercaptoéthanol 10 mM. Ajouter 62 µl de SDS 20% et vortexer vigoureusement. Incuber à 65° C pendant 15 min. Ajouter 310 µl d'acétate
20 de potassium 5 M et vortexer vigoureusement. Laisser précipiter pendant 30 min. Centrifuger. Centrifuger 15 min à 17.500 g. Transférer 1 ml du surnageant dans un microtube de 2 ml. Ajouter 0,5 ml d'isopropanol et mélanger. Laisser précipiter pendant 15 min. Centrifuger 10 min à 12.000 g. Décanter le surnageant avec une micropipette. Sécher les culots dans un
25 appareil Speed-Vac pendant 10 min en position basse température. Redissoudre les culots dans 100 µl de solution tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, ribonucléase A 0,2 mg/ml et incuber 2h à 37° C. Réaliser trois extractions phénoliques suivies d'une extraction au chloroforme. Ajouter 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et deux volumes
30 d'éthanol absolu à 4° C. Laisser précipiter 15 min à 4° C. Centrifuger 10 min à 12.000 g. Rincer le culot avec de l'éthanol 70% à 4° C. Centrifuger 3 min à 12.000 g. Décanter avec une micropipette et sécher au Speed-Vac pendant 10 min à basse température. Reprendre le culot dans une solution tampon Tris-HCl 1 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM.

Quantification à partir d'un aliquot de 5 µl par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,8%, TBE 1x, BET 0,5 µg/ml.

PCR

- 5 Deux amorces de 23 et 26 bases qui délimitent un fragment de 347 pb interne à la séquence orf 522 (Köhler et al., Mol. Gen. Genet., 1991). Séquences des amorces :

SEQ ID NO 1 : 5'CCCCCTCCCTGGTGGATCCGGCG 3'

SEQ ID NO 2 : 5'CCCTCTATGAGTACCGTTCTCTCACG3'

- 10 Progamation du thermocycleur 60 Bio-Med : premier cycle : 3 min, 92° C ; 30 cycles : 1.30s, 92° C ; 2.30s, 55° C ; 3.1 min, 72° C ; dernier cycle : 5 min, 72° C. Milieu réactionnel : Tampon Appligène 1x : Tris-HCl 10 mM pH 9.0. Triton X-100 0,1%, MgCl₂ 1,5mM, BSA 0,2 mg/ml ; dNTP 100 µM ; amorces 0,2 µM chacune ; Taq polymérase Appligène 2 U/100 µl ; ADN matrice 50
15 ng/ 100 µl ; H₂O QSP 10 µl ; huile minérale : 50 µl. Analyse des produits par électrophorèse horizontale en gel d'agarose 1,6% TBE 1x, BET 0,5 µg/ml.

Hybridations

- 20 Technique classique de transfert par la méthode de Southern ("Maniatis"). Marquage chimique de la sonde orf 522 avec le kit Dig-High-Prime (Boehringer-Mannheim). Révélation selon le protocole Boehringer-Mannheim avec le CSPD (Tropix) comme substrat chimioluminescent. Durée d'exposition des membranes : de une heure à une nuit pour les fragments très faiblement amplifiés.

25

Résultats

- Les ADN totaux de 4 individus par population FD1 à FD16, de 8 individus de la famille 20540 U, de la chicorée CT 52/3 et du tournesol "Mirasol", ont été extraits, soit au total 73 individus. L'absence d'inhibition
30 de la PCR par des impuretés présentes dans les extraits d'ADN a été vérifiée en ajoutant quelques dizaines de femtogrammes du fragment de 347 pb à chaque milieu réactionnel. Les analyses PCR de l'ADN 52/3, de l'ADN tournesol "Mirasol", et des ADN de la famille 20540 U permettent toutes

l'amplification d'une quantité importante (200 ng approx.) du fragment de 350 pb environ de l'orf 522. Ce fragment est absent chez toutes les chicorées à cytoplasme normal. L'analyse de ces produits PCR par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde orf 522 préparée par PCR à partir d'ADN total de tournesol Mirasol confirme l'homologie entre le
5 fragment amplifié chez les chicorées (SMC) et la sonde.

Conclusion

10 Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'orf 522 n'est pas présente chez les chicorées fertiles. La détermination par PCR de la présence/absence de la séquence orf 522 peut donc être envisagée pour l'analyse de routine.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

- (i) DEPOSANT:
 - (A) NOM: FLORIMOND DESPREZ VEUVE ET FILS
 - (B) RUE: BP 41
 - (C) VILLE: CAPPELLE EN PEVELE
 - (E) PAYS: PARIS
 - (F) CODE POSTAL: 59242
- (ii) TITRE DE L' INVENTION: GENOME VEGETAL RECOMBINE, COMPORTANT DES GENES SPECIFIQUES DES CHICOREES ET UNE SEQUENCE NUCLEOTIDIQUE CONFERANT UNE STERILITE MALE ET SON UTILISATION
- (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2
- (iv) ADRESSE DE LA CORRESPONDANCE:
 - (A) NOM: Swabey Ogilvy Renault
 - (B) ADRESSE: 1981 McGill College, Suite 1600
 - (C) VILLE: Montréal
 - (D) ÉTAT: Québec
 - (E) PAYS: Canada
 - (F) CODE POSTAL: H3A 2Y3
- (v) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
 - (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
 - (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 - (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:
 - (A) NUMERO DE LA DEMANDE: 2,256,756
 - (B) DATE DE DEPOT: 30-MAI-1997
- (vii) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:
 - (A) NUMERO DE LA DEMANDE: PCT/FR97/00944
 - (B) DATE DE DEPOT: 30-MAI-1997
- (vii) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:
 - (A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 96/06725
 - (B) DATE DE DEPOT: 31-MAI-1996

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

10a

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

CCCCCTCCCT GGTGGATCCG GCG

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 26 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CCCTCTATGA GTACCGTTCT CTCACG

26

REVENDICATIONS

1. Génome végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il comporte des
5 gènes spécifiques des chicorées et une séquence nucléotidique conférant
une stérilité mâle, portée par la séquence orf 522 de tournesol (*Helianthus
annuus*), ou par une séquence présentant au moins 50% d'homologie avec
ladite séquence orf 522.

2. Mitochondrie, caractérisée en ce qu'elle comporte un génome
10 recombiné selon la revendication 1.

3. Mitochondrie selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle
contient au moins un fragment nucléotidique de 347 pb, portée par la
séquence orf 522, ou une séquence présentant au moins 50% d'homologie
avec ledit fragment.

4. Cytoplasme végétal recombiné, caractérisé en ce qu'il contient un
15 noyau comportant le génome du genre *Cichorium*, et un génome
recombiné selon la revendication 1.

5. Cytoplasme selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il
contient des mitochondries comportant une séquence nucléotidique portée
20 par la séquence orf 522 de *Helianthus annuus*, ou par une séquence
présentant au moins 50% d'homologie.

6. Cytoplasme selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il
contient des mitochondries selon la revendication 3.

7. Cellule végétale recombinée, caractérisée en ce qu'elle contient
25 un cytoplasme selon l'une des revendications 4 à 6.

8. Cellule végétale selon la revendication 7, caractérisée en ce
qu'elle contient un noyau comportant substantiellement le génome d'une
espèce choisie parmi *Cichorium intybus* et *Cichorium endivia*.

9. Procédé pour produire une plante du genre des Chicorée ou du
30 matériel de reproduction de cette plante, présentant une stérilité mâle
cytoplasmique, caractérisé en ce qu'on intègre dans le génome cellulaire
de cette plante une séquence nucléotidique portée par la séquence orf 522
de *Helianthus annuus*, ou par une séquence présentant au moins 50%
d'homologie avec ladite séquence orf 522.

35

10. Utilisation de la séquence orf 522 de *Helianthus annuus* ou d'une séquence présentant au moins 90% d'homologie avec la séquence orf 522, pour conférer une stérilité mâle cytoplasmique à une plante du genre *Cichorium*.

- 5 11. Procédé de sélection d'une stérilité mâle cytoplasmique chez une plante du genre *Cichorium*, caractérisé en ce qu'on met en contact l'acide nucléique mitochondrial de la plante avec une sonde marquée comprenant au moins 10 nucléotides de la séquence orf 522.