



(72) DROUAUD, JAN, FR

(72) FOURGOUX, AGNES, FR

(72) PELLETIER, GEORGES, FR

(72) GUERCHE, PHILIPPE, FR

(71) INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE-  
INRA, FR

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/82, C12N 15/29, A01H 5/10, A01H 1/02, A01H 5/00

(30) 1997/09/23 (97/11812) FR

(54) **PROMOTEUR SPECIFIQUE DES MICROSPORES ET PROCEDE  
D'OBTENTION DE PLANTES HYBRIDES**

(54) **MICROSPORE-SPECIFIC PROMOTER AND METHOD FOR  
OBTAINING HYBRID PLANTS**

(57) L'invention concerne un promoteur spécifique des microspores ainsi que sa mise en oeuvre pour obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible. Elle concerne également un procédé d'obtention de plantes hybrides.

(57) The invention concerns a microspore-specific promoter and its use for obtaining plants with gametophytic male sterility with inducible fertility. It also concerns a method for obtaining hybrid plants.

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

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

<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/82, 15/29, A01H 1/02, 5/00, 5/10</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/15678</b> (43) Date de publication internationale: 1er avril 1999 (01.04.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02042 (22) Date de dépôt international: 23 septembre 1998 (23.09.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/11812 23 septembre 1997 (23.09.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DROUAUD, Jan [FR/FR]; 7, rue du Général Leclerc, F-78000 Versailles (FR). FOURGOUX, Agnès [FR/FR]; Chemin des Quatre Arpents, F-78330 Fontenay Le Fleury (FR). PELLETIER, Georges [FR/FR]; 28, avenue de l'Espérance, F-91440 Bures sur Yvette (FR). GUERCHE, Philippe [FR/FR]; 7, rue Marceau, F-92170 Vanves (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: MICROSPORE-SPECIFIC PROMOTER AND METHOD FOR OBTAINING HYBRID PLANTS (54) Titre: PROMOTEUR SPECIFIQUE DES MICROSPORES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES HYBRIDES (57) Abstract The invention concerns a microspore-specific promoter and its use for obtaining plants with gametophytic male sterility with inducible fertility. It also concerns a method for obtaining hybrid plants. (57) Abrégé L'invention concerne un promoteur spécifique des microspores ainsi que sa mise en oeuvre pour obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible. Elle concerne également un procédé d'obtention de plantes hybrides.</p>		

## PROMOTEUR SPECIFIQUE DES MICROSPORES ET PROCEDE D'OBTENTION DE PLANTES HYBRIDES

La présente invention concerne notamment un promoteur spécifique des  
5 microspores et un procédé d'obtention de plantes hybrides.

La microspore correspond à un stade précis du développement du gamète  
mâle chez les plantes supérieures. La gamétogenèse mâle a lieu dans un organe  
spécialisé, l'anthere, et comprend *sensu stricto* la différenciation de cellules  
diploïdes en grains de pollen haploïdes. Chaque cellule diploïde appelée cellule  
10 sporogène subit une méiose pour produire quatre microspores haploïdes qui se  
différencient par la suite pour donner des grains de pollen matures.

Connaître et savoir manipuler les facteurs moléculaires qui contrôlent le  
développement de la microspore est un enjeu considérable non seulement d'un  
point de vue de la recherche fondamentale mais aussi d'un point de vue de  
15 l'amélioration des plantes. En effet, cette connaissance permet de maîtriser la  
production de grains de pollen et par conséquent la reproduction de la plante.

Une telle maîtrise passe par l'obtention de plantes totalement stériles pour  
l'un de leur gamète de façon à empêcher l'autofécondation.

Jusqu'à présent, la stérilité mâle des plantes, moins complexe que la  
20 stérilité femelle, a été largement étudiée mais nécessite l'utilisation de systèmes  
génétiques relativement lourds à mettre en œuvre pour la production commerciale  
de semences hybrides. Un type de stérilité mâle très utilisée est la stérilité mâle  
cytoplasmique qui consiste en l'obtention :

- d'une lignée femelle dont le caractère mâle-stérile est transmis par le  
25 cytoplasme ; on appelle un tel cytoplasme un "cytoplasme inducteur de  
stérilité mâle" ; ces "cytoplasmes inducteurs" pour une espèce donnée  
sont en général soit découverts dans la nature, soit observés parfois  
chez des plantes résultant de croisements interspécifiques (fécondation  
croisée, fusion de protoplastes etc...),

- d'une lignée "mainteneuse" de stérilité dont le cytoplasme est normal, et
- d'une lignée restauratrice de fertilité si l'on récolte les graines et/ou les fruits de la plante hybride.

5 Dans la lignée femelle (porteuse du cytoplasme inducteur de stérilité) tous les grains de pollen sont tués. Il est donc nécessaire pour multiplier et améliorer cette lignée de disposer d'une lignée ne portant ni le cytoplasme inducteur (donc produisant des grains de pollen) ni le gène de restauration. Cette lignée est dite "mainteneuse" de stérilité car le croisement avec la lignée femelle donne une  
10 descendance entièrement femelle.

La restauration de la fertilité est réalisée dans l'hybride par le croisement du parent femelle (portant le cytoplasme mâle stérile) avec le parent comprenant un gène nucléaire de la restauration (la lignée restauratrice), ce croisement permettant l'obtention de plantes hybrides fertiles qui produiront des graines par  
15 autofécondation.

Dans le cas de la stérilité nucléaire sporophytique, il a été décrit, par exemple, des systèmes permettant de tuer les cellules mères des microspores au moyen d'une RNase et par conséquent d'obtenir des plantes dépourvues de gamètes mâles. La fertilité est restaurée au moment du croisement de la lignée ne  
20 produisant plus de gamètes mâles avec une autre lignée portant un inhibiteur de la RNase, les graines résultant de ce croisement comprenant à la fois le gène cytotoxique et son inhibiteur.

La présente invention propose quant à elle d'obtenir des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique et incapables de produire des grains de pollen.  
25 Elle consiste à mettre en œuvre une région promotrice contrôlant l'expression spécifiquement dans les microspores d'un gène codant pour une molécule cytotoxique tout en disposant d'un moyen permettant l'inhibition contrôlée de cette toxicité afin d'obtenir une lignée de plantes génitrices homozygotes totalement stériles quant à leurs gamètes mâles et ensuite obtenir des plantes

hybrides fertiles (produisant un grain de pollen viable sur deux), donc capables de produire des graines, sans avoir recours à l'utilisation d'un gène de restauration de la fertilité.

Jusqu'à présent, un seul gène s'exprimant spécifiquement dans la  
5 microspore a été décrit chez le tabac (Oldenholf et al., 1996). Ce gène ne possède pas d'homologue chez les Brassicacées comme cela résulte d'une expérience de Southern blot sur de l'ADN génomique de *Brassica oleracea* (données non montrées).

La présente invention a donc pour objet une séquence nucléotidique dont il  
10 a été démontré que le gène correspondant s'exprime spécifiquement dans la microspore, cette séquence nucléotidique correspond à SEQ ID N° 3.

Par conséquent, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :

- a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
- 15 b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
- c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).

Dans le cadre de la présente invention, la partie la plus intéressante de cette séquence nucléotidique est la région promotrice définie comme étant la séquence précédant (côté 5') le codon de début de traduction (ATG). Cependant,  
20 au stade actuel des connaissances de la séquence nucléotidique selon SEQ ID N° 3, trois ATG ont été mis en évidence. Un en position 1965, un autre en position 2085 et un troisième en position 2112. Il semblerait que l'ATG fonctionnel soit celui situé en position 2085. Ceci n'est cependant pas confirmé, c'est la raison pour laquelle la plus grande région promotrice envisageable concernant SEQ ID  
25 N° 3 s'étend du nucléotide 1 au nucléotide 2111 et préférentiellement du nucléotide 1 au nucléotide 2084.

Cette région promotrice précède donc, à l'état naturel, une séquence codante (orf) qui est exprimée spécifiquement dans les microspores et dans le cas où cet orf est remplacé (par manipulation génétique) par un autre orf dont le

produit est une molécule cytotoxique, cette dernière est susceptible de ne détruire que lesdites microspores.

La présente invention a donc également pour objet des vecteurs d'expression cellulaire comprenant une séquence promotrice telle que ci-dessus  
5 décrite placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.

Avantageusement, le produit cytotoxique en question est une protéase. En effet, lorsque la protéase s'exprimera spécifiquement dans les microspores, elle en détruira toutes les protéines, ce à quoi la microspore ne pourra pas survivre.  
10 Préférentiellement, la protéase est une subtilisine et en particulier la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*. Cette subtilisine BPN' fait partie de la famille des subtilisines que l'on trouve chez de nombreux organismes et qui sont des protéases connues pour couper les protéines au niveau des sérines.

Il s'agit donc d'introduire un vecteur conforme à l'invention dans une  
15 souche bactérienne susceptible de réaliser la transformation de cellules de plantes telle qu'*Agrobacterium tumefaciens*. Ceci peut notamment être réalisé par la méthode d'infiltration de plantes d'*Arabidopsis thaliana* décrite par Bechtold et al., 1993. Cette technique consiste à introduire la bactérie dans les cellules des hampes florales par infiltration sous vide. Les plantes sont ensuite repiquées en  
20 serre et leur graines récoltées. Environ une graine sur mille donnent naissance à des plantes dont toutes les cellules portent le transgène. La transformation d'autres plantes, et notamment du colza, peut être réalisée par l'intermédiaire d'*Agrobacterium tumefaciens* et/ou *Agrobacterium rhizogenes* à l'aide de diverses techniques, maintenant classiques (transformation de disques foliaires,  
25 d'hypocotyles, de hampes florales etc...) associant une phase de coculture de la bactérie avec les tissus végétaux, suivie de la sélection et de la régénération des cellules transformées en plantes entières. D'autres techniques de transformation ne font pas intervenir cette bactérie et permettent de transférer directement le gène cloné dans des cellules ou des tissus (electroporation, canon à particules etc...) et

de sélectionner et d'obtenir des plantes transformées (revue par Siemens and Schieder).

La présente invention a également pour objet les cellules de plantes transformées par un vecteur conforme à l'invention ainsi que des plantes  
5 comprenant lesdites cellules.

L'invention a également pour objet des plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.

Comme indiqué précédemment, la présente invention permet donc  
10 l'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique inhibant toute production de grains de pollen. Cependant, ces plantes homozygotes quant à leur stérilité mâle ne peuvent être obtenues qu'après autofécondation de plantes préalablement transformées par un vecteur conforme à l'invention, c'est-à-dire hémizygotés quant à leur stérilité mâle et chez lesquelles on a restauré  
15 provisoirement la fertilité des grains de pollen porteurs de la stérilité gamétophytique pour leur permettre de réaliser une autofécondation.

Un moyen d'obtenir des plantes homozygotes pour ce gène serait d'utiliser la gynogenèse, technique qui consiste à régénérer des plantes haploïdes doublées à partir de culture d'ovules ou d'ovaires. Il s'agit dans ce cas d'obtenir la formation  
20 d'une plante homozygote diploïde à partir du gamète femelle haploïde. La gynogenèse est applicable à un certain nombre d'espèces végétales mais il n'est pas envisageable de produire un grand nombre de plantes homozygotes pour le transgène en question par cette technique, car sa mise en œuvre est délicate et son efficacité reste le plus souvent très faible.

25 La présente invention concerne également un procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :

- l'insertion dans des plantes de lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et

- l'obtention des plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

Plus particulièrement, le procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible conforme à l'invention comprend les étapes de :

- 5 a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention,
- b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la cytotoxicité du produit,
- c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
- 10 d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
- e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).

Ainsi, à l'étape a) du procédé ci-dessus, on transforme une lignée A avec un vecteur conforme à l'invention c'est-à-dire comprenant une séquence  
15 promotrice spécifique des microspores placée en amont d'un gène codant pour un produit cytotoxique. Les plantes résultant de cette transformation comprennent toute l'ADN en question dont le gène ne s'exprime que dans les microspores. Cependant, à ce stade, la plante étant diploïde au moment de la transformation, elle devient hétérozygote quant à sa stérilité mâle et n'est donc capable, après  
20 transformation, de donner lieu qu'à 50 % de microspores viables (les 50 % autres étant détruits suite à l'expression du transformant).

A l'étape b), la restauration ou l'induction de la fertilité perdue par la plante transformée est donc ensuite réalisée par l'inhibition de la toxicité du produit du gène transformant.

25 Ceci peut se faire de diverses manières, cependant, dans le cas où le produit cytotoxique en question est une subtilisine et en particulier, la subtilisine BPN' de *Bacillus amyloliquefasciens*, l'inhibition est réalisée par l'action sur la plante transformée d'une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés (n'ayant donc *a priori* pas d'action sur les plantes). En effet, cette molécule

appliquée durant l'anthèse, est susceptible de restaurer la fertilité totale des plantes hémizygotés par inhibition de la subtilisine. Elle peut par exemple être appliquée au pied de la plante et atteindre tous les tissus. Comme un insecticide, elle ne devrait avoir aucun effet sur la plante, cependant, elle jouera son plein effet au  
5 niveau des microspores, seuls organes exprimant la subtilisine.

Ensuite, à l'étape c), on procède à l'autofécondation des plantes dont la fertilité a été restaurée puis, à l'étape d), on sélectionne les plantes homozygotes quant à la stérilité mâle et par conséquent totalement stériles en l'absence de traitement c'est-à-dire d'inhibition du produit cytotoxique.

10 Les plantes ainsi obtenues, incapables de produire des gamètes mâles mais toujours capables de produire des gamètes femelles, c'est-à-dire des ovules, peuvent donc être croisées avec une autre lignée de plantes totalement fertiles et présentant des caractéristiques agronomiques intéressantes. Dans ce croisement, la plante homozygote quant à la stérilité mâle joue le rôle de parent femelle tandis  
15 que l'autre plante joue le rôle de parent mâle. L'hybride résultant de ce croisement est hémizygote quant à la stérilité mâle et est donc susceptible de produire 50 % de grains de pollen viables (les autres portant le transgène sont donc détruits par le produit cytotoxique). Une production de 50 % du pollen est amplement suffisante pour donner lieu à des graines présentant les qualités de chacune des lignées  
20 croisées que l'on cherchait précisément à associer.

La présente invention concerne donc également un procédé d'obtention de plantes hybrides caractérisé en ce qu'il comprend le croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique comme ci-dessus décrit avec des plantes de lignée B d'intérêt agronomique. Elles concernent également  
25 les graines issues des plantes hybrides ainsi obtenues.

Avantageusement, les plantes conformes à l'invention appartiennent à la famille des Brassicacées ; préférentiellement, il s'agit du colza.

Par ailleurs, il est à souligner que la région promotrice conforme à l'invention peut également être mise en œuvre dans des stratégies d'inactivation de

gène par utilisation d'éléments mobiles tels que les transposons et rétrotransposons.

En effet, ceci peut être réalisé dans le but d'isoler des plantes présentant un génotype mutant stable et d'isoler de très nombreux mutants différents et  
5 indépendants.

Il s'agit de créer une séquence chimérique constituée d'une région promotrice conforme à l'invention et de la séquence, en tout ou partie, d'un élément mobile. L'expression de cet élément mobile, réduite à la phase de développement de la microspore, devrait permettre d'induire quelques mutations  
10 dans le génome des grains de pollen de la plante transformée. Il est alors possible, dans la descendance obtenue à partir de ces grains de pollen, d'isoler des individus ne portant plus le transgène mais seulement une ou plusieurs mutations issues de phénomènes de transposition. Le principe est de provoquer, grâce à la susdite région promotrice, l'activation de la transposition de ces éléments mobiles pendant  
15 un temps très court (la microsporogénèse) dans une multitude de cellules gamétiques et supprimer à la génération suivante les plantes qui portent le transgène (à savoir la région promotrice + la séquence permettant l'activation de la transposition) de façon à ce que le cycle ne recommence pas. Il s'agit ensuite de rechercher, dans la descendance et par divers techniques, les plantes pour  
20 lesquelles les éléments mobiles ont provoqués des mutations en s'insérant dans les gènes. L'étude de ces plantes permettrait notamment de comprendre la fonction du gène muté.

Parmi les éléments mobiles susceptibles d'être ainsi utilisés, on peut citer les rétrotransposons de types Tnt1, Tto1, Tnp-2, Tos10-17, Bs1, BARE-1, Ta-1,  
25 etc... ou les transposons de type Ac/Ds, Spm, Mu, etc...

La figure 1 illustre l'alignement des séquences des deux ADNc M3 (SEQ ID N° 1) et M3.21 (SEQ ID N° 2) issues des criblages de la banque ADNc de microspore de *Brassica napus* cv.Brutor. Les codons de début (ATG) et de fin (TGA) de la séquence codante putative sont soulignées.

La figure 2 donne la séquence nucléotidique du clone BnM3.4 (SEQ ID N° 3) dont l'ADNc de M3 serait issu. L'ATG en gras (position 2085) est celui qui a la plus forte probabilité d'être l'ATG fonctionnel. L'ATG souligné en position 2112 est celui qui est présent dans la séquence de l'ADNc de M3.21. L'ATG souligné en position 1965 est le premier ATG rencontré. La séquence précédant ces ATG est considérée par conséquent comme la région promotrice du gène BnM3.4.

La figure 3 illustre l'hybridation de type Northern blot avec la sonde M3 marquée au  $^{32}\text{P}$  sur des ARN totaux (10  $\mu\text{g}$  par puits) extraits de différents tissus de colza. A : boutons de 0-2 mm (méiocytes); B : boutons de 2-3 mm (microspores uninucléées); C : boutons de 3-4 mm (microspores binucléées); D : boutons supérieurs à 4 mm (grains de pollen matures); E : sépales de colza; F : pistils de colza; G : boutons de colza mâle stérile; H : boutons entiers de colza.

La figure 4 illustre la préparation du plasmide pJD51 de 7152 pb à partir du plasmide pAF1 de 5 135 pb (plasmide d'origine : pBluescript SK- PROMEGA) et du plasmide pBnB2 de 5458 pb (plasmide d'origine pBS SK- PROMEGA).

La figure 5 illustre la préparation du plasmide pJD101 de 19670 pb à partir du plasmide pEC2 de 15400 pb dérivé du plasmide pDHB 321.1, (D. Bouchez, communication personnelle) et du plasmide pJD51 (cf figure 2).

La figure 6 représente un schéma de sélection de variétés hybrides d'une plante (colza par exemple) faisant appel à un système de stérilité mâle gamétophytique avec induction de la fertilité. SMGfi : stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible; Induction F : induction de la fertilité; AF : autofécondation.

L'invention ne se limite pas à la seule description ci-dessus, elle sera mieux comprise à la lumière des exemples ci-après qui ne sont cependant donnés qu'à titre purement illustratif.

**EXEMPLE 1 : Mise en évidence d'un promoteur spécifique des microspores**

La première étape a consisté en l'obtention de clones d'ADN complémentaires (ADNc) exprimés spécifiquement dans la microspore de colza. Pour cela, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARN messagers (ARNm) de microspores de colza. Parallèlement, des ADNc ont été synthétisés à partir d'ARNm de boutons floraux de colza mâles stériles. Les ADNc provenant desdits boutons floraux ont été soustraits des ADNc dérivés des ARNm exprimés dans la microspore de colza. Les molécules résultant de cette soustraction ont été utilisées lors d'une expérience d'hybridation différentielle d'une banque d'ADNc de microspore selon une technique similaire à celle présentée par Atanassov et al. (1996).

L'un de ces clones isolés, l'ADNc M3 (SEQ ID N° 1) s'est avéré être le représentant d'un ARNm spécifiquement exprimé dans la microspore de colza. Un autre ADNc, nommé M3.21 (SEQ ID N° 2) a été trouvé par criblage de la banque avec l'ADNc M3. Les séquences de ces deux ADNc présentent 89 % d'identité (figure 1), ils sont issus visiblement d'une famille de gènes très proches, exprimés spécifiquement dans la microspore.

Le clone d'ADNc M3 a servi de sonde pour cribler une banque d'ADN génomique de colza commercialisée par CLONTECH Laboratories, Inc., 4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303-4607, USA ; deux clones (BnM3.4 et BnM3.2) correspondants à deux gènes différents ont été isolés. L'ADNc M3 serait issu du gène BnM3.4 (SEQ ID N° 3) car celui-ci porte un orf identique à l'ADNc M3 (figure 2). Ce gène ne possède pas d'intron. Suffisamment de résultats expérimentaux laissent à penser que l'ADNc M3.21 ne serait pas issu du deuxième gène isolé (BnM3.2) qui porte bien une région correspondant à la séquence de l'ADNc M3.21, mais à un troisième gène, très proche du gène BnM3.2.

La région promotrice de ce gène est définie comme étant la séquence immédiatement en amont du codon de début de traduction (ATG).

**EXEMPLE 2 : Vérification de la spécificité du promoteur du gène BnM3.4**

#### A/ Northern blot

Une analyse par Northern blot a été effectuée avec 10 µg d'ARN total de sépales, de pistil, de boutons entiers, de boutons de plante mâle stérile, de méïocytes, de microspores, de grains de pollen binucléés et de grains de pollen trinucléés, hybridés avec l'ADNc M3. Une bande de 1 kb correspond au transcrit du gène BnM3.4 et aussi au transcrit M3.21, puisqu'ils ont des séquences très proches. Ces transcrits sont uniquement présents dans les deux premiers stades de la gamétogenèse mâle dont les produits sont difficiles à isoler parfaitement de façon expérimentale (figure 3).

Les protéines déduites de ces deux clones d'ADNc sont évidemment très proches et sont riches en glycine et proline. Elles ne sont strictement identiques à aucune autre protéine des banques de données mais interviennent certainement dans la constitution de la paroi.

#### B/ Transformation par un gène chimérique

Différents gènes chimériques (c'est-à-dire constitués de la séquence codante d'un gène connu précédée de la région promotrice conforme à l'invention) ont été construits afin d'étudier la spécificité spatio-temporelle du promoteur de BnM3.4.

La figure 4 présente la construction d'un vecteur bactérien pJD51 associant un fragment du promoteur BnM3.4 avec la séquence codante du gène de la β-glucuronidase. Le plasmide pAF1 contenant la séquence codante de β-glucuronidase et la séquence de terminaison de transcription du gène NOS d'*Agrobacterium tumefaciens* a été digéré par les enzymes BamHI et ClaI. Le plasmide pBnB2 contient un fragment BamHI-BamHI de 6 kb issu du clone d'ADN génomique BnM3.4 et dans lequel est présent le gène BnM3.4. Un fragment correspondant à la plus grande région promotrice possible compte tenu des sites de restriction (2056 pb) a été isolé du plasmide pBnB2 par une double digestion BamHI-NspV et inséré entre les sites BamHI et ClaI (compatible avec NspV) du plasmide pAF1.

Le gène chimérique ainsi construit a été isolé par une digestion NotI du plasmide pJD51 pour être cloné dans un plasmide binaire d'*Agrobacterium tumefaciens* : pEC2 ouvert par l'enzyme NotI (figure 5).

Le plasmide binaire pJD101 contenant le gène chimérique a été introduit dans la souche C58C1 (pMP90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al. 1986) par électroporation et les transformants possédant le pJD101 ont été sélectionnés sur un milieu contenant de la kanamycine. Un de ces transformants d'*Agrobacterium* a été utilisé pour transformer *Arabidopsis thaliana* (écotype Wassilevskja) par la méthode d'infiltration des hampes florales décrite par Bechtold et al. 1993. Les plantes transformées sont sélectionnées grâce à leur résistance à la phosphinothrycine, conférée par un gène de résistance inséré conjointement dans l'ADN-T.

Parmi ces plantes, certaines présentent une expression de la  $\beta$ -glucuronidase spécifiquement dans les microspores (mis en évidence par une coloration bleue lors de l'ajout d'un substrat spécifique de la  $\beta$ -glucuronidase, le X-Glu). Aucune coloration n'est présente dans les tissus adjacents de l'anthere de même que dans les tissus somatiques de la plante. Chez une plante transformée hémizygote pour le gène chimérique, la moitié des microspores produites sont bleues car elles seules contiennent le gène chimérique.

La spécificité d'expression conférée par cette séquence promotrice de 2 kb est bien restreinte, dans les limites de la sensibilité de la technique, à un seul type cellulaire et à partir du stade microspore.

**REFERENCES**

- 5    Atanassov I et al. (1996) *Plant Science* 118, 185-194
- Bechtold N. et al (1993) *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences* 316,  
      1194-1199
- 10   Koncz et al. 1986) *Molecular General Genetics* 204, 383-396
- Mariani et al. *Nature* 347(1990) 737-741
- Oldenhof M.T. et al. (1996) *Plant Molecular Biology* 31, 213-225
- 15   Siemens and Schieder 1996. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 2, 66-75

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: INRA (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE)
- (B) RUE: 147 RUE DE L'UNIVERSITE
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75007

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Promoteur spécifique de microspores et procédé d'obtention de plantes hybrides

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

## (iv) 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)

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

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 497 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

## (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: M3

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

TTGGATCTT TCCATGACCC CTTCTTGACC GGCTATGTCA AGCTACATTG CTCCACCGTT	60
GTTGGATCTA CTTACCTCC TCCTTCACAG GCTCCTTAC ATGCTCCTTC TTCACAGGCT	120
CCTTCACATG CTCCTTCACA TGCTCCTTCA CAGGCTCCTT TAAATGCTCT TTTAAATGCT	180
CCTTTACATG CTCCTTTACA TGCTCCTTCA CAGGCCCTT CACAGGCCCC TTCACAGGCC	240
CCTTTACATG CTCCTTTACT GCCCCCTTCG CAGGCTCCTT CACCGGCTCA GTGATTTAGC	300
TATTTGATAG AATTACTCAA GTAATGATGC CCTAGGGAGT TTGAGTTTTT CTCGTGTTTT	360

WO 99/15678

PCT/FR98/02042

2

AAAGTTTTGT GTTTATTTTG AGAAAACCGT CTTTGGATT TAACTTCACT TTGATTTTTT 420  
 CCCTTATACA ATTTAAATTT AGAGTTTACT TATTAATTTT ATAAATTAGA TGGTACTAAG 480  
 TTTTATCAT AATAAAA 497

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

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 674 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

- (ix) CARACTERISTIQUE:  
 (A) NOM/CLE: M3.21

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

TCTTGCTATG ATTTTCTTCA TAAGATGTGT CACATCCAAA GTCACAGCAA CAGAACTAGA 60  
 GTCATCAACT AACCAAGAGC TCTTCCTATC GCGGCACTTG CCTCGCTTTC ACCCCAAGCC 120  
 ACATTGGCCG TTCTGTGGCT CCGGAAAAGC CTTCCCTGCA GGCCACTTCC GACCAACTCC 180  
 GTTCCATCTG CCACAGGAAG TCACCAGATG CTTGTCCGAC AAGAAGGAGG TAGGTACATG 240  
 TTTTGATGAT ATCGTTGAGA CTTTCTTCAC CAGGAAAGCC GTTATTGGAT CGGAATGTTG 300  
 CGCCGCGATC AAGAAGATGA ACAAAGATTG TGAGAAGACC GTCTTTGGAT CTTTCCATGA 360  
 CCCCTTCTTG ACAGGCTATG TCAAACCTACA TTGCTCCACC GTTGTTGGAT CTACTTCACC 420  
 TCCTCCTTCA CATGCTCCTT CACAGGCTCC TTTACATGCT CCTTCACAGG CTCCTTTACA 480  
 TGCCCCTTCA CAGGCTCCTT TACTGCCCCC TTCACAGCCT CTCCCACCGG CTCAGTGATT 540  
 TTAGCTATTT GTTAGAATTA TTCAAGTGTT GATGTCCTAG GGAGTTT TAG GTTTTTCTTG 600  
 TTTTAAATTT TTGTGTTTAT TTTGAGAAAA CCGTCTTTGG ATCTTAACTT CACTTTGATT 660  
 TTTTCCTTAT ACAA 674

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 2853 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: BnM3.4

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGATCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTTCCTAC CTTCATAAAT ATATATTTGT	60
TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAATCCTT TAGCTCAATG GTATAAATGT TGTTGTTTAG	120
ATTTCAATAA CCCGGGTTTCG AGTCATAGAC TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAAAGTGG	180
AACGCACATA TCGCTGACGT GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG	240
ATTTAAAAGT GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT	300
ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCTTT TTAAATCTTA ATAATAATAC CAGNGCTTTT	360
ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT CTTTTTTTTT GANCCGTTGA	420
TTGGTTTATG CTTATTTGAA TGTNGCCNAC GTAAGAAATG AAGAACAATT TATATTTGGA	480
GAAAATATAA TTTAATATGT TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA	540
TGGATGCGAG TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCTTTTCT CAAAAGTAA	600
AATATTTGAT ATGTAACCTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAATTA AATCAAATA	660
GAAAAACTG ATAGTGATCT ACCCTTCAAC GTTTTGAACT TATTCTTGGT TCACCCCCTA	720
AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAATTT CATTATTGCA TATTCTATAT CTTTLAGAAA	780
GTGAAACAAA ATATTATCAA GTTATATTAT GTTTTTCAA TAAAAGATA AAAAATAAAT	840
AAAAATAAT AGTAGTTACA AAAAAAAAAA ATTAATATTT TTACCAGCGT CANAAAACAC	900
TAAAACCTAA ACCCTAAATA TTAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTG GATAAATCTT	960
AAACATTAAG CATTAAAACA CTAAACCCTA AATCCTAAC TCTAAACCCT TAAGTGTTTA	1020
AATGTTTAGT GTTTTTGATT TATAGTTTAG GATTTATCCA AAGGTTAAG GTTTACCCAA	1080
GAGTTTATGG TTTAGGGATT ATGACTTAGG ATTTAGTGTT TTACTGACGA CGTTCAAAGT	1140
ATTTTTTAAA AAATATTTTT TTTGTAACAA CTAATTTTT TATTTATTTT TTTACCTTTT	1200
TATATTAATA ACATAATATA ATTTAATACT CCATCTGTTT CATATTAAGT GTCATTGTAA	1260

CATTATTTTT	TTGTTACAAA	AAAATTGTCA	CTTTAGAATT	CCAATGCAA	ATTTATTTAT	1320
TTTTCAGCTA	AAATTAATTG	CAAAGTGCAT	TGATCTTATA	AATAATTTTA	TTTATCTCAA	1380
ATGCTATATT	GGTCAAACAT	GTGTAATTAA	TAGAACTTA	ATTATATTTT	ATTTATTTTT	1440
TCTTAATCTG	TGTAAAATG	TCAAAGTAAA	ATTTATTTAG	AAACGAATTG	AGTAATATTT	1500
TGTTTCATTT	TTTAAAAGAT	ATCGAATATG	AAATAACACA	ATTTTATTGT	ATGATGAACC	1560
TAAAAATTCA	TCCTAAGAAG	GTGAACGCAA	GAATAAGTCA	ACGTTTTGGG	GAAAGCTAAC	1620
TATGGCCCAA	AGTCATCAA	ATCTTTCTTG	TATTTATCAA	AATCCTTACA	AATTTAGTTA	1680
GAGTTAATAG	ACCAAACACA	TGATTATCAT	CATATTAGAA	TATTCTAAAA	AATTACTAGC	1740
GAATAATTAA	AATCTTTCTT	TTATTTATCA	AAATCCTTAT	AAAACTTAT	TTATATATAC	1800
TAAAACAATT	TTAATTAAAA	GAAAATAAGG	GACCATGGAT	ACATAAAAAT	ATATGTTATT	1860
TCTTAAGATA	GTGATAATAT	TAATATATAC	CAGTCCATAT	ATTTATCAA	ATAAATAATA	1920
TTTTTCGTAG	TCCGATAATC	ATTACTATAA	ATTCATAAAA	CCACATGTAG	ATGTATATTT	1980
TATTTATATA	TATATATATA	AACCCTAACG	CCTTACCACT	CGATAACCAT	CAAACCTTTT	2040
CTTCTCGTTT	CGCTAACTCA	AGGCTTCGAA	AAGTAAAAAA	AACAATGAAG	AATGTCACAC	2100
TTGTTCTTGC	TATGATCCTC	TTCTTAAGCT	GTGTCACATC	CAAAGTTACA	GCAACAGAAC	2160
TAGAGTCATC	AACTAACCAA	GAGCTCTTCC	TATCGCGGCA	CTTACCTCGC	TTTCACCCCA	2220
AGCAACATTG	GCCGTTCCGT	GGCTCCGGAA	AAGCCTTCCC	TGCAGGCCAC	TTCCGACTAA	2280
CTCCGTTCCA	TCTGCCACAG	GAAGTCACCA	GATGCTTGAA	CGACAAGAAG	GAGGTAGGTA	2340
CATGTTTTAA	TGATATCGCT	GAGACTTTCT	TCACCAGGAA	AGCCGCTATT	GGATCGGAAT	2400
GTTGCGCCGC	GATCAAGAAG	ATGAACAAAG	ATTGTGAGAA	GACCGTCTTT	GGATCTTTCC	2460
ATGACCCCTT	CTTGACCGGC	TATGTCAAGC	TACATTGCTC	CACCGTTGTT	GGATCTACTT	2520
CACCTCCTCC	TTCACAGGCT	CCTTTACATG	CTCCTTCTTC	ACAGGCTCCT	TCACATGCTC	2580
CTTCACATGC	TCCTTCACAG	GCTCCTTTAA	ATGCTCCTTT	AAATGCTCCT	TTACATGCTC	2640
CTTTACATGC	TCCTTCACAG	GCCCCTTCAC	AGGCCCTTC	ACAGGCCCTT	TTACATGCTC	2700
CTTTACTGCC	CCCTTCGCAG	GCTCCTTCAC	CGGCTCAGTG	ATTTAGCTAT	TTGATAGAAT	2760
TATTCAGTA	TTGATGTCCT	AGGGAGTTTT	AGTTTTTTTC	TTGTTTTAAA	ATTTTGTGTT	2820
TATTTTGAGA	AAACCGTCTT	TGGATTTTAA	CTT			2853

**REVENDICATIONS**

1. Séquence nucléotidique correspondant à tout ou partie :
  - a) de la séquence selon SEQ ID N° 3, ou
  - 5 b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
  - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
  
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 correspondant à tout ou partie :
  - 10 a) de la séquence s'étendant du nucléotide 1 au nucléotide 2111, de préférence du nucléotide 1 au nucléotide 2084 de SEQ ID N° 3, ou
  - b) d'une séquence s'hybridant à la séquence selon a), ou
  - c) d'une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec a) ou b).
  
- 15 3. Vecteur d'expression cellulaire comprenant une séquence selon la revendication 2 placée en amont d'une séquence d'ADN codant pour un produit cytotoxique.
  
4. Vecteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que le produit  
20 cytotoxique est une protéase et de préférence une subtilisine.
  
5. Cellules de plante transformées par un vecteur selon la revendication 3 ou 4.
  
6. Plantes comprenant des cellules selon la revendication 5.
  
- 25 7. Plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant un gène codant pour un produit cytotoxique spécifique des gamètes mâles.
  
- 30 8. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible comprenant :

- l'insertion dans des plantes d'une lignée A d'un gène dont le produit d'expression est cytotoxique pour les microspores, et
- l'obtention de plantes ne produisant pas de gamètes mâles.

- 5 9. Procédé d'obtention de plantes présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 8 comprenant les étapes de :
- a) transformation de plantes d'une lignée A avec un vecteur selon la revendication 3 ou 4,
  - b) induction de la fertilité des plantes obtenues en a) par inhibition de la  
10 cytotoxicité du produit,
  - c) autofécondation des plantes fertiles obtenues en b),
  - d) sélection des plantes ne produisant pas de gamètes mâles issues de c),
  - e) multiplication des plantes obtenues en d) par reproduction des étapes b) et c).
- 15
10. Procédé d'obtention de plantes selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que, dans le cas où le produit cytotoxique est une subtilisine, l'induction de la fertilité consiste à appliquer à la plante une molécule insecticide de la famille des phosphofluorés.
- 20
11. Graines issues des plantes hybrides obtenues par croisement de plantes de lignée A présentant une stérilité mâle gamétophytique à fertilité inductible selon la revendication 7 ou tel qu'obtenues par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 8 à 10 avec des plantes de lignée B d'intérêt  
25 agronomique.
12. Plantes selon la revendication 7 ou obtenues par la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendication 8 à 10, caractérisées en ce qu'elles appartiennent à la famille des Brassicacées et de préférence en ce  
30 qu'il s'agit de colza.

M3 ..... 80  
M3.21 TCTTGCCTAIG ATTTTCTTCA TAAGATGTGT ..... GTCACAGCAA CAGAACTAGA GTCATCAACT AACCAAGAGC  
  
M3 ..... 160  
M3.21 TCTTTCCTATC GCGGCACATG CCTCGCTTTC ACCCCAAGCC ACATTGGCCG TTCTGTGGCT CCGGAAAAGC CTTCCCTGCA  
  
M3 ..... 240  
M3.21 GGCCACTTCC GACCAACTCC GTTCCATCTG CCACAGGAAG TCACCAGATG CTTGTCCGAC AAGAAGGAGG TAGGTACATG  
  
M3 ..... 320  
M3.21 TTTTGATGAT ATCGTTGAGA CTTTCTTTCAC CAGGAAAGCC GTTATTGGAT CGGAATGTTG CGCCCGGATC AAGAAGATGA  
  
M3 ..... 400  
M3.21 ACAAGATIG TGAGAAGACC GTCTTTGGAT CTTTCCATGA CCCCTTCTMG ACCGGCTATG TCAAGCTACA TTGCTCCACC  
  
M3 ..... 480  
M3.21 GTTGTGGAT CTACTTCACC TCCTCCTTCA CAGGCTCCTT TACATGCTCC TTCTTCACAG GCTCCTTCAC ATGCTCCTC  
  
M3 ..... 560  
M3.21 ACATGCTCCT TCACAGGCTC CTTTAAATGC TCTTAAAT GCTCCTTTAC ATGCTCCTTT ACATGCTCCT TCACAGGCCC  
  
M3 ..... 640  
M3.21 CTTACAGGC CCCTTCACAG GCCCTTTTAC ATGCTCCTTT ACTGCCCCCT TCGCAGGCTC CTTACCCGGC TCAGTGA-TT  
  
M3 ..... 720  
M3.21 TAGCTATTG ATAGAATTAC TCAAGTAATG ATGCCCTAGG GAGTTGAGT TTTCTCGTG TTTTAAAGTT TTGTGTTTAT  
  
M3 ..... 800  
M3.21 TTTGAGAAA CCGTCTTGG ATTTAACTT CACTTTGATT TTTCCCTTA TACAATTTAA ATTTAGAGTT TACTTATTA  
  
M3 ..... 841  
M3.21 TTTGAGAAA CCGTCTTGG ATCTTAACTT CACTTTGATT TTTT-CCTTA TACAA.....

FIGURE 1

## FIGURE 2

1 GGATCCCACA AAGAAAACCG AAGAAGCAAA TGTTTCCTAC CTTCATAAAT  
51 ATATATTTGT TTCAGCCTCA TCAATGTACA AACAATCCTT TAGCTCAATG  
101 GTATAAATGT TGTTGTTTAG ATTTCAATAA CCCGGGTTTCG AGTCATAGAC  
151 TTGACACTTT TTCACACTTT TTAAAAGTGG AACGCACATA TCGCTGACGT  
201 GTCGCATCAG GAGTGATGCA ACTGCTCTAT TATAATGTAG ATTTAAAAGT  
251 GGAACCCACG TATCGCTGAC GTGTCGCATC AGGAGTGATG CAACTGCCAT  
301 ATTATAACGT AGATTTGACG TTATTCCTTT TTAAATCTTA ATAATAATAC  
351 CAGNGCTTTT ACTTATTAAT TTTGNGCATN GTTATCATGG TTTATGCNCT  
401 CTTTTTTTTT GANCCGTTGA TTGGTTTATG CTTATTTGAA TGTNGCCNAC  
451 GTAAGAAATG AAGAACAATT TATATTTGGA GAAAATATAA TTTAATATGT  
501 TCAATATATA GAGAAAATAT TATNCCTTGA TGTTACTGTA TGGATGCGAG  
551 TAGAAGATCT TTGAATAATA TTTGAGAACT TGCCTTTTCT CAAAAAGTAA  
601 AATATTTGAT ATGTAACTTA AGTTAACACA TGAAAATTAA AAAAAATTA  
651 AATCAAATA GAAAAAAGT ATAGTGATCT ACCCTTCAAC GTTTTGAAGT  
701 TATTCTTGGT TCACCCCTA AACCTCTAAG TTCACCAAAC AATAAAATTT  
751 CATTATTGCA TATTCTATAT CTTTLAGAAA GTGAAACAAA ATATTATCAA  
801 GTTATATTAT GTTTTTCAAA TAAAAAGATA AAAAATAAAT AAAAAATAAT  
851 AGTAGTTACA AAAAAAAAAA ATTAATATTT TTACCAGCGT CANAAAACAC  
901 TAAAACCTAA ACCCTAAATA TTAAACTTTT AGGTAAACCC TAAACCTTTG  
951 GATAAATCTT AAACATTAAG CATTAAAACA CTAAACCCTA AATCCTAAC  
1001 TCTAAACCCT TAAGTGTTTA AATGTTTAGT GTTTTTGATT TATAGTTTAG  
1051 GATTTATCCA AAGGTTTAAG GTTTACCCAA GAGTTTATGG TTTAGGGATT  
1101 ATGACTTAGG ATTTAGTGTT TTAGTGACGA CGTTCAAAGT ATTTTTTAAA  
1151 AAATATTTT TTTGTAACAA CTACTATTTT TATTTATTTT TTTACCTTTT  
1201 TATATTAATA ACATAATATA ATTTAATACT CCATCTGTTT CATATTAAGT  
1251 GTCATTGTAA CATTATTTT TTGTTACAAA AAAATTGTCA CTTTAGAATT

3/10

## FIGURE 2 (suite)

1301 CCAATGCAA AATTATTTAT TTTTCAGCTA AAATTAATTG CAAAGTGCAT  
 1351 TGATCTTATA AATAATTTTA TTTATCTCAA ATGCTATATT GGTCAAACAT  
 1401 GTGTAATTAA TAGAACTTA ATTATATTTT AATTATTTTT TCTTAATCTG  
 1451 TGTA AAAATG TCAAAGTAAA AATTATTTAG AAACGAATTG AGTAATATTT  
 1501 TGTTTCATTT TTTAAAAGAT ATCGAATATG AAATAACACA ATTTTATTGT  
 1551 ATGATGAACC TAAA AATTCA TCCTAAGAAG GTGAACGCAA GAATAAGTCA  
 1601 ACGTTTTGGG GAAAGCTAAC TATGGCCCAA AGTCATCAA ATCTTTCTTG  
 1651 TATTTATCAA AATCCTTACA AATTTAGTTA GAGTTAATAG ACCAAACACA  
 1701 TGATTATCAT CATATTAGAA TATTCTAAA AATTACTAGC GAATAATTAA  
 1751 AATCTTTCTT TTATTTATCA AAATCCTTAT AAAA ACTTAT TTATATATAC  
 1801 TAAAACAATT TTAATTA AAA GAAAATAAGG GACCATGGAT ACATAAAAAT  
 1851 ATATGTTATT TCTTAAGATA GTGATAATAT TAATATATAC CAGTCCATAT  
 1901 ATTTATCAA ATAAATAATA TTTTTCGTAG TCCGATAATC ATTACTATAA  
 1951 ATTCATAAAA CCACATGTAG ATGTATATTT TATTTATATA TATATATATA  
 2001 AACCCTAACG CCTTACCACT CGATAACCAT CAAA ACTTTT CTTCTCGTTT  
 2051 CGCTAACTCA AGGCTTCGAA AAGTAAAAA AACAATGAAG AATGTCACAC  
 2101 TTGTTCTTGC TATGATCCTC TTCTTAAGCT GTGTCACATC CAAAGTTACA  
 2151 GCAACAGAAC TAGAGTCATC AACTAACCAA GAGCTCTTCC TATCGCGGCA  
 2201 CTTACCTCGC TTTCACCCCA AGCAACATTG GCCGTTCCGT GGCTCCGGAA  
 2251 AAGCCTTCCC TGCAGGCCAC TTCCGACTAA CTCCGTTCCA TCTGCCACAG  
 2301 GAAGTCACCA GATGCTTGAA CGACAAGAAG GAGGTAGGTA CATGTTTTAA  
 2351 TGATATCGCT GAGACTTTCT TCACCAGGAA AGCCGCTATT GGATCGGAAT  
 2401 GTTGCGCCGC GATCAAGAAG ATGAACAAAG ATTGTGAGAA GACCGTCTTT  
       M3 TTT  
 2451 GGATCTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC  
       M3 GGATCTTCC ATGACCCCTT CTTGACCGGC TATGTCAAGC TACATTGCTC  
 2501 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTTACATG  
       M3 CACCGTTGTT GGATCTACTT CACCTCCTCC TTCACAGGCT CCTTTACATG

2551 CTCCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC CTTACATGC TCCTTCACAG  
 M3 CTCCTTCTTC ACAGGCTCCT TCACATGCTC CTTACATGC TCCTTCACAG  
 2601 GCTCCTTTAA ATGCTCCTTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC  
 M3 GCTCCTTTAA ATGCTCCTTT AAATGCTCCT TTACATGCTC CTTTACATGC  
 2651 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCTTC ACAGGCCCTT TTACATGCTC  
 M3 TCCTTCACAG GCCCCTTCAC AGGCCCTTC ACAGGCCCTT TTACATGCTC  
 2701 CTTTACTGCC CCCTTCGCAG GTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT  
 M3 CTTTACTGCC CCCTTCGCAG GTCCTTCAC CGGCTCAGTG ATTTAGCTAT  
 2751 TTGATAGAAT TATTCAAGTA TTGATGTCCT AGGGAGTTTT AGTTTTTTTC  
 M3 TTGATAGAAT TACTCAAGTA ATGATGCCCT AGGGAGTTTG AGTTTTTCTC  
 2801 TTGTTTTAAA ATTTTGTGTT TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTTAA  
 M3 GTGTTTTAAA GTTTTGTGTT TATTTTGAGA AAACCGTCTT TGGATTTTAA  
 2851 CTT  
 M3 CTT

FIGURE 2 (suite)

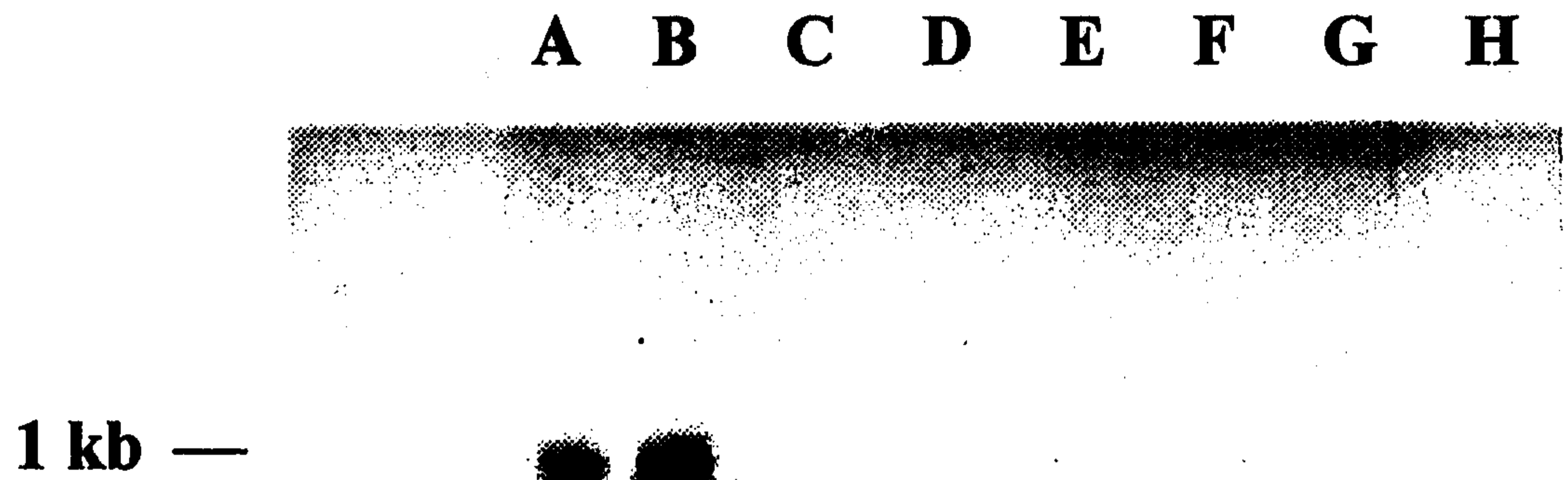


FIGURE 3

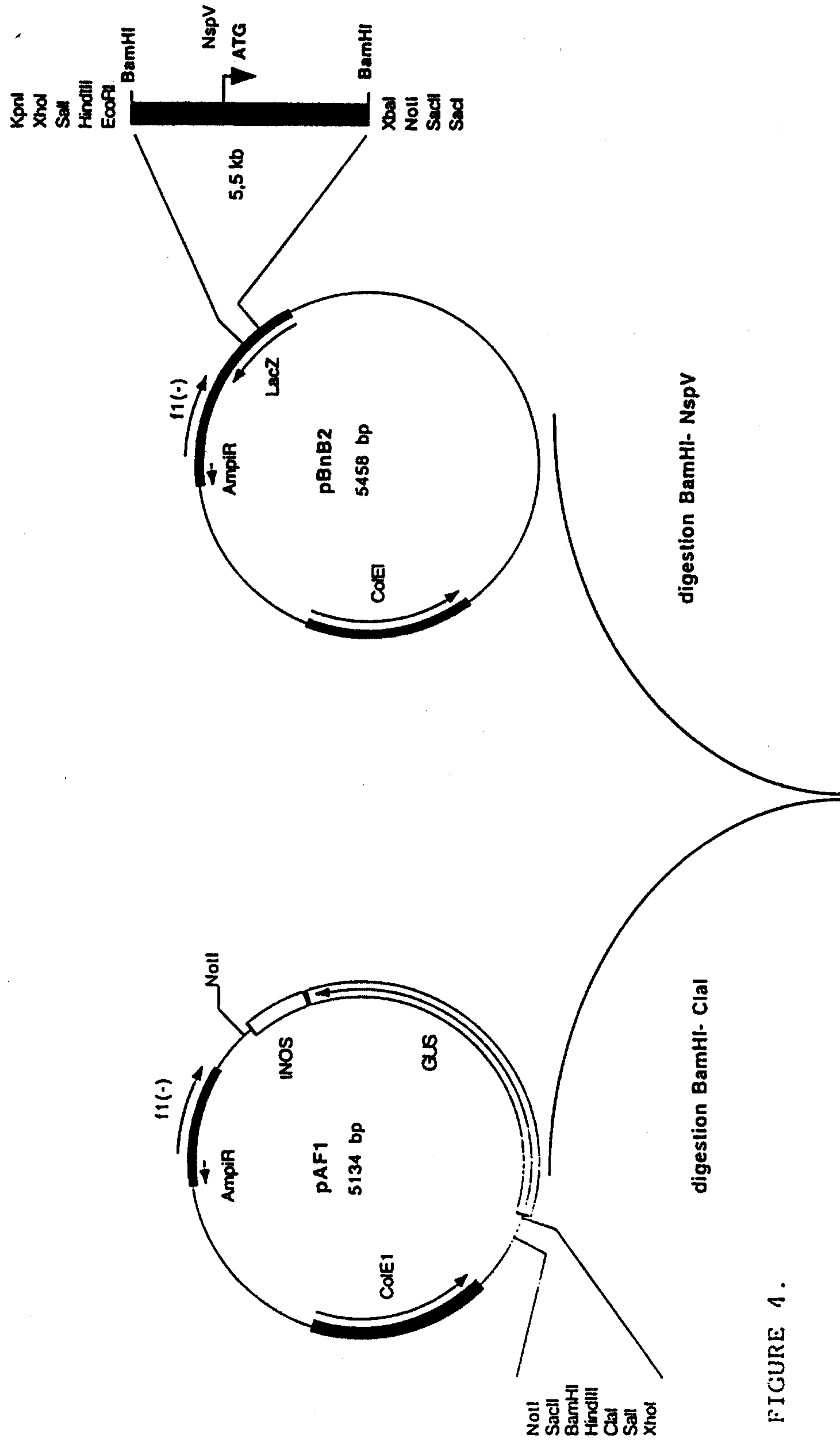


FIGURE 4.

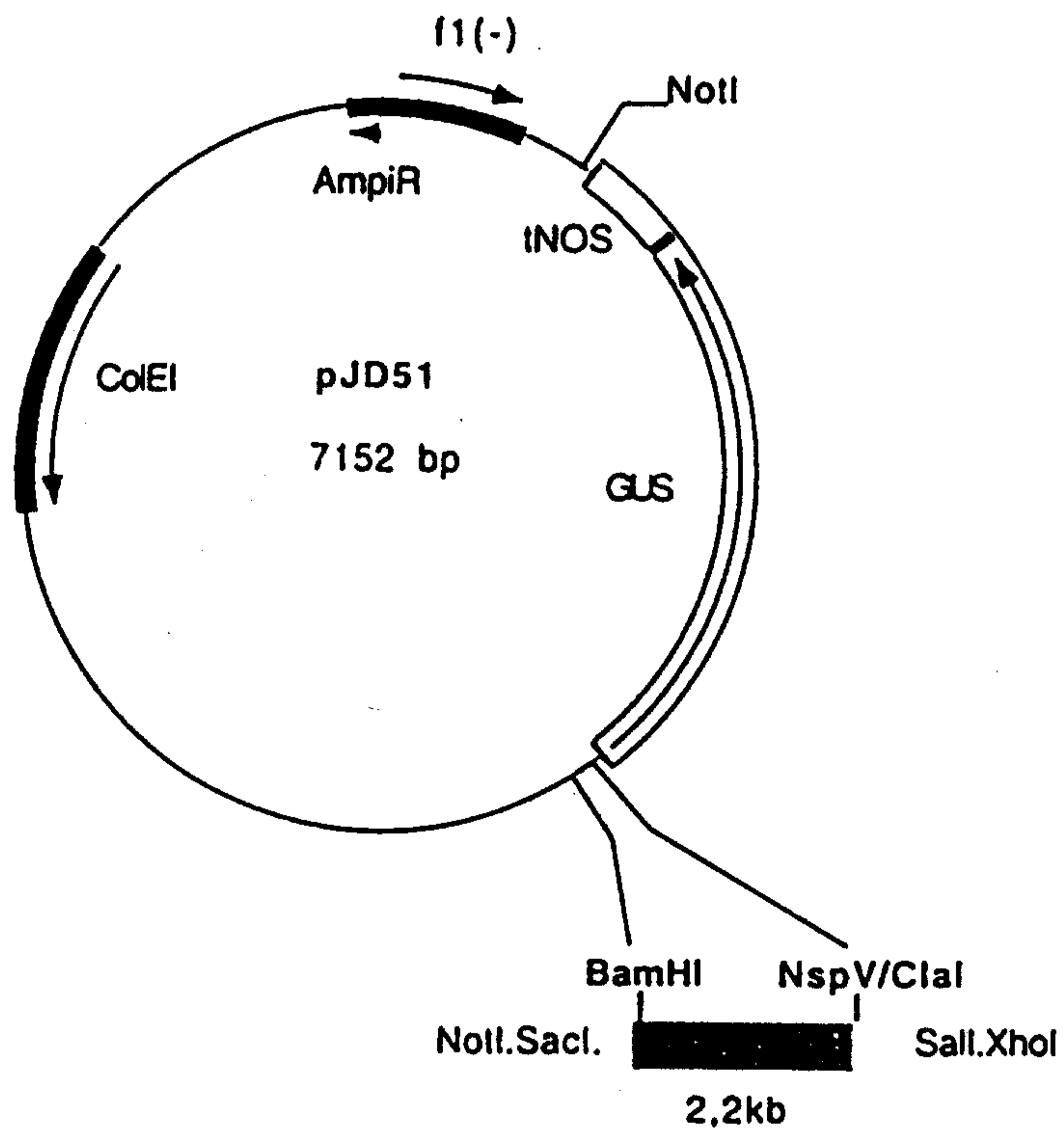


FIGURE 4 (suite)

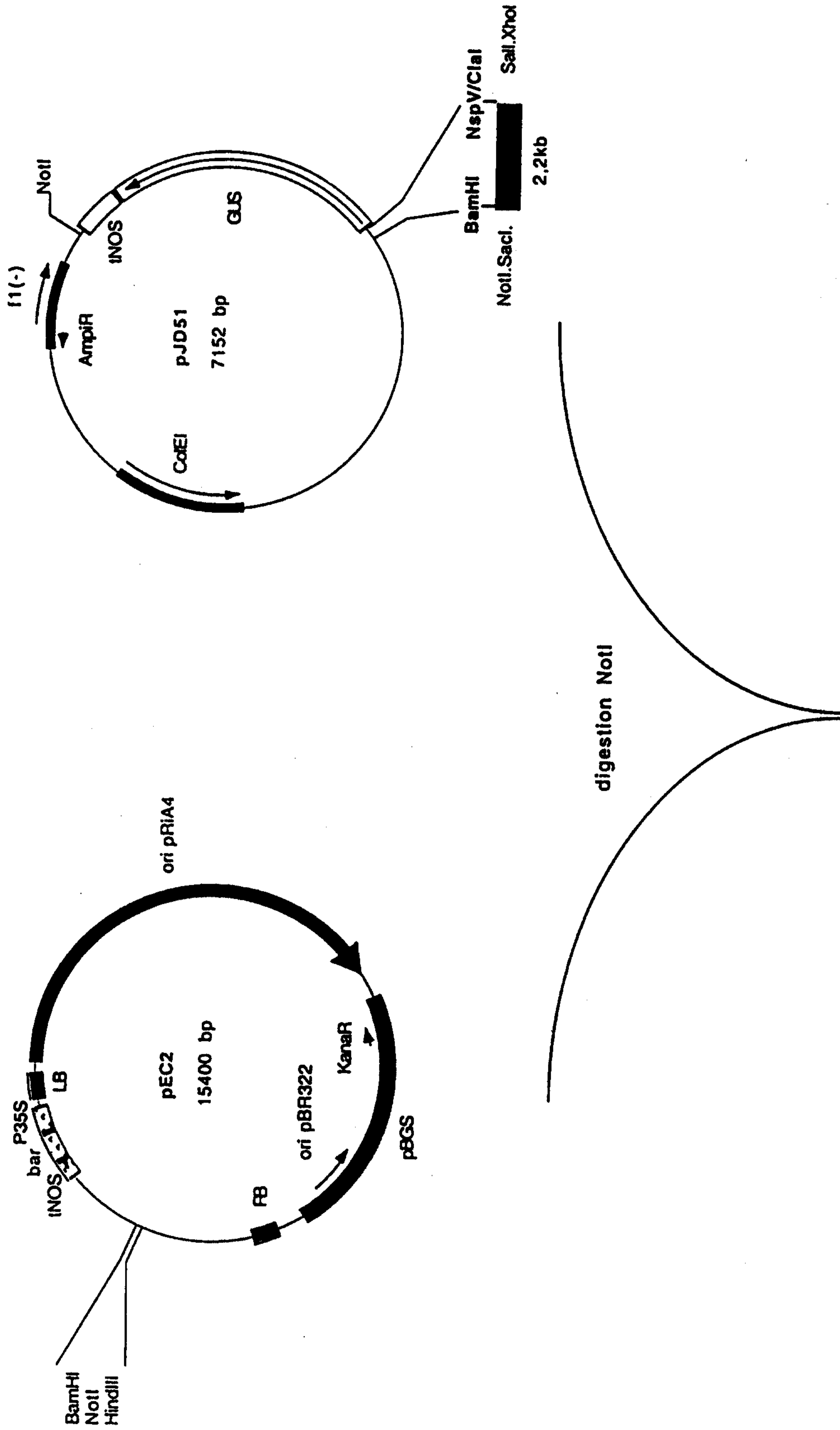


FIGURE 5.

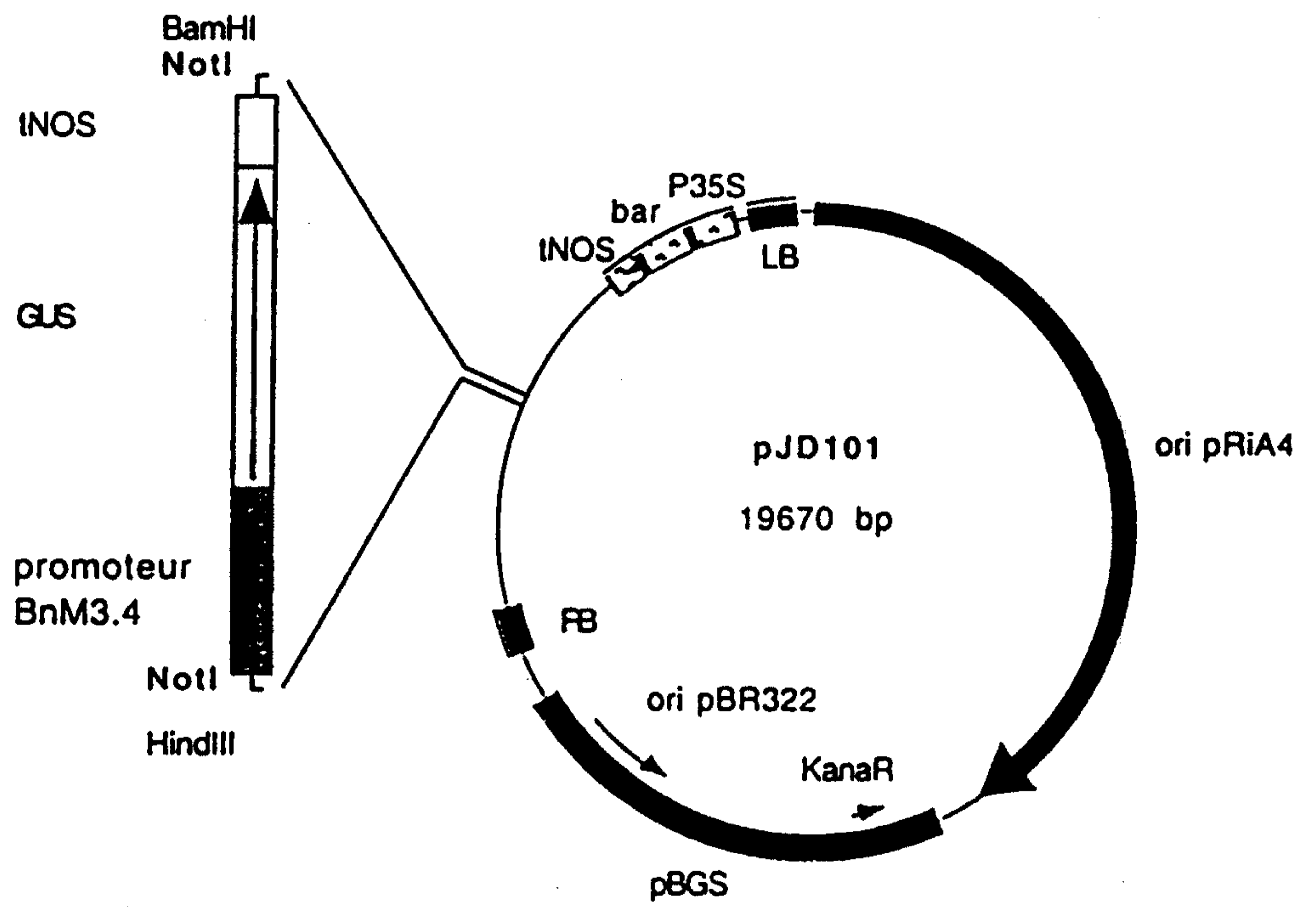


FIGURE 5 (suite)

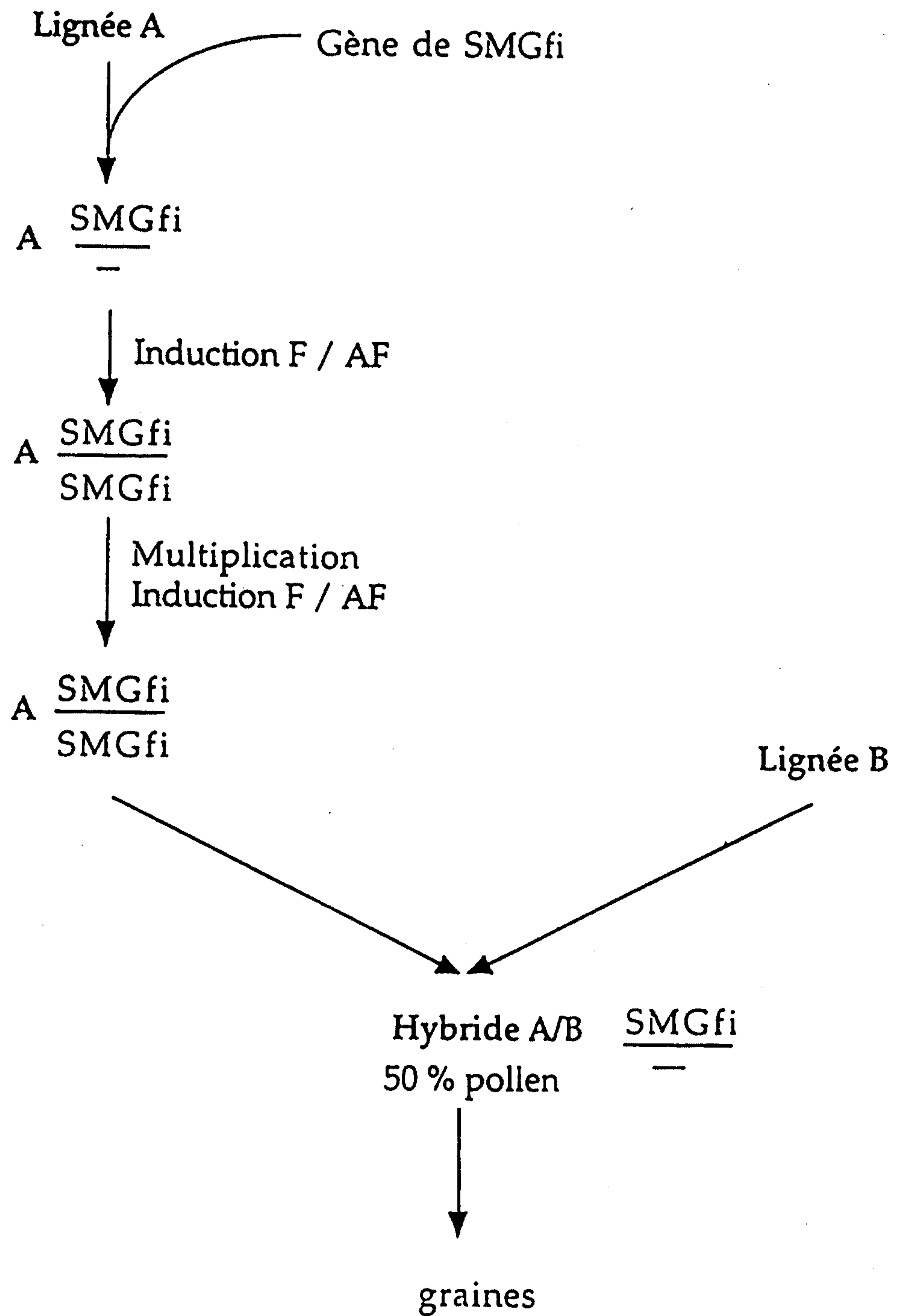


FIGURE 6