

(19)



(10)

LT 4667 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patento numeris: **4667**

(51) Int. Cl.⁷ **C12N 15/82**

C12N 15/29

(21) Paraiškos numeris: **99-137**

(22) Paraiškos padavimo data: **1999 11 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2000 04 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1999 11 25**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CA98/00522**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1998 05 26**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1999 11 25**

(31, 32, 33) Prioritetas: **047795, 1997 05 30, US**

(72) Išradėjas:

Gregory G. Brown, CA

(73) Patento savininkas:

**McGILL UNIVERSITY,
845 Sherbrooke Street West, Montreal, Quebec H3A 1B1, CA**

(74) Patentinis patikėtinis:

Leonas Antanas Kučinskas, 4, Kaštonų g. 5-7, 2001 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

**Natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimo ir
vyriškojo vaisingumo atstatymo metodas bei jo naudojimas hibridinių
kultūrų gamybai**

(57) Referatas:

Šis išradimas susijęs su natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimo ir vyriškojo vaisingumo atstatymo metodu bei jo naudojimu hibridinių kultūrų gamybai. Čia taip pat atskleidžiamas citoplazmiškai vyriškai sterilių augalų vyriškojo vaisingumo atstatymo metodas, kuris apima tokius žingsnius: (a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su normalaus mitochondrinio geno, kuris yra kotranskribuotas su neįprastu su CMS susijusiu mitochondrinio genu, redaguota forma prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimo į augalo ląstelės branduolį; (b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimo; ir c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimo subrendusiam augalui gauti.

IŠRADIMO PAGRINDAS

(a) Išradimo sritis

Šis išradimas susijęs su natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimo ir vyriškojo vaisingumo atstatymo metodu bei jo naudojimu hibridinių kultūrų gamybai.

(b) Technikos lygis

Daugelis hibridinių kultūrų, suformuotų kryžminant dvi ar daugiau skirtingų kultūrų, duoda didesnius derlius, negu pačios pirminės kultūros. Pavyzdžiui, kalbant apie rapsą (*Brassica napus, campestris*), svarbiausią Kanados kultūrą, dirbtinai sukurti hibridai duoda derlius, kurie gali būti iki 50% didesni už pirminių kultūrų derlius. Šis fenomenas, vadinamas hibridų energija, sėkmingiausiai buvo pritaikytas kukurūzams (*Zea Mays*). Hibridiniai kukurūzai sudaro apie 90% Šiaurės Amerikos žemės ūkio kultūrų.

Hibridinėms sėkloms komercine apimtimi gaminti, reikalinga neleisti hibrido pirminės kultūros sėkloms apsidulkinti pačioms. Tai santykinai paprasta kukurūzams, nes vyriškieji arba žiedadulkes gaminantys organai yra kitoje augalo vietoje (kuokeliai), nei moteriškieji arba sėklas mezgantys organai (vaislapėliai), ir kuokeliai, kurie visi kartu sudaro struktūrą, vadinamą "kutu", gali būti lengvai pašalinti ranka nuo didelio kiekio augalų, naudojamų sėklų gamybos operacijoje. Ir priešingai, daugelyje kultūrų rūšių, kaip rapsas, kuokeliai ir vaislapėliai yra toje pačioje žiedo struktūroje, ir rankinis didelio augalų kiekio "kastravimas" yra neįmanomas. Taigi, sėklų gamintojams reikalingi alternatyvūs apdulkinimo valdymo metodai šių kultūrų hibridams gauti. Šiam tikslui sukurtos technologijos apžvalgą galima rasti The PBI Bulletin atspausdintame Arnison P. straipsnyje (Arnison P. et al., The PBI Bulletin, 1997m. sausis, 1-11).

Vienas alternatyvus metodas yra naudoti chemikalus, taip vadinamus gametocidus, kurie specifiskai užmuša žiedadulkes. Apskritai, šie chemikalai yra brangūs ir tik dalinai efektyvūs. Daugeliui kultūrų, ypač tokioms, kaip rapsas, kurios žydi ilgą laiką, šis apdulkinimo valdymo metodas nėra ekonomiškai efektyvus. Todėl beveik visos hibridų sėklų gamybos sistemos remiasi genetiniu apdulkinimo valdymu. Genetinio apdulkinimo valdymo mechanizmus galima suskirstyti į tris kategorijas: vidinis nesuderinamumas, "molekulinės hibridizacijos" metodai, ir citoplazminis vyriškasis sterilumas.

Vidinis nesuderinamumas (SI) atsiranda dėl kai kurių augalų sugebėjimo atmesti savo nuosavas žiedadulkes. SI pasižymintys augalai gali būti naudojami kaip moteriškoji linija hibridų auginime, tačiau, kadangi šie augalai paprastai atmeta savo žiedadulkes, būna sunku ir ekonomiškai neefektyvu dauginti ar palaikyti tokias linijas. Be to, vidinis nesuderinamumas neaptinkamas daugumoje augalų rūšių. Molekulinės hibridizacijos metodai yra neseniai sukurti. Jie remiasi genetiškai sukurtu vyriškuoju sterilumu, kurį sukelia specifinė nuodingų proteinų ekspresija žiedadulkes gaminančiose ląstelėse. Tokie įvesti toksinų genai veikia kaip dominuojantys vyriškojo sterilumo genai ir gali būti naudojami hibridinių sėklų gamybos moteriškosioms linijoms kurti. Kaip ir su SI, tokių moteriškųjų linijų dauginimas nėra tiesioginis, ir jo metu prarandama augalo medžiaga. Šie šių metodų naudingumai yra vis dar neaiškūs, ir šiuo metu šie metodai naudojami tik kelių hibridinių rūšių gamybai, ir jos nėra plačiai auginamos.

Citoplazminis vyriškasis sterilumas (CMS) yra plačiai paplitęs ir klasikinis ne Mendelio požymis. CMS augalai nesugeba patys apsidulkinti, ir todėl, kai CMS linija yra pasodinama greta vyriškai vaisingos linijos, visos sėklos, kurios susiformuoja ant sterilių augalų, bus dviejų linijų hibridas. Skirtingai nuo daugelio požymių, CMS yra perduodamas per moteriškąją liniją, t.y., jis yra perduodamas palikuoniui tik per sėklos motininį augalą. Ši savybė yra dėl fakto, kad CMS apsprendžiantis genas ar genai yra mitochondrijos DNR (mtDNR); skirtingai nuo daugumos genų, kurie yra branduolio DNR, mtDNR esantys genai yra perduodami tik per moteriškąją liniją daugelyje augalų rūšių. Šios perdavimo per moteriškąją liniją savybės rezultate galima

lengvai dauginti moteriškas CMS linijas, apdulkinant vyriškai vaisinga “palaikytojo” linija, kuri savo branduolio genais yra identiška CMS linijai, bet kuri yra vyriškai vaisinga dėl CMS sukeliančios mtDNR nebuvimo. Tačiau, vėlgį kaip CMS perdavimo per moteriškąją liniją savybės rezultatas, moteriškas CMS linijas naudojant išauginti hibridiniai augalai bus taip pat vyriškai sterilūs, nes jie turės vyrišką sterilumą suteikiančią mtDNR. Tai yra problematiška sėklinėms kultūroms, kaip kukurūzai ir rapsas, kuriems reikalingos žiedadulkės, kad susiformuotų sėklos - derlių sudarantis produktas. Laimei, daugelyje augalų rūšių buvo rasti specifiniai dominuojantys branduolio genai, taip vadinami “vaisingumo atstatytojai” (*Rf*), kurie gali nuslopinti vyriškai sterilų fenotipą ir “atstatyti” hibridų F1 vaisingumą. Taigi, CMS sistemos komponentai susideda iš CMS linijos, kuri turi vyriškai sterilią (S) citoplazmą (ar mtDNR) ir yra homozigotinė atstatytojo geno recesinei ar palaikančiai alelei, palaikytojo linijos, kuri turi vaisingą ar normalią mtDNR (F), tačiau yra izogeniška CMS linijai branduolio genetiniuose lokusuose, ir atstatytojo linijos, kuri paprastai turi vyriškai sterilią mtDNR, tačiau yra homozigotinė dominuojančiam branduolio *Rf* genui. Šių komponentų naudojimas hibridinių sėklų gamybos schemoje pavaizduotas Fig. 1.

Įvairiems hibridams gauti, naudojant CMS, reikia turėti tinkamą kiekį atstatytojų linijų, kurios turi *Rf* genus, ir “palaikytojų” linijų, kurios yra sterilizuotos su CMS mtDNR. Šių linijų kūrimas įprastos genetikos metodais yra lėtas procesas, kuris reikalauja bent kelerių metų triūso. Pavyzdžiui, naujai atstatytojo linijai sukurti, pirmiausiai reikalinga sukryžminti gavėjo liniją su esama atstatytojo linija *Rf* alelei įvesti. Tada reikalinga serija atbulinių kryžminių gavėjo linijos genotipui ištraukti. Netgi po daugelio atbulinių kryžminių liks šiek tiek su *Rf* genu surištos donorinės DNR - fenomenas, kuris vadinamas “surišimo vilkimu”; ši donorinė DNR gali nešti kenksmingas savybes ir mažinti priimančios kultūros kokybę.

Kaip išaiškėjo, dvi CMS sistemos yra kiek riboto naudojimo hibridinio rapso sėklų gamyboje. Polima, arba *pol* citoplazma sugeba suteikti vyriškąjį sterilumą daugeliui rapso atmainų, ir buvo rastos efektyvios atstatytojo linijos, turinčios dominuojančias aleles pavienio branduolinio atstatytojo lokuse. Hibridų gamybos,

naudojant šią sistemą ekonominis efektyvumas yra ribotas tuo faktu, kad *pol* sukeltas vyriškasis sterilumas linkęs būti nepilnas, arba “kiauras”, ypač kai moteriškoji linija yra šiltesnėse augimo sąlygose. To rezultate *pol* hibrido sėkla gali būti užteršta CMS sėklomis, kas gaunasi dėl moteriškosios linijos vidinio apsidulkinimo. Kadangi tie CMS augalai yra vyriškai sterilūs ir spontaniškai nemezga sėklų, jų buvimas gali žymiai sumažinti bendrą “hibrido” mišinio derlių. Antroji CMS sistema remiasi hibridinės citoplazmos naudojimu, kurioje vyriškojo sterilumo determinantė yra išvesta iš ridikėlio citoplazmos, vadinamos Ogura, arba *ogu*. Ogu citoplazmos sukeltas vyriškasis sterilumas yra pilnas. Neseniai tapo galimos gauti atstatytojo linijos šiai sistemai, kurios buvo sukurtos, įterpiant pavienį ridikėlio atstatytojo geną (kurį čia mes žymime kaip *Rfo*) į *Brassica napus*, tačiau atstatytojo linijų kūrimui trukdo “ryšio vilkimas” tarp atstatytojo geno ir genų, kurie turi neigiamą įtaką sėklų kokybei. Labai pageidautina būtų gauti metodus natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimui ir vyriškojo vaisingumo atstatymui bei jų naudojimui hibridinių kultūrų gamybai.

IŠRADIMO SANTRAUKA

Vienu šio išradimo tikslų yra pateikti natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimo ir vyriškojo vaisingumo atstatymo metodus bei jų naudojimo hibridinių kultūrų gamybai metodus.

Pagal šį išradimą, čia pateikiamas natūraliai atsirandančio citoplazminio vyriškojo sterilumo augaluose padidinimo metodas, kuris apima tokius žingsnius:

a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su bent viena iš *Brassica napus* mitochondrijų atp6 geno ir orf224 geno neredaguotų formų prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į augalo ląstelės branduolį;

b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir

c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

Pagal šį išradimą, čia taip pat pateikiamas citoplazmiškai vyriškai sterilių augalų vyriškojo vaisingumo atstatymo metodas, kuris apima tokius žingsnius:

a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su normalaus mitochondrinio geno, kuris yra kotranskribuotas su neįprastu su CMS susijusiu mitochondrinio genu, redaguota forma prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į augalo ląstelės branduolį;

b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir

c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

Pageidautinas augalas yra *Brassica napus*.

Pageidautina, kad b) žingsnis būtų atliekamas naudojant augalo transformavimo vektorių, kaip pRD400.

Pagal šį išradimą, čia taip pat pateikiamas polima citoplazmiškai vyriškai sterilių *B. napus* vyriškojo vaisingumo atstatymo metodas, kuris apima tokius žingsnius:

a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su *B. napus* mitochondrijų *atp6* geno redaguota forma prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į *B. napus* augalo ląstelės branduolį;

b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir

c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

Mūsų rezultatai turi reikšmę *pol* CMS praktinio naudojimo hibridinių rapso ir kitų *Brassica* kultūrų gamyboje požiūriu. Genetinių konstrukcijų, kurios leidžia nutaikyti *Brassica atp6* geno redaguotos formos produktą į mitochondrijas, įvedimas į *pol* CMS augalus atspindi naują tipą proceso, kuriuo gali būti regeneruoti augalai su atstatytu vyrišku vaisingumu; tai turėtų leisti gaminti naujas *pol* CMS atstatytojų linijas vienu žingsniu, per augalų transformaciją. Tai leistų sutaupyti daug laiko ir lėšų, lyginant su įprastais augalų auginimo metodais tokioms linijoms gauti, kas šiuo metu yra vienintelis būdas, kuriuo tokias linijas galima sukurti. Be to, konstrukcijų,

kurios leidžia nutaikyti *atp6* geno ar *orf224* geno neredaguotos formos produktą į mitochondrijas augalams su padidintu vyriškuoju sterilumu gauti, įvedimas yra procesas, kuriuo potencialiai gali būti gautos naujos *pol* CMS linijos su padidintu vyriškojo sterilumo palaikymu; kaip buvo minėta aukščiau, *pol* vyriškojo sterilumo “kiaurumas” yra pagrindinė kliūtis platesniam jo naudojimui hibridinio rapso gamyboje, ir nėra jokių efektyvių priemonių jam pašalinti. Taip pat įmanoma, kad šie procesai galėtų vaizduoti pavyzdžius bendresnės strategijos, kaip gaminti veisles, palaikančias ar atstatančias CMS kitose CMS sistemose, ir su kitomis augalų rūšimis.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Fig. 1 iliustruoja citoplazminio vyriškojo sterilumo (CMS) naudojimą hibridinių sėklų gamybai;

Fig. 2A-2J iliustruoja vaisingų, *pol* CMS ir transgeninio *B. napus* cv. Westar augalų žiedus;

Fig. 2A rodo pilnus *pol* CMS Westar (kairėje) ir su *mas2'/A9-A6e* konstrukcija transformuoto *pol* CMS Westar augalų žiedus (pastebėkite didesnę transgeninio augalo vainiklapių dydį);

Fig. 2B rodo pilnus dalinai vyriškai sterilaus transgeninio augalo, gauto įvedus AP3/A9-A6u į Westar (*nap*) (kairėje), ir vyriškai vaisingo Westar (*nap*) augalo žiedus (pastebėkite sumažintą transgeninio augalo žiedo lapelių pigmentaciją);

Fig. 2C rodo *pol* CMS Westar (kairėje) ir su *mas2'/A9-A6e* konstrukcija transformuoto *pol* CMS Westar augalų žiedus su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais; pastebėkite didesnę kuokelių dydį ir didesnes išaugusias dulkinės transgeniniame augale;

Fig. 2D rodo dalinai vyriškai sterilaus transgeninio augalo, gauto įvedus AP3/A9-A6u į Westar (*nap*) (kairėje), ir vyriškai vaisingo Westar (*nap*) augalo žiedus su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais (pastebėkite mažesnę dulkinės dydį transgeniniame augale);

Fig. 2E rodo pilnus (iš kairės į dešinę) *pol* CMS Westar, vyriškai sterilaus transgeninio augalo 40-8, gauto įvedus AP3/A9-ORF konstrukciją į vyriškai vaisingą Westar (*nap*), ir vyriškai vaisingo Westar (*nap*) žiedus;

Fig. 2F rodo transgeninio augalo 40-8 žiedą su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais; pastebėkite, kad keturi vidiniai kuokeliai yra transformuoti į vaislapėlius;

Fig. 2G rodo pilnus dalinai vyriškai sterilaus transgeninio augalo 40-10, gauto įvedus AP3/C4-ORF konstrukciją į vyriškai vaisingą Westar (*nap*)(kairėje); priimančios rūšies Westar (*nap*) žiedas parodytas dešinėje (pastebėkite mažesnę transgeninio augalo vainiklapių dydį);

Fig. 2H rodo transgeninio augalo 40-10 ir vyriškai vaisingo Westar (*nap*) žiedus su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais;

Fig. 2I rodo pilnus *pol* CMS Westar (kairėje) ir dalinai vaisingo transgeninio augalo, gauto įvedus AP3/A9-A6e konstrukciją į *pol* CMS Westar, žiedus (pastebėkite didesnę transgeninio augalo vainiklapių dydį);

Fig. 2J rodo *pol* CMS Westar (kairėje) ir dalinai vaisingo transgeninio augalo, gauto įvedus AP3/A9-A6e konstrukciją į *pol* CMS Westar, žiedus su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais (pastebėkite didesnę kuokelių ir dulkinių dydį transgeniniame žiede);

Fig. 3A-3D iliustruoja fenotipinius pokyčius, lydinčius *mas2'* sukeltą A9-A6e išraišką *pol* CMS Westar augaluose; A: transgeninio augalo žiedynas; B: *pol* CMS Westar augalo žiedynas; C: visas transgeninis augalas; D: *pol* CMS Westar augalas (pastebėkite didesnę transgeninio augalo žiedyno ir vegetatyvinių intermazgų dydį);

Fig. 4 iliustruoja AP3/A9-A6e konstrukcijos kaip dominuojančio vaisingumo atstatytojo geno naudojimą augale *B. napus*; ir

Fig. 5 iliustruoja AP3/C4-ORF konstrukcijos naudojimą augale *B. napus pol* citoplazminiam vyriškam sterilumui padidinti.

IŠSAMUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Šis išradimas pateikia metodą palaikytojo ir atstatytojo linijoms sukurti genų inžinerijos būdu. Išradimas specifiškai susijęs su rapso (*Brassica napus*, *campestris*) *pol*. CMS sistema. Tačiau, iš principo, metodas galėtų būti naudojamas tokių linijų žiedadulkių gamybos našumo modifikavimui ir kitose rapso CMS sistemose bei didelio kiekio kitų kultūrų CMS sistemose.

Šis išradimas remiasi rapso (*Brassica napus* L.) citoplazminio vyriškojo sterilumo (CMS) molekulinio pagrindo tyrimais, kurie buvo atlikti mano laboratorijoje tarp 1987 ir 1993 metų. *Brassica* mitochondrinio genomo organizacijos ir išraiškos analizė parodė, kad *B. napus* CMS polima arba *pol* forma koreliuoja su išraiška mitochondrinio geno regiono, kuriame yra chimerinis genas *orf224*, kotranskribuotas su normaliu mitochondrinio genu *atp6* (Singh, M.P. ir Brown, G.G. (1991). *The Plant Cell* 3, 1349-1362; Bonen, L. ir Brown, G.G. (1993). *Can. J. Bot.* 71,645-660). Mes iškėlėme hipotezę, kad *pol* CMS yra dėl mitochondrinės disfunkcijos, kuri atsiranda (i) dėl ORF224 proteino buvimo mitochondrinėje membranoje, ar (ii) dėl galimo ATP6 proteino deficito, kurį gali sukelti *orf224* trukdymas *atp6* transliacijoje.

Mitochondrijos proteinai turi dvigubą genetinę kilmę: kai kurie šių proteinų, gal 10% ar panašiai, įskaitant tuos, kurie apibrėžia CMS, yra koduoti mtDNR rūgštimi; kiti yra koduoti branduolio DNR. Proteinai, kurie yra koduoti mtDNR, yra sintetinami ant mitochondrinių ribosomų ir lieka mitochondrijoje. Mitochondriniai proteinai, kurie yra koduoti branduolyje, yra sintetinami kaip prekursoriai, kurie paprastai turi papildomą aminorūgščių atkarpą prie N-galo, vadinamą perėjimo peptidu, arba pre-seka. Šis perėjimo peptidas padeda nukreipti proteiną į mitochondriją; jį pašalina proteazė, kai tik proteinas atsiduria mitochondrijos viduje. Jei proteino, kuris paprastai koduojamas mtDNR, DNR seka yra prijungama prie mitochondrinio perėjimo peptido DNR sekos ir gauta konstrukcija yra įvedama į branduolį ir ten ekspresuojama, gautas prekursoriaus proteinas gali būti importuotas į mitochondriją, ir galutinis produktas gali funkcionuoti taip pat, kaip ir mitochondriškai pagaminta forma.

Mes samprotavome, kad jei hipotezė (i) yra teisinga, tada mes galėtumėme sukelti vyriškąjį sterilumą vyriškai vaisinguose augaluose, ekspresuodami DNR konstrukcijas, kurios leistų branduolyje koduotą, citoplazmiškai transliuotą ORF224 proteiną nutaikyti į mitochondrijas. Panašiai, mes samprotavome, kad jei hipotezė (ii) yra teisinga, tada mes galėtumėme atstatyti *pol* CMS augalų vyriškąjį vaisingumą, ekspresuodami DNR konstrukcijas, kurios leistų branduolyje koduotą, citoplazmiškai transliuotą ATP6 proteino formą nutaikyti į mitochondrijas. Jei konstrukcijos pakeistų vyriškąjį sterilumą/vaisingumą, tada *orf224* transgenai galėtų būti laikomi sintetiniais vyriškojo sterilumo palaikytojais, o *atp6* transgenai galėtų būti laikomi sintetiniais vyriškojo vaisingumo atstatytojais. Tolesnė šių hipotezių komplikacija atsirado iš stebėjimų, jog abu - *orf224* ir *atp6* transkriptai yra panašūs į daugelį augalų mitochondrinių redaguotų transkriptų (Stahl R. ir kiti (1994) *Nucleic Acids Res* 22, 2109-2113). Augalų mitochondrinių transkriptų redagavimas apima specifinių C liekanų mRNR molekulėje konvertavimą į U liekanas, kurios pakeičia koduojamo proteino aminorūgščių seką (redaguoti mRNR koduoja proteino funkcinę formą). Abu - *atp6* ir *orf224* transkriptai yra redaguoti vienoje vietoje, ir tai duoda kiekvienu atveju vieną aminorūgščių sekos pakeitimą. Kadangi DNR konstrukcijos, kuri leido nutaikyti neredaguotą kviečių ATP9 proteiną į mitochondrijas, ekspresija branduolyje suteikė vyriškąjį sterilumą transgeniniams tabako augalams (Hernould, M. ir kiti (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 2370-2374), atrodo įmanoma, kad neredaguoto *Brassica* ATP6 proteino ekspresija/nutaikymas galėtų taipogi sukelti vyriškąjį sterilumą ir veikti kaip sintetinis palaikytojo genas.

Iš principo, šio tipo sintetiniai atstatytojai galėtų būti naudojami naujoms atstatytojų linijoms kurti genetinės transformacijos būdu. Tai leistų apeiti ilgai trunkantį ir brangų augalų auginimo procesą, kuriuo šios linijos kuriamos dabar. Sintetinių palaikytojo genų gaunamumas leistų augalų transformavimo būdu generuoti linijas, kurios galėtų pilnai palaikyti *pol* sterilumą. Tokios linijos šiandien neegzistuoja, ir todėl ši technologija galėtų efektyviai pašalinti galutinį barjerą į rapso hibridų *pol* pagrindu derliaus padidinimą. Galų gale, yra įmanoma, ir netgi panašu, jog taip yra, kad panašios strategijos galėtų būti naudojamos generuoti sintetines

atstatytojų ir palaikytojų linijas kitoms nei rapsas kultūroms, ir iš čia, kad galėtų būti sudaryta globalinė genetiškai sukurtų CMS palaikymo ir atstatymo strategija.

Irodymai, jog branduolyje koduotos ir į mitochondrijas nutaikytos ATP6 ir ORF224 proteinų formos gali veikti kaip, atitinkamai, sintetiniai atstatytojo ir palaikytojo genai

Šioms galimybėms pradėti nagrinėti, mes suliejome DNR, atitinkančią redaguotą (A6e) ir neredaguotą (A6u) *atp6* koduojančios sekos formas su DNR, kuri koduoja bet kurią iš dviejų mitochondrinių nutaikymo pre-sekų - mielių COX4 (C4) ar *Neurospora* ATP9 (A9). Panašios konstrukcijos buvo paruoštos, suliejant tas pačias pre-sekas su neredaguota *orf224* forma (ORFu). Tos sekos savo 5' galu buvo prijungtos prie *mas2'* promotoriaus (van der Leegt-Plegt, L.M. ir kiti (1992). Plant Cell Reports 11,20-24) ir savo 3' galu prie poliadenilinio signalo žiedinių kopūstų viruso 35S RNR rūgščiai. Gautos konstrukcijos buvo įvestos į *B. napus* sėklaskilties *Agrobacterium* medijuojamos transformacijos būdu (Moloney, M. ir kiti (1989). Plant Cell Rep. 8, 238-242). Mes nesugebėjome gauti augalų, į kuriuos buvo įvestos ORFu konstrukcijos. Tačiau trys iš transgeninių augalų, kuriuos gavome po A9/A6u konstrukcijos įvedimo į vaisingą *B. napus* cv Westar, buvo dalinai vyriškai sterilūs, tuo tarpu tik vienas augalas, kurį mes gavome po A9/A6e konstrukcijos įvedimo į sterilų *pol* CMS *B. napus*, buvo dalinai vyriškai vaisingas. Tai perša mintį, kad konstrukcija, ekspresuojanti neredaguotą *atp6* formą, veikė kaip sterilumą sukeliantis, arba palaikytojo genas, o redaguota forma veikė kaip *pol* vaisingumo atstatytojas. Deja, mes nesugebėjome gauti iš bet kurio tų augalų sėklų, kurios ekspresuotų bet kurią konstrukciją, todėl buvo neįmanoma parodyti, kad vaisingumo/sterilumo pokyčiai galėtų būti genetiškai perduodami sekančioms augalų kartoms, ar patvirtinti, kad šie fenotipai buvo gauti iš transgeninės ekspresijos.

Naujesniuose tyrimuose dėmesys buvo sutelktas konstrukcijų grupei, kuriose reguliuojamas promotorius, gautas iš *Arabidopsis thaliana* (baltažiedis vairėnis) *APETALA3* (AP3) geno (Jack, T. ir kiti (1994). Cell 76, 703-716), buvo naudojamas *atp6* ir *orf224* konstrukcijų ekspresijai paleisti. AP3 buvo parinktas kaip audiniams specifinis promotorius, nes jis yra ekspresuojamas labai anksti kuokelės (taip pat ir vainiklapio) vystymesi. Ankstesni duomenys parodė, kad su *pol* CMS susijęs kuokelių

vystymosi pristabdymas yra premeiozinis ir todėl pasireiškia anksti kuokelių vystymesi; todėl mes jautėme, kad *pol* CMS fenotipui pakeisti ar imituoti reiktų konstrukcijas ekspresuoti anksti kuokelių vystymesi. Tolesnės konstrukcijos, kurios jau sukurtos ar šiuo metu baigiamos suformuoti, apima ir vieną tokią, kurioje ekspresijai buvo naudojamas nuolat veikiantis *mas2* promotorius. Visos konstrukcijos buvo įterptos į binarį transformacijos vektorių pRD400, kuris buvo optimizuotas efektyviam transformavimui *Brassica* augaluose ir įvestas į augalus, naudojant sėklaskilčių transformavimo procedūrą. Mūsų suformuotų konstrukcijų suvestinė ir mūsų gautų transgeninių augalų fenotipai yra pateikti Lentelėje 1 toliau.

Lentelės 2 duomenys rodo dažnius, kuriais įvairios konstrukcijos sukėlė transgeniniuose augaluose vyriškojo sterilumo ir vaisingumo pokyčius. Kai kurie tų pokyčių, pastebėti transgeninių augalų vyriškojo vaisingumo/sterilumo ir žiedų struktūroje, yra parodyti Fig. 2.

Žiedai, parodyti Fig. 2A kairėje ir Fig. 2B dešinėje, yra atitinkamai nuo *pol* CMS Westar ir vaisingų Westar (*nap*) augalų. Iliustracijos po tomis (Fig. 2C ir Fig. 2D, atitinkamai) rodo tų pačių augalų žiedus su pašalintais vainiklapiais ir taurėlapiais. Kaip matyti iš tų iliustracijų, *pol* CMS augalų kuokeliai ir vainiklapiai yra žymiai mažesni nei Westar (*nap*) žiedų. Mūsų naudotose valdomose augimo sąlygose (20°, 16 val. diena, 15°, 8 val. naktis) kuokeliai, kurie susiformuoja jaunų *pol* CMS augalų žieduose, yra žymiai mažesni nei pusė piestelės, pilnai nesiformuoja dulkinių ir paskleidžia tik nedaug žiedadulkių.

Lentelė 1
Genetinės konstrukcijos ir atitinkami transgeninių augalų fenotipai

Konstrukcija ¹	Įvesta į	Kan ^R gauti augalai	Patvirtinti transgeniniai ²	Patvirtintų transgeninių augalų fenotipai
AP3/C4-ORF ³	vaisingas Westar (<i>nap</i>)	17	12	Kintamas vyriškas sterilumas nuo beveik visiškai sterilių (2 augalai) iki pilnai vaisingų (dauguma augalų); kai kurie augalai rodo žiedo organų kiekio, morfologijos ir identiteto pakitimus.
AP3/C4-ORF	- " -	21	7	Kintamas vyriškas sterilumas nuo beveik visiškai sterilių (1 augalas) iki pilnai vaisingų (dauguma augalų); kai kurie augalai rodo žiedo organų kiekio, morfologijos ir identiteto pakitimus.
AP3/A9-A6e	vyriškai sterilus Westar (<i>pol</i>)	9	7	Visi augalai dalinai vyriškai vaisingi; kuokelių ir vainiklapių dydis vidurinis tarp Westar (<i>nap</i>) ir Westar (<i>pol</i>) CMS augalų.
AP3/A9-A6u	vaisingas Westar (<i>nap</i>)	20	9	Dauguma augalų vyriškai vaisingi su keletu dalinai sterilių žiedų; kai kurie augalai turi mažiau kuokelių; blyškiai gelsvi vainiklapiai; žiedo rašto identiteto ir/ar organų kiekio pokyčiai.
<i>mas2</i> '/A9-A6e	vyriškai sterilus Westar (<i>pol</i>)	22	16	Dauguma augalų dalinai vyriškai vaisingi; kuokelių ir vainiklapių dydis vidurinis tarp Westar (<i>nap</i>) ir Westar (<i>pol</i>) CMS augalų; kai kuriuose augaluose žiedo rašto pakitimai; pailgėję žiedynų ir vegetatyviniai tarpmazgiai.
AP3/GUS	Westar (<i>nap</i>)	13	9	Identiškas Westar (<i>nap</i>) augalui; GUS ekspresija pastebėta prie vainiklapių ir kuokelių pagrindų, kaip ir laukta.

1 Konstrukcijos elementai pateikti šia seka: promotorius/pre-seką koduojanti seka; AP3 - *Arabidopsis APETELA3* promotorius; C4 - mielių COX4 pre-seka; A0 - *Neurospora* ATP9 pre-seka; ORF - redaguota *orf224* koduojanti seka; A6e - redaguota *atp6* koduojanti seka; A6u - neredaguota *atp6* koduojanti seka.

2 Patvirtinta Southern blot analize, naudojant iš NPTII geno gautą mėginį.

3 Epitope žymėta redaguota *atp6* koduojanti seka, prijungta prie A9 pre-sekos.

4 Redaguota *atp6* koduojanti seka, jokios nutaikymo pre-sekos.

Lentelė 2
Transgeninių augalų su modifikuotu vyriškuoju vaisingumu/sterilumu kiekiai

Konstrukcija	Priimantis augalas	Vaisingų ¹	Pusiau vaisingų ²	Pusiau sterilių ³	Sterilių ⁴
AP3/A9-ORF	Westar (<i>nap</i>)	6	3	1	
AP3/C4-ORF	Westar (<i>nap</i>)	5	5	2	
AP3/A9-A6e	<i>pol</i> CMS Westar		5	2	
AP3/A9-A6u	Westar (<i>nap</i>)	9		6	
<i>mas2</i> '/A9-A6e	<i>pol</i> CMS Westar		1	8	10

1 Neatskiriamas nuo Westar (*nap*)

2 Sumažintas žiedadulkių išskyrimas, lyginant su Westar (*nap*); ankštelės užpildytos po vidinio apsidulkinimo

3 Minimalus žiedadulkių išskyrimas; blogas sėklų užmezgimas po vidinio apsidulkinimo

4 Vos kelios ar visai jokių sėklų po vidinio apsidulkinimo; keletas *mas2*'/A9-A6e augalų davė daug žiedadulkių, bet nedavė sėklų, ir todėl atrodo esą moteriškai ir vyriškai sterilūs.

Kaip rodo Lentelės 1 ir 2, beveik pusėje mūsų gautų transgeninių augalų AP3 paleista redaguotos *orf224* koduojančios sekos, prijungtos prie bet kurios nutaikymo pre-sekos, ekspresija pasirodė galinti sumažinti vyriškąjį vaisingumą ir sukelti Westar (*nap*) augalų žiedų morfologijos pokyčius. Sterilumo laipsnis, vertinant pagal žiedadulkių, matomų ant naujai išsikleidusių žiedų dulkinų, kiekį, o taip pat kitų žiedo nenormalumų prigimtis kaip tai skyrėsi tarp skirtingų transgeninių augalų ir atsitiktinai, daug mažesniu laipsniu, tarp atskirų augalų skirtingų žiedynų šakų. Nebuvo jokio aiškaus skirtumo tarp COX4 (C4) ir ATP9 (A9) pre-sekų konstrukcijų bet kuriame iš palygintų fenotipų ar dažnio, kuriuo vyriškasis sterilumas buvo sukeltas. Tam tikra gautų fenotipų indikacija matoma Fig. 2 E-H iliustracijose, kurios rodo žiedus nuo transgeninių augalų, kuriems buvo stebimas žiedadulkių gamybos pasikeitimas. Šiuose augaluose vainiklapių ir kuokelių dydžiai bei pagamintų žiedadulkių kiekis buvo sumažinti, lyginant su Westar (*nap*), nors ne tiek, kiek jie sumažinti *pol* CMS augaluose. Ekstremaliausias fenotipas buvo stebėtas su transgeniniu augalu 40-8 - A9-ORF transformantu (Fig. 2E ir Fig. 2F): šiuose žieduose keturi vidiniai kuokeliai buvo konvertuoti į vaislapėlių tipo struktūras;

dulkinės, kurios susiformavo ant dviejų išorinių kuokelių, liko blyškiai gelsvos ir paskleidė tik labai mažai žiedadulkių.

Mes vertinome atskirų augalų pajėgumą užmegzti sėklas po vidinio apsidulkinimo kaip praktinį jų vyriškojo/moteriškojo vaisingumo matą. Vidiniam apsidulkinimui atlikti, mes paprastai užmauname kryžminimo maišelį ant žiedyno ir švelniai pastuksename jį apsidulkinimui paskatinti. Normaliai vyriškai vaisingų augalų atveju visos ankštelės maišelyje bus pilnai užpildytos; *pol CMS* augalai duoda labai mažai ar jokių sėklų šiose sąlygose. Kai mes pabandėme šiuo būdu vidiniai apdulkinti AP3/A9-ORF ar AP3/C4-ORF konstrukcijas ekspresuojančius transgeninius augalus, mes aptikome, kad vienu atveju nebuvo gauta jokių sėklų (transgeninis augalas 40-8, Fig. 2), o keliais kitais atvejais buvo gauta tik keletas sėklų. Tie augalai, kurie parodė žymų sėklų užmezgimo sumažėjimą, tačiau išsaugojo sugebėjimą gaminti šiek tiek žiedadulkių, buvo pažymėti kaip “pusiau sterilūs” (Lentelė 2). Viso pagal šį testą pusiau sterilūs buvo 3 iš 22 patvirtintų ORF transgeninių augalų.

Neredaguotos *atp6* geno (A6u) formos, prijungtos prie ATP9 pre-sekos ekspresija, kai paleista AP3 promoterio, taip pat pasirodė galinti sumažinti Westar (*nap*) augalų vaisingumą (Lentelė 1). Truputį mažiau kaip pusė gautų, šią konstrukciją ekspresuojančių transgeninių augalų parodė vyriškojo vaisingumo sumažėjimą (Lentelė 2). Tačiau apskritai, vyriškojo sterilumo sumažėjimas, pagal sugebėjimą užmegzti sėklas, buvo daugiau išreikštas, nei su ORF konstrukcijomis; visi šį fenotipą parodę transgeniniai augalai buvo klasifikuoti kaip pusiau sterilūs. Dauguma augalų su sumažintu vaisingumu taip pat turėjo mažus, blyškiai gelsvus vainiklapius. Pusiau sterilus fenotipas, kurį parodė vienas iš AP3/A9-A6u augalų, parodytas Fig. 2B ir Fig. 2D. Mes taip pat aptikome, kad šio tipo konstrukcijos, kaip ir ORF konstrukcijos bei trečias AP3/A9-A6 konstrukcijų tipas - AP3/A9-A6ep, kuriame ATP6 koduojanti seka yra pertraukta mažą peptidą koduojančios sekos, gali padidinti *pol CMS* augalų serilumą. Paprastai *pol CMS* augalai gamina nedaug žiedadulkių; AP3/A9-A6u ekspresuojantys *pol CMS* augalai neskleidžia jokių žiedadulkių.

Kaip parodyta Fig. 2I ir Fig. 2J, AP3 paleista redaguotos *atp6* konstrukcijos ekspresija *pol* CMS augaluose sukėlė fenotipo pokytį, neprieštaraujantį prognozei, kad ji veikia kaip sintetinis atstatytojo genas. Šių transgeninių augalų žiedai turėjo vainiklapius ir kuokeles tarpinio dydžio tarp *pol* CMS ir vaisingų Westar (*nap*) augalų. Tų žiedų dulkinės buvo mažos, geltonos, kurios gamino daug žiedadulkių, nors ne tiek daug, kaip vyriškai vaisingi Westar (*nap*) augalai (Lentelė 1). Visi šie transgeniniai augalai rodė pakeistą fenotipą (Lentelė 2), nors gaminamų žiedadulkių kiekis nedaug skiriasi tarp augalų. Šie augalai visi buvo pajėgūs duoti sėklas po žiedyno aprišimo maišeliu; du iš augalų davė tik nedaug sėklų, o penki likę augalai davė pilnas ankštes be jokio maišelio ar kitokio įsikišimo. Todėl šie 5 paskutiniai augalai gali būti laikomi atstatyto vaisingumo augalais pilna funkcinė šio termino prasme.

Mes taip pat vertinome A9-A6e konstrukcijos pajėgumą iššaukti vyriškąjį vaisingumą *pol* CMS augaluose, kai ji ekspresuojama, naudojant nuolat veikiantį promotorių *mas2'*. Šeši iš mūsų regeneruotų transgeninių augalų turėjo žiedus, kurie virtualiai buvo identiški AP3/A9-A6e augalų žiedams (Fig. 1A ir Fig. 1C). Likę augalai gamino mažesnius kiekius ar virtualiai jokių žiedadulkių. Tik vienas iš žiedadulkes gaminusių augalų buvo pajėgus užmegzti žymų sėklų kiekį be rankinio apdulkinimo, kas perša mintį, jog apskritai, moteriškasis *mas2'*/A9-A6e augalų vaisingumas yra sumažintas. Tai neprieštarauja ankstesniams rezultatams su šio tipo konstrukcijomis, kai mes gavome augalus su vaisingais žiedais, nesugebančiais užmegzti sėklų. Antras mūsų gautų augalų ypatumas yra taip pat neprieštaraujantis mūsų preliminariniams rezultatams: visi augalai, ekspresuojantys A9-A6e iš *mas2'* promotoriaus, rodė vegetatyvinio augimo pokyčius. Konkrečiai, abu - vegetatyviniai ir žiedyniniai tarpmazgiai buvo ilgesni nei Westar (*nap*) ar *pol* CMS Westar augalų (3 pav.); kai kuriuose transgeniniuose augaluose buvo paveikta ir lapų morfologija. Panašių pokyčių nebuvo matyti jokiame iš augalų, kuriuose ekspresijai buvo naudojamas AP3 promotorius. Taip, tiek moteriškojo vaisingumo sumažėjimas, tiek kiti nenormalumai atsiranda dėl sujungto proteino bendros ekspresijos iš *mas2'* promotoriaus.

Panašių tipų sterilumo modifikacijų stebėjimas daugelyje nepriklausomai transformuotų augalų labai stipriai palaiko mūsų pirmines hipotezes, būtent: (i) kad konstrukcijos, kurios leidžia nutaikyti ORF224 ar neredaguotus ATP6 polipeptidus į mitochondrijas, gali sukelti vyriškai vaisingų augalų sterilumą ir tuo tarnauti kaip sintetiniai palaikytojo genai; ir (ii), kad konstrukcijos, kurios leidžia nutaikyti redaguotą ATP6 polipeptidą į mitochondrijas, gali tarnauti kaip sintetinis atstatytojo genas. Duomenys taip pat rodo, kad kenksmingoms įtakoms vegetatyviniam augimui ir moteriškam vaisingumui išvengti, reikalinga šias konstrukcijas ekspresuoti, naudojant specifinį audiniams ar indukuojamą promotorių. R0 augalo, C4-ORF ekspresuojantis augalas 40-8 (žr. aukščiau), R1 palikuonio (iš transformavimo - regeneravimo protokolo gautas augalas) analizė pateikė nenuginčijamą įrodymą, kad stebėti fenotipai yra paveldimi, ir tai yra dėl transgeno. Mes išauginome 20 šių augalų iki subrendimo. Buvo aiškiai matyti visa žiedinių fenotipų gama - nuo ekstremalių pirminio augalo nenormalumų, kai susiformuoja tik dvi labai sterilios dulkinės, o likusios keturios dulkinės yra konvertuojamos į piestelės tipo organus, iki dalinio vyriškojo sterilumo, stebėto daugelyje R0 augalų, kurie ekspresuoja šią konstrukciją. Visi R1 palikuoniai augalai turėjo transgeną, tuo piršdami mintį, jog pirminis 40-8 R0 augalas galėjo turėti daugiau nei vieną šio geno kopiją. Tai galėtų toliau rodyti, kad išreikšto sterilumo laipsnis priklauso nuo genų dozės. Šis genų dozavimo efektas duoda papildomas priemones transgeniniuose augaluose išreikšto sterilumo laipsniui modifikuoti.

Susumuojant, mūsų eksperimentai atspindi pirmą atveją, kuriame vyriškasis sterilumas buvo sukeltas mitochondrinių ORF (*orf224* ir neredaguotas *atp6*) nutaikymą homologiniame augale-šeimininke, ir pirmą kartą, kai šiam tikslui buvo naudojami *Brassica* genai. Mūsų rezultatai taip pat stipriai perša mintį, kad AP3 paleista A9-A6e konstrukcijos ekspresija gali tarnauti kaip *pol* CMS vaisingumo atstatytojo genas. Ir tai pirmas kartas, kurį mes žinome, kuriame natūrali CMS forma buvo nuslopinta sintetinės geno konstrukcijos.

Mūsų rezultatai neprieštarauja kitų tyrinėtojų atliktiems rezultatams, kurie nustatė, kad pupų su CMS susijusio ORF (He, S. ir kiti (1996). Proc. Natl. Acad. Sci.

U.S.A. 93, 11763-11768) ar neredaguoto kviečių ATP9 geno (Hernould, M. ir kiti (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 2370-2374) proteinų produktų ekspresija/nutikymas heterologiniame priimančiame augale - tabake gali sukelti vyriškąjį sterilumą. Įdomu, kad panašaus tipo eksperimentai su su CMS susijusiais ORFais iš kukurūzų ir petunijų nedavė vyriškai sterilių augalų (Chaumont, F. ir kiti (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 1167-1171; Wintz H. ir kiti (1995). Plant Mol Biol 28, 83-92). Dažnis, kuriuo mes regeneravome vyriškai sterilius augalus, buvo didesnis, nei stebėtas dėl pupų ORF, ir sunkiai lyginamas su rezultatais, gautais naudojant neredaguotą kviečių ATP9 geną.

Šis išradimas bus geriau suprantamas, perskaičius toliau pateiktus pavyzdžius, kurie pateikti daugiau išradimui pailiuoti, o ne jo apimčiai apriboti.

PAVYZDYS I

AP3/A9-A6e konstrukcijos kaip dominuojančio vaisingumo atstatytojo geno naudojimas *B. napus* augaluose

Šiame pavyzdyje, kuris bendrai parodytas Fig. 4, A9/A6e konstrukcija genetinės transformacijos būdu yra įterpiama į genomą tokios rūšies, kaip Westar, kuri normaliai yra sterilizuota (*pol*) citoplazma. Genas įterpiamas į *pol* citoplazminę liniją, ir tikimasi, kad gautas transgeninis augalas bus dalinai vyriškai sterilus. Tada ši linija yra vidinai apdulkinama dalinai vyriškai steriliai linijai, kuri yra homozigotinė A9/A6e transgenui, gauti. Tada ši linija gali būti kryžminama su įvairiomis *pol* CMS linijomis atstatyto vaisingumo hibridams F1 gauti.

PAVYZDYS II

AP3/C4-A6e konstrukcijos naudojimas *pol* citoplazminio vyriškojo sterilumo padidinimui *B. napus* augaluose

Daugelyje *B. napus* genotipų *pol* citoplazmos sukeltas sterilumas yra nepilnas, ypač aukštesnėse temperatūrose. Ši liekamoji žiedadulkių gamyba duoda įvairų CMS linijos vidinio apsidulkinimo lygį hibridinių sėklų auginimo operacijoje. Iš šių sėklų išauginti augalai nebus hibridai ir turės sumažintą pajėgumą patys užmegzti sėklas. Šie faktoriai kartu gali žymiai sumažinti "hibridinių" sėklų partijos derlių. Šiame pavyzdyje, kuris bendrai parodytas Fig. 5, C4-ORF dominuojančios sterilumo

sukėlimo savybės naudojamos liekamajai žiedadulkių gamybai CMS linijoje sumažinti ir tuo padidinti gautų hibridinių sėklų procentą, o tuo pačiu ir hibrido sėklų partijos derlių. C4-ORF konstrukcija genetinės transformacijos būdu yra įvedama į pilnai vyriškai vaisingą Westar (*nap*) liniją dalinai vyriškai vaisingai linijai, kuri turi C4-ORF transgeną, gauti. Tada ši linija vidiniai apdulkinama dalinai vyriškai vaisingai palaikytojo linijai gauti, ir taip pat sukryžminama su netransformuota to paties branduolinio genotipo, tačiau turinčio *pol* citoplazmą, linija visiškai steriliai *pol* CMS linijai, kuri yra heterozigotinė dėl C4-ORF, gauti.

Ši linija yra atgal sukryžminama su C4-ORF dalinai vyriškai vaisinga palaikytojo linija visiškai vyriškai steriliai *pol* CMS linijai, kuri yra homozigotinė dėl C4-ORF, gauti. Ši CMS linija, kai sukryžmintą su *pol* atstatytojo linija, duos vaisingą hibridą F1. Visiškai sterili *pol* CMS linija yra dauginama, kryžminant ją, kaip moteriškąją, su *nap* citoplazmine dalinai vyriškai vaisinga transgenine C4-ORF palaikytojo linija.

Nors mes aprašėme metodą, kaip padidinti *pol* CMS augalo sterilumą, naudojant AP3-C4-ORF konstrukciją, AP3/A9-A6a ir AP3/A9-A6ep konstrukcijos taip pat galėtų būti naudojamos šiam tikslui, nes visų šių konstrukcijų ekspresija duoda visiškai vyriškai sterilius *pol* CMS transgeninius augalus.

Nors šis išradimas buvo aprašytas ryšium su jo specifiniais realizavimais, turi būti suprasta, jog jį įmanoma toliau modifikuoti, ir ši paraiška yra skirta apimti bet kokiais šio išradimo variacijomis, naudojimais ar adaptavimais, kurie seka, apskritai, išradimo principais, ir įskaitant tokius nukrypimus nuo šio aprašymo, kokie atsiranda iš žinomos ar įprastos praktikos toje srityje, kuriai priklauso išradimas, ir kokie gali būti pritaikyti esminiams aukščiau išdėstytiems ypatumams, ir kurie yra pridėtos apibrėžties apimtyje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Natūraliai atsirandančio *pol* sukkelto citoplazminio vyriškojo sterilumo augaluose padidininimo metodas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima tokius žingsnius:

- a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su bent viena iš *B. napus* mitochondrijų atp6 geno ir orf224 geno neredaguotų formų prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į augalo ląstelės branduolį;
- b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir
- c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

2. Metodas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad augalas yra *Brassica napus*.

3. Metodas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad a) žingsnis yra realizuojamas naudojant augalo transformacijos vektorių.

4. *pol*-citoplazmiškai vyriškai sterilių augalų vyriškojo vaisingumo atstatymo metodas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima tokius žingsnius:

- a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su normalaus mitochondrijų geno, kuris kotranskribuotas kartu su neįprastu su CMS susijusiu mitochondrijų genu, redaguota forma prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į augalo ląstelės branduolį;
- b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir
- c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

5. Metodas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad augalas yra *Brassica napus*.

6. Metodas pagal 4 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad a) žingsnis realizuojamas naudojant augalo transformacijos vektorių.

7. Vyrishkojo vaisingumo atstatymo polima citoplazmiškai vyriškai steriliuose *B. napus* augaluose metodas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima tokius žingsnius:

- a) genų konstrukcijos, iš esmės susidedančios iš sekos, kuri koduoja mitochondrinį perėjimo peptidą, sulietos su *B. napus* mitochondrijų atp6 geno redaguota forma prieš srovę jos atžvilgiu ir viename rėmelyje, įvedimas į *B. napus* augalo ląstelės branduolį;
- b) augalo ląstelių, kurios įgijo genų konstrukciją a) žingsnyje, atrinkimas; ir
- c) atrinktų augalo ląstelių regeneracijos indukavimas subrendusiam augalui gauti.

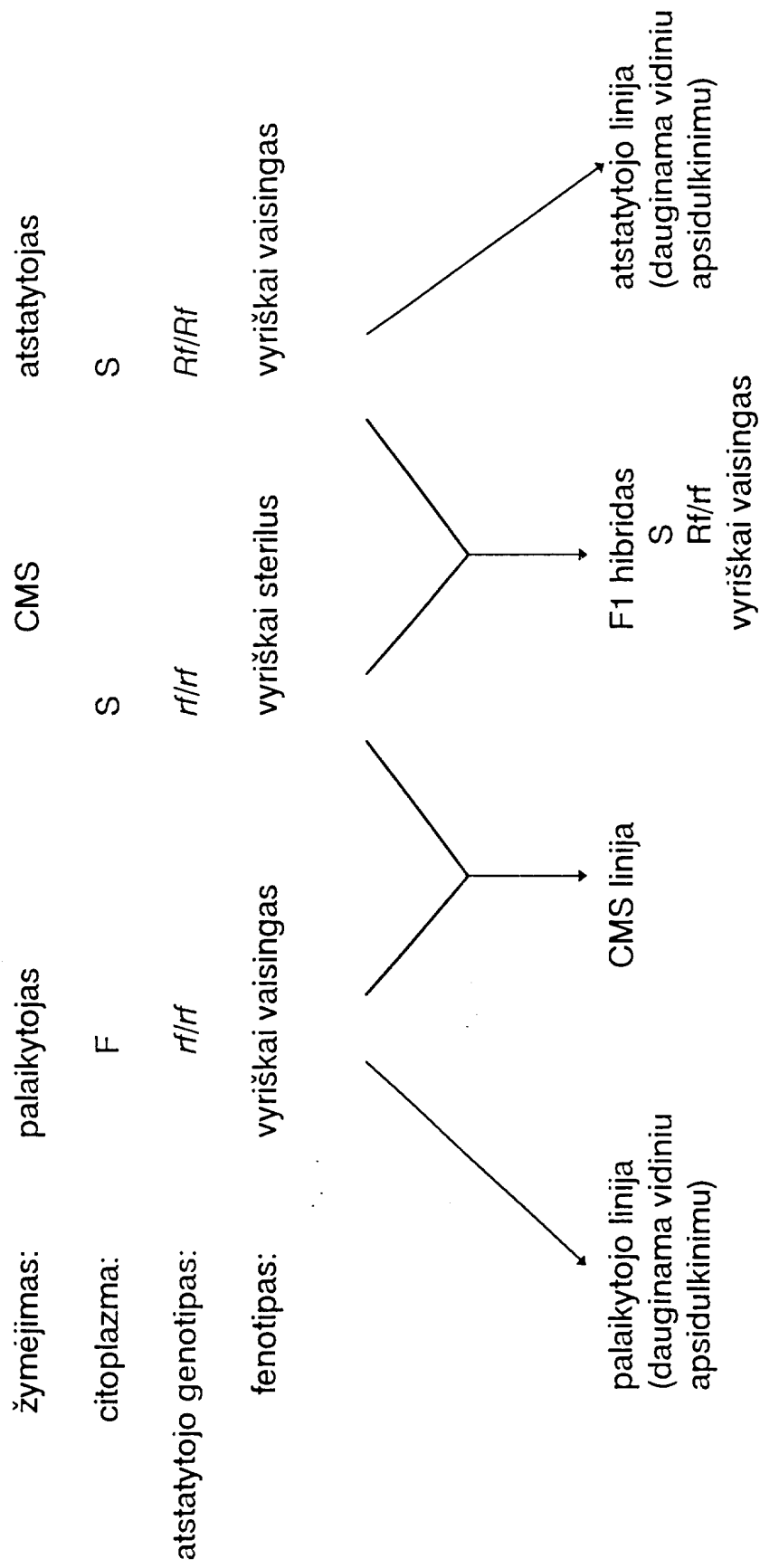


Fig. 1

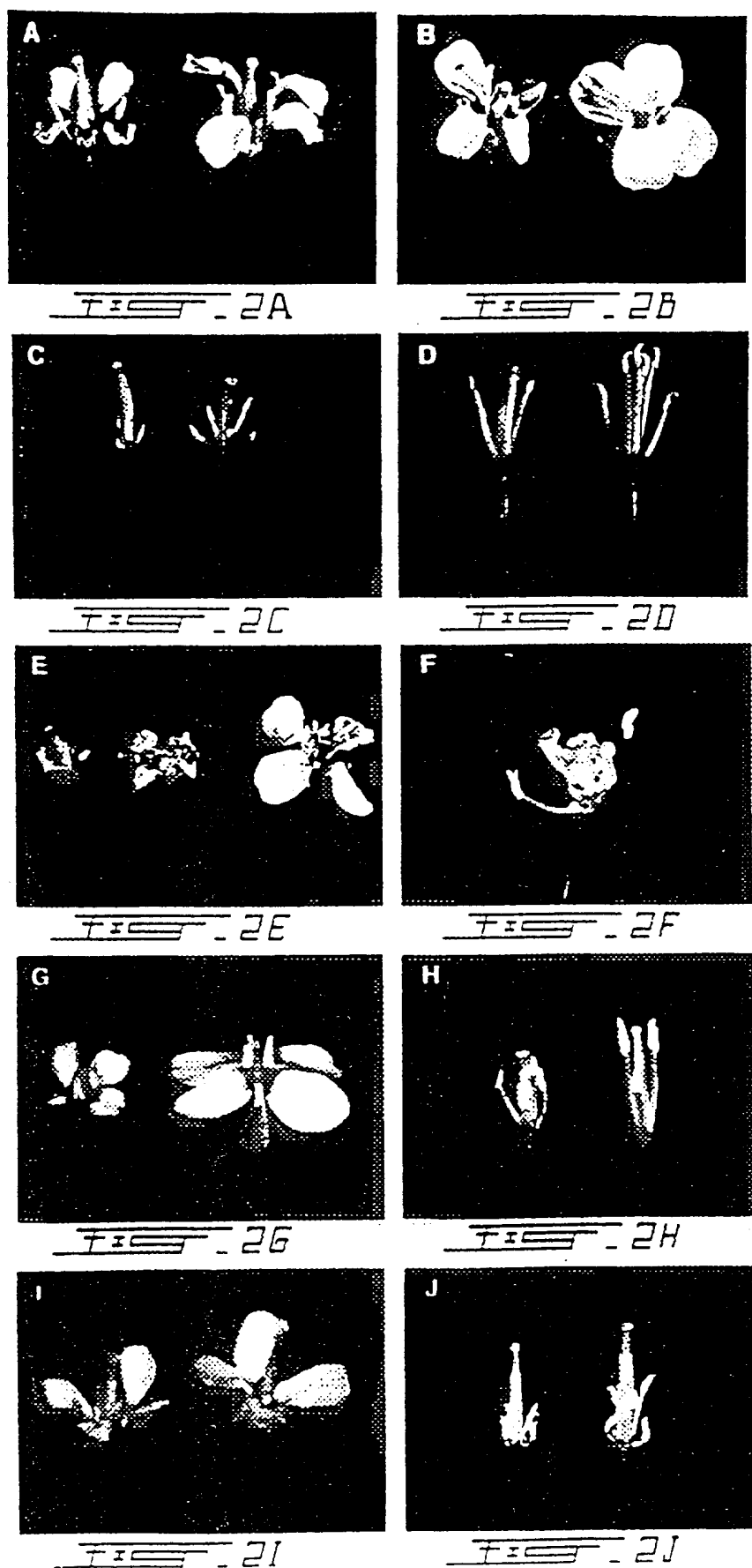


Fig. 2

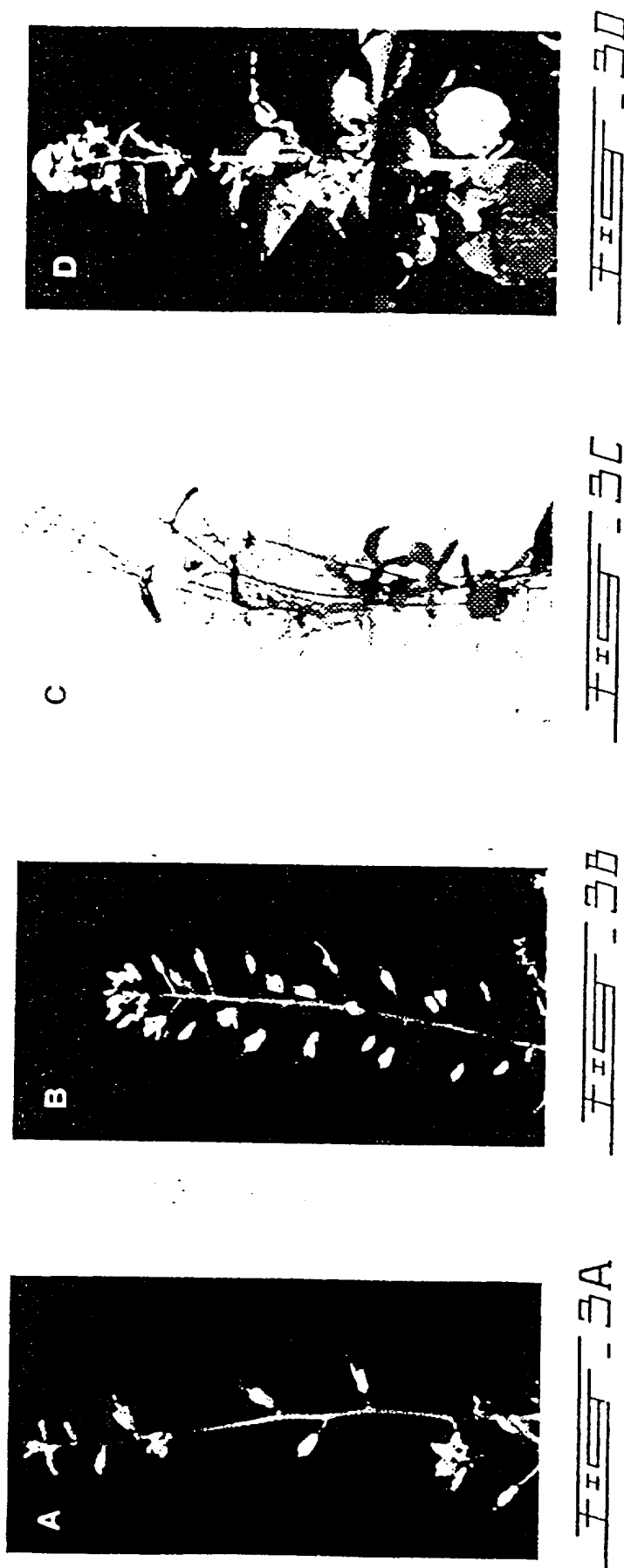


Fig. 3

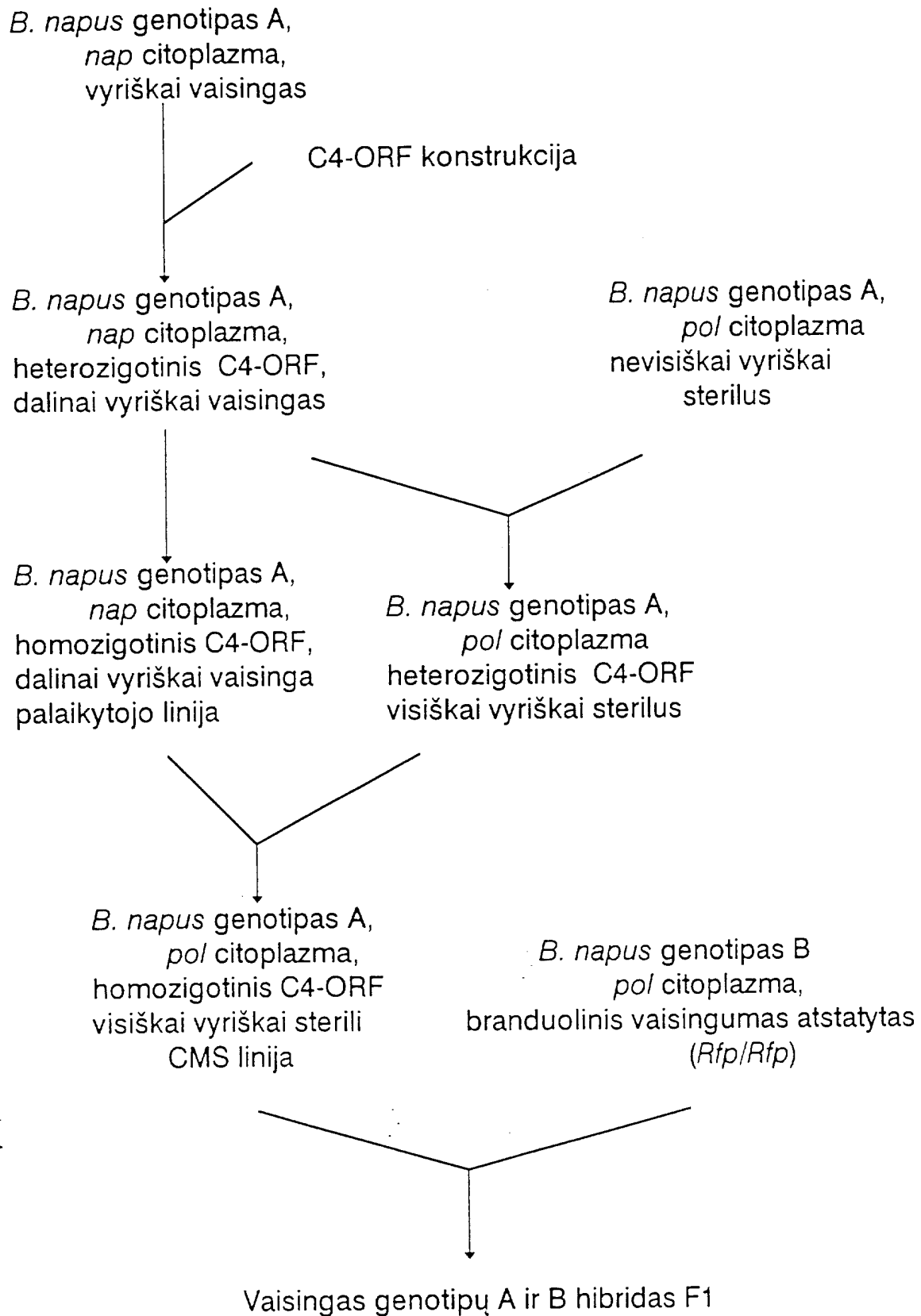


Fig. 5