

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. März 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/020939 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82, (74) Anwalt: MEYER, Udo; BASF Aktiengesellschaft, 67056
15/29, A01H 5/00 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/09719 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. August 2002 (30.08.2002)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
101 42 579.1 3. September 2001 (03.09.2001) DE
102 29 729.0 2. Juli 2002 (02.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; 67056
Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOGEL, Karl-Heinz
[DE/DE]; Berggartenstrasse 7, 35457 Lollar (DE).
HÜCKELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstrasse
12, 35392 Giessen (DE). SCHULTHEISS, Holger
[DE/DE]; Görbelheimer Grund 6, 61169 Friedberg (DE).
FRANK, Markus [DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163
Mannheim (DE).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL NUCLEIC ACID SEQUENCES AND THEIR USE IN METHODS FOR ACHIEVING PATHOGEN RESIS-
TANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: NEUE NUKLEINSÄURESEQUENZEN UND DEREN VERWENDUNG IN VERFAHREN ZUM ERREI-
CHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to novel RacB cDNA sequences from barley and to expression cassettes and vectors compris-
ing said promoter sequences. The invention also relates to transgenic plants transformed with said expression cassettes or vectors,
cultures derived therefrom, fragments or transgenic propagating material and to the use thereof in the production of foodstuffs, ani-
mal food, seeds, pharmaceuticals or fine chemicals. The invention further relates to the production or enhancement of pathogen
resistance in plants by reducing the expression of an RacB protein or a functional equivalent.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft neue RacB cDNA Sequenzen aus Gerste, sowie Expressionskassetten und Vektoren,
die diese Promotorsequenzen umfassen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte
transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Her-
stellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur
Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression eines RacB-Protein oder eines
funktionellen Äquivalentes desselben.



WO 03/020939 A1

Neue Nukleinsäuresequenzen und deren Verwendung in Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

5 Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue RacB cDNA Sequenzen aus Gerste, sowie Expressionskassetten und Vektoren, die diese Sequenzen umfassen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten
10 oder Vektoren transformierte transgene Pflanzen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pa-
15 thogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression eines RacB-Protein oder eines funktionellen Äquivalentes desselben.

Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel
20 zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika (Dunwell JM (2000) J Exp Bot 51 Spec No:487-96). Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzkrankungen
25 führen zu Ernteverlusten in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass in Tabak durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen unter Kontrolle des 35 S CaMV
30 Promoters (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promoters (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes
35 Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen, vor allem Pilzpathogene, verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired
40 resistance"; SAR) - ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen - kann durch Applikation von endogene Botenstoffe wie Jasmonat (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward, et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes, et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte
45 können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; Bion®) (Friedrich et al. (1996) Plant J

10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J. 10:71-82) bewirkt werden. Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hoch-regulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.

5

In Gerste ist bereits seit längerem der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust oder Funktionsverlust ("loss-of-function") des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und vor allem rassen-unspezifische Resistenz beispielsweise gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Der Mlo-Phänotyp wird rezessiv vererbt, was ebenfalls für eine Funktion als Suszeptibilitätsgen spricht. Durch klassische Züchtung erhaltene Mlo-defiziente Gerstensorten werden bereits breit in der Landwirtschaft verwendet. Vermutlich aufgrund der Rezessivität hat sich trotz eines intensiven Anbaus diese Resistenz als außerordentlich dauerhaft erwiesen. Durchbrechungen der Resistenz sind bislang nicht aufgetreten. Mlo-ähnliche Resistenzen in anderen Pflanzen v.a. in Getreidearten sind nicht beschrieben, obgleich auch Weizen, Roggen und andere Getreide von vergleichbaren Mehltau-Pathogenen befallen werden. Ursache bei Weizen kann zum Beispiel das Vorliegen eines hexaploiden Genoms sein, was die Identifizierung von Mutanten, bei denen jede der sechs Genkopien inaktiviert wurde, extrem erschwert.

Das Mlo-Gen wurde erst kürzlich kloniert (Büschges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Infolge verschiedener Homologe aus anderen Getreidearten isoliert. Verschiedene Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; WO 99/47552).

Die Mlo-bedingte Resistenz einer Pflanze gegen Mehltau-Pathogene äußert sich in zwei wesentlichen Ereignissen, die beide eine Penetrationsresistenz bewirken: Eine Papillenbildung ("cell wall apposition"; CWA) unterhalb des Penetrationsortes des Pathogens, der epidermalen Zellwand. Die Ausbreitung des Pilzpathogens bleibt fast ausschließlich auf diese subzelluläre Struktur beschränkt (Jorgensen JH und Mortensen K (1977) Phytopathology 67:678-685; Freialdenhoven A et al. (1996) Plant Cell 8:5-14). Bedingt wird diese Reaktion durch die für die Mlo-Wirkung erforderlichen Gene Ror1 und Ror2 (Peterhänsel C et al. (1997) 9:1397-1409).

45

Nachteilig bei der Mlo-bedingten Pathogenresistenz ist, dass Mlo-defiziente Pflanzen - auch in Abwesenheit eines Pathogens - einen Abwehrmechanismus initiieren, der sich beispielsweise in einem spontanen Absterben von Blattzellen äußert (Wolter M et al.

- 5 (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Nachteilig ist ferner, dass die Mlo-defizienten Genotypen eine Hypersuszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) sowie *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) zeigen (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133). Das Mlo-Gen scheint also ein negativer Regulator des Zelltods zu sein. Ursache ist ebenfalls vermutlich die Induktion von Zelltod bei Abwesenheit des Mlo-Gens, was die Suszeptibilität gegenüber diesen eher nekrotrophen Pathogenen steigert. Diese ambivalente Wirkung, die die biotechnologische Anwendung von Mlo limitiert, beruht vermutlich darauf, dass nekrotrophe Pilze die stärkere HR der Mlo-defizienten Wirtspflanze für ihren Infektionsprozess ausnutzen können. Wünschenswert wäre eine der Mlo-Defizienz vergleichbare Resistenz, der jedoch das Merkmal der Zelltodinduktion fehlt.

- Die Proteine Rho, Rac und Cdc42 sind Mitglieder der Familie der kleinen GTP-(Guanosintriphosphat) Bindeproteine und regulieren als "molekulare Schalter" zahlreiche intrazelluläre Prozesse, sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Organismen. Sie haben als Bausteine der Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei der Umsetzung extrazellulärer Stimuli. Sie regulieren beispielsweise die NADPH Oxidase und damit die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle ("oxidative burst"). Tierisches oder menschliches Rac1 ist essentiell für die Bildung des aktiven NADPH Oxidasekomplexes, der wiederum wichtig für die Bildung von Superoxid ist, und so einen Beitrag zur Pathogenabwehr liefert (Irani K und Goldschmidt-Clermont PJ (1998) Biochem Pharmacol 55: 1339-1346). Die Funktion in der Pathogenabwehr ist weitgehend analog in Pflanzen und in Tieren (Kwong et al. (1995) J Biol Chem 270(34): 19868-19872; Dusi et al. (1996) Biochem J 314:409-412; Diekmann et al. (1994) Science 265:531-533; Purgin et al. (1997) The Plant Cell 9:2077-2091; Kleinberg et al. (1994) Biochemistry 33:2490-2495; Prigmore et al. (1995) Journal of Biol Chem 27(18): 10717-10722; Irani et al. (1997) Science 275:1649-1652; Low et al. (1994) Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions 3:361-369 (1994) eds. MJ Daniels, Kluwer Academic Publishers, Netherlands; Mehdy et al. (1994) Plant Physiol 105: 467-472; Sundaresan et al. (1996) Biochem J 318:379-382).
- 45 Darüber hinaus haben GTP-Bindeproteine eine Funktion bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Zelltransformation (Symon M. (1996) TIBS 21: 178-181), sowie bei der Aktivierung

der Transkription (Hill et al. (1995) Cell 81:1159-1170; Chandra et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93:13393-13397).

In Pflanzen besteht eine größere Familie an Rac-ähnlichen Proteinen (Winge et al. (1997) Plant Mol Biol 35:483-495), die auch als Rop-Familie bezeichnet werden (Lin et al. (1997) The Plant Cell 9:1647-1659). In Pflanzen scheinen die Rac Proteine eine Funktion in der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle infolge eines Pathogenbefalls zu haben (Groom QJ et al. (1996) Plant J 10: 515-522; Hassanain HH et al. (2000) Biochem Biophys Res Commun 272(3):783-788; Ono E et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 759-764). Rac moduliert u.a. die Zellwandarchitektur, die Signaltransduktion im Meristem und die Abwehr von Pathogenen (Valster AH et al. (2000) Trends Cell Biol 10(4):141-146). Rac1 aus Reis vermag bei Überexpression der konstitutiv-aktiven Form eine hypersensitive Antwort ("hypersensitive response"; HR) an den Stellen eines M. grisea-Befalls zu induzieren und bewirkt so eine Pathogenresistenz. Analog bewirkt die Expression einer dominant-negative Form von Rac1 eine erhöhte Suszeptibilität gegen M. grisea (Kawasaki T et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96:10922-10926; Ono E et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 759-764). Diese Befunde deuten darauf hin, dass durch eine Überexpression von Rac-Proteinen in der Pflanze vorteilhafte Effekte bezüglich einer Pathogenabwehr bewirkt werden können.

WO 00/15815 beschreibt fünf Rac-Gene aus Mais. Obgleich hier sowohl Verfahren für eine Hoch- als auch Runterregulation von Rac-Proteinen beschrieben und spekulativ in den Zusammenhang mit der Erzielen einer Pathogenresistenz gebracht werden (S.55/Z.25ff.), ist die einzige technische Lehre die diese Verwendung konkret beschreibt allein auf eine Überexpression der beanspruchten Rac-Gene zum Erreichen einer Pathogenresistenz gerichtet (S.60/Z.21ff.). Ganz eindeutig - und im Einklang mit dem im Stand der Technik beschriebenen Sachverhalt - wird hier postuliert (S.60/Z.31ff): "Demzufolge ist die Erfindung nützlich, um Pflanzen vor Pathogenen zu schützen. Sobald eine Pflanze mit einem Polynukleotid kodierend für ein Rac Polypeptid transformiert ist, wird die Expression des Polypeptides in der Pflanze eine Resistenz gegen Pflanzenpathogene bewirken." Das hinter dieser Hypothese stehende Rational (Pathogenabwehr über reaktive Sauerstoffmoleküle) wird nachfolgend dargelegt und mit zahlreichen Literaturstellen untermauert. Darüberhinaus wird keine Differenzierung zwischen den fünf beanspruchten Rac-Genen vorgenommen.

5

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrum von Pathogenen in möglichst vielen verschiedene Pflanzenarten, bevorzugt den in
5 der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein
10 Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion eines RacB-Proteins in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil
15 oder Zelle derselben und

b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

20

Überraschenderweise zeigt das Rac-Homolog RacB aus Gerste (*Hordeum vulgare*) (SEQ ID NO: 1) (infolge: hvRacB) - trotz einer hohen Ähnlichkeit zu Reis-Rac1 - im Gegensatz zu diesem eine negative Kontrollfunktion bei einem Befall durch den Gersten-
25 Mehltau *Blumeria (syn. Erysiphe) graminis f.sp. hordei* (Bgh): Die Verminderung der hvRacB Expression in der epidermalen Zelle durch einen sequenzspezifischen RNA-Interferenz Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger hvRacB-dsRNA ("Gene-Silencing"), ver- hinderte signifikant die Haustorium-Ausbildung infolge einer Bgh-
30 Infektion. Weitere Experimente zeigten (vgl. Beispiel 7), dass dieser Phänotyp nicht in einem *mlo5-ror1*-mutanten Genotyp - der Gerste A89 - beobachtet werden kann. Dies legt nahe, dass RacB in funktioneller Verbindung zu Mlo oder Ror1 oder beiden steht, also vermutlich in einer Signalkette wirken.

35

Ähnlich wie der Funktionsverlust von Mlo vermittelt der von HvRacB eine breite Resistenz gegen verschiedene Isolate von *Blumeria graminis f.sp. hordei*. In transienten "Gene-Silencing"-Ex-
40 perimenten reduziert HvRacB die Penetrationseffizienz (Haustorien-Bildung) von Bgh um 44 % (vgl. Beispiel 7)- ein Effekt, der in seiner Stärke dem mittels Mlo-dsRNA erreichten entspricht (Schweizer et al. (2000) Plant J 24:895-903). In der Wildtyp Gerstensorte Ingrid führen ca. 60 % der Pilzpenetrationen zu einer Haustorien-Bildung, wohingegen die Penetrationsrate in BCIngrid-
45 *mlo5* nahezu 0 % beträgt. Die Gerstensorte A89 (*mlo-ror1*-Doppelmutante) zeigt eine Penetrationseffizienz von ca. 20 bis 35 %. In keiner dieser Varianten war eine geänderte RacB Expression in-

folge der Bgh-Inokulation zu beobachten (vgl. Beispiel 7; Fig. 3). Die Tatsache, dass auch in pathogen-empfindlichen Wildtyp-Sorten wie Pallas oder Ingrid nur eine Penetration von ca. 50 % beobachtet werden kann, ist auf die stets vorhandene Basalresistenz zurückzuführen.

Interessanterweise verstärkt das "Gene-Silencing" von hvRacB nur die Papillenbildung, aber anscheinend nicht den spontanen Zelltod der Pflanze - im Gegensatz zu Mlo. Damit unterscheidet sich HvRacB von OsRac1, einem Reis-Homolog von Rac1 (Ono E et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:759-764). HvRacB wirkt vorwiegend als negativer Regulator der Papillenbildung. Für die Verwendung zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen ist dieser Unterschied von herausragender Bedeutung. Wie bereits oben beschrieben wird die Mlo-Resistenz gegen biotrophe Pilze (z.B. Mehltaupilze) zwar auch durch eine verstärkte Papillenbildung bedingt, ist jedoch mit einer höheren Anfälligkeit gegen nekrotrophe Pilze teuer erkaufte (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133). Da HvRacB nur die Papillenbildung beeinflusst, kann dieses Ambivalenz-Problem umgangen werden.

RacB ist aufgrund der oben genannten Befunde als Schlüsselement für das erfolgreiche Eindringen eines Pathogens wie Bgh in die pflanzliche Zelle zu verstehen. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet demnach alle Vorzüge der Mlo-Defizienz, ohne zugleich deren größten Nachteil - den erhöhten spontanen Zelltod - aufzuweisen.

Darüberhinaus ist das Verfahren allen Verfahren überlegen, bei denen ein pathogen-resistenter Phänotyp durch Überexpression eines resistenzvermittelnden Proteins realisiert wird. Das Ausschalten eines Gens, lässt sich ohne Expression eines (Fremd)-Proteins realisieren. Im Idealfall wird lediglich das endogene Gen deaktiviert. Dies hat nicht zu vernachlässigende Vorteile bei der Zulassung und der Akzeptanz durch den Verbraucher, der Pflanzen mit Fremdproteinen oft mit Vorbehalt begegnet. Ganz besonders vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von induzierbaren Promotoren zur Verminderung der RacB-Proteinmenge, Aktivität oder Funktion, was beispielsweise bei Verwendung von pathogeninduzierbaren Promotoren eine Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglicht.

Eine partielle Sequenz der Gerste RacB cDNA (HvRacB-cDNA) ist beschrieben (GenBank Acc.-No.: AJ290240), die hochkonserviert zum Reis-RacB (GenBank Acc.-No.: AF250327) und Mais RacB (GenBank Acc.-No.: AF126053) und sehr ähnlich zum Reis Rac1 ist. Mais RacB

ist auch eines der fünf Rac-Gene in der oben genannten Anmeldung WO 00/15815 (Sequenz Nr. 3). Die vollständige kodierende Sequenz des HvRacB-Protein ist bislang nicht beschrieben (s. Beispiel 1). Gerste RacB hat eine Homologie von 95 % Identität zu Reis RacB und Mais RacB und ist mehr als 55 % identisch zu dem humanen RAC1 oder RAC2 (Hassanain et al. 2000, Fig. 1). HvRacB wird konstitutiv in den Primärblättern der Gerste (epidermis-spezifisch) exprimiert und wird durch einen Bgh-Befall nicht wesentlich in seiner Expressionshöhe beeinflusst. Insofern erfolgt die Expression in dem Gewebe, das unmittelbar mit dem Bgh-Pathogen interagiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. Bevorzugt auf solche, in denen natürlicherweise ein RacB-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben exprimiert wird. Da die Funktion von RacB in engem funktionellem Zusammenhang mit dem Mlo-Gen steht und dieses in zahlreichen Pflanzen - auch in Dikotyledonen - identifiziert wurde (Devoto A et al. (1999) J Biol Chem 274(49):34993-5004), ist eine ähnlich breite Verteilung auch für RacB und seine Homologen zu vermuten. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten RacB Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise Arabidopsis thaliana) können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der RacB-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. "Pflanze" umfasst alle einjährigen und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispielsweise jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panieum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis,

8

Cucumis, Browaalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus ein.

5 Der Begriff "Pflanze" umfasst bevorzugt monokotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

10 Ferner umfasst der Begriff dikotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Brassicaceae wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss

15

- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,

20

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,

sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke,

25

Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuss- und Weinarten. Baumarten umfasst bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

30

Ferner umfasst sind Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen wie beispielhaft aber nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weih-

35

nachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum,

40

Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyle Gattungen und Arten, wie die beschriebenen

45 Getreidearten.

Ganz besonders bevorzugt wird das Verfahren auf monokotyle Pflanzen, am meisten bevorzugt auf Pflanzen mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder
5 Zuckerrohr angewendet.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen
10 aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

15 "Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine erhöhte Resistenz gegen ein und mehr Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten
20 Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome - neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen - auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt
30 um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % vermindert.

35 "Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, alle Verfahren, die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogen-
40 infektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

45 "Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden.

Besonders bevorzugt sind Pilze wie beispielsweise der Mehltau. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Verminderung der Expression eines RacB-Proteins, seiner Aktivität oder Funktion auch eine Resistenz gegen weitere Pathogene bewirkt. Veränderungen in der Zellwand-
 5 struktur können einen grundlegenden Mechanismus der Pathogenresistenz darstellen.

Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

10

1. Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene:

15

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti).
 Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang
 20 gebrachten Erkrankungen zu nennen.

20

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
25	Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
	Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
	Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis</i> / <i>Blumeria graminis</i>
	Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
	Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
30	Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
	Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
	Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
	Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
35	Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
	Anthracnose leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcata</i> Went)
	Anthracnose stalk rot	
40	Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
45	Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda

	Erkrankung	Pathogen
	Black kernel rot	Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae
5	Borde blanco	Marasmiellus sp.
	Brown spot (black spot, stalk rot)	Physoderma maydis
	Cephalosporium kernel rot	Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium
10	Charcoal rot	Macrophomina phaseolina
	Corticium ear rot	Thanatephorus cucumeris = Corticium sasakii
15	Curvularia leaf spot	Curvularia clavata, C. eragrostidis, = C. maculans (teleomorph: Cochliobolus eragrostidis), Curvularia inaequalis, C. intermedia (teleomorph: Coch- liobolus intermedius), Curvularia lunata (teleomorph: Cochliobolus lunatus), Curvularia pallescens (tele- omorph: Cochliobolus pallescens), Curvularia senegalensis, C. tuber- culata (teleomorph: Cochliobolus tuberculatus)
20	Didymella leaf spot	Didymella exitalis
	Diplodia ear rot and stalk rot	Diplodia frumenti (teleomorph: Botryosphaeria festucae)
25	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seed- ling blight	Diplodia maydis = Stenocarpella maydis
	Diplodia leaf spot or streak	Stenocarpella macrospora = Diplodia leaf macrospora

30

Tabelle 2: Falscher Mehltau

	Erkrankung	Pathogen
35	Brown stripe downy mildew	Sclerophthora rayssiae var. zeae
	Crazy top downy mildew	Sclerophthora macrospora = Sclerospora macrospora
40	Green ear downy mi- ldew (graminicola downy mildew)	Sclerospora graminicola
	Java downy mildew	Peronosclerospora maydis = Sclerospora maydis
	Philippine downy mildew	Peronosclerospora philippinensis = Sclerospora philippinensis
45	Sorghum downy mildew	Peronosclerospora sorghi = Sclerospora sorghi

	Erkrankung	Pathogen
	Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
5	Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
10	Ear rots, minor	Alternaria alternata = A. tenuis, Aspergillus glaucus, A. niger, Aspergillus spp., Botrytis cinerea (teleomorph: Botryotinia fuckeliana), Cunninghamella sp., Curvularia pallescens, Doratomyces stemonitis = Cephalotrichum stemonitis, Fusarium culmorum, Gonatobotrys simplex, Pithomyces maydicus, Rhizopus microsporus Tiegh., R. stolonifer = R. nigricans, Scopulariopsis brumptii
15		
20	Ergot (horse's tooth)	Claviceps gigantea (anamorph: Sphacelia sp.)
	Eyespot	Aureobasidium zeae = Kabatiella zeae
	Fusarium ear and stalk rot	Fusarium subglutinans = F. moniliforme var. subglutinans
25	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)
	Fusarium stalk rot, seedling root rot	Fusarium avenaceum (teleomorph: Gibberella avenacea)
30	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	Gibberella zeae (anamorph: Fusarium graminearum)
	Gray ear rot	Botryosphaeria zeae = Physalospora zeae (anamorph: Macrophoma zeae)
35	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	Cercospora sorghi = C. sorghi var. maydis, C. zeae-maydis
	Helminthosporium root rot	Exserohilum pedicellatum = Helmin- thosporium pedicellatum (teleomorph: Setosphaeria pedicellata)
40	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	Cladosporium cladosporioides = Hormo- dendrum cladosporioides, C. herbarum (teleomorph: Mycosphaerella tassiana)
	Hyalothyridium leaf spot	Hyalothyridium maydis
	Late wilt	Cephalosporium maydis

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata)
10		Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum)
	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
25	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	Phaeocystostroma ambiguum, = Phaeocystospora zeae
	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
30	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenochaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenochaeta terrestris
35	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
40	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cercospora sorghi</i> , <i>Dictyochoaeta fertilis</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> (teleomorph: <i>Gibberella acuminata</i>), <i>F. equiseti</i> (teleomorph: <i>G. intricans</i>), <i>F. oxysporum</i> , <i>F. pallidoroseum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>G. cyanogena</i> , (anamorph: <i>F. sulphureum</i>), <i>Microdochium bolleyi</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Periconia circinata</i> , <i>Phytophthora cactorum</i> , <i>P. drechsleri</i> , <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i>
10		
15	Rostratum leaf spot (Helminthosporium leaf disease, ear and stalk rot)	<i>Setosphaeria rostrata</i> , (anamorph: <i>Exserohilum rostratum</i> = <i>Helminthosporium rostratum</i>)
	Rust, common corn	<i>Puccinia sorghi</i>
	Rust, southern corn	<i>Puccinia polysora</i>
	Rust, tropical corn	<i>Physopella pallescens</i> , <i>P. zae</i> = <i>Angiopsora zae</i>
20	Sclerotium ear rot (southern blight)	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (teleomorph: <i>Athelia rolfsii</i>)
25	Seed rot-seedling blight	<i>Bipolaris sorokiniana</i> , <i>B. zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i> , <i>Diplodia maydis</i> , <i>Exserohilum pedicellatum</i> , <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Gibberella zae</i> (anamorph: <i>F. graminearum</i>), <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>R. zae</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Spicaria</i> sp.
30		
	Selenophoma leaf spot	<i>Selenophoma</i> sp.
	Sheath rot	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
	Shuck rot	<i>Myrothecium gramineum</i>
35	Silage mold	<i>Monascus purpureus</i> , <i>M. ruber</i>
	Smut, common	<i>Ustilago zae</i> = <i>U. maydis</i>
	Smut, false	<i>Ustilaginoidea virens</i>
	Smut, head	<i>Sphacelotheca reiliana</i> = <i>Sporisorium holcisorghi</i>
40	Southern corn leaf blight and stalk rot	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (anamorph: <i>Bipolaris maydis</i> = <i>Helminthosporium maydis</i>)
	Southern leaf spot	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia macrospora</i>

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematococca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopoglyphus zeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocrea sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei snapdragon (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudo-peronospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschiimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

- mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).
- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzelötter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).
- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (*Cercospora*-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f. sp. hordei) und Weizen (f. sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria nodorum und
 5 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 3: Bakterielle Erkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Bacterial leaf blight and stalk rot	Pseudomonas avenae subsp. avenae
	Bacterial leaf spot	Xanthomonas campestris pv. holcicola
	Bacterial stalk rot	Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens
25	Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. zea
	Bacterial stripe	Pseudomonas andropogonis
	Chocolate spot	Pseudomonas syringae pv. coronafaciens
30	Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. andnebraskense
	Holcus spot	Pseudomonas syringae pv. syringae
35	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
	Seed rot-seedling blight	Bacillus subtilis
	Stewart's disease (bacterial wilt)	Pantoea stewartii = Erwinia stewartii
40	Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	Spiroplasma kunkelii

45 Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien: Corynebacterium sepedonicum (Bakterienringfäule an Kartoffel), Erwinia carotovora (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), Erwinia amylovora (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), Streptomyces

scabies (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

3. Virale Pathogene:

10

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaiv Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 4: Virale Erkrankungen

20

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
25 Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
30 Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
35 Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
40 Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
45 Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)

	Krankheit	Pathogen
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
5	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
10	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
15	Maize-rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
20	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
25	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
30	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
35	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
40	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
45	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie
 beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen.
 Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera,
 Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera,
 Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura,
 10 Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind
 Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise
 den Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica*
barberi ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecim-*
punctata ("southern corn rootworm"), *Diabrotica virgifera*
 15 ("Western corn rootworm"), *Agrotis ipsilon* ("black cutworm"),
Crymodes devastator ("glassy cutworm"), *Feltia ducens* ("dingy
 cutworm"), *Agrotis gladiaria* ("claybacked cutworm"), *Melanotus*
spp., *Aeolus mellillus* ("wireworm"), *Aeolus mancus*
 ("wheat wireworm"), *Horistonotus uhlerii* ("sand wireworm"),
 20 *Sphenophorus maidis* ("maize billbug"), *Sphenophorus zea*
 ("timothy billbug"), *Sphenophorus parvulus* ("bluegrass
 billbug"), *Sphenophorus callosus* ("southern corn billbug"),
Phyllogphaga spp. ("white grubs"), *Anuraphis maidiradicis*
 ("corn root aphid"), *Delia platura* ("seedcorn maggot"),
 25 *Colaspis brunnea* ("grape colaspis"), *Stenolophus lecontei*
 ("seedcorn beetle") und *Clivinia impressifrons* ("lender
 seedcorn beetle").

30 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema*
melanopus), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer
 (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus
Rhopalosiphum padi, Grosse Getreideblattlaus *Sitobion*
avenae).

35 4.2 Nematoden:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in
 Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammen-
 hang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

40

Tabelle 6: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus spp.</i> , <i>D. heterocephalus</i>
45 Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Burrowing	Radopholus similis
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zea, Punctodera chaltoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
10	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zea
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
20	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, salat, tomate, Kartoffel, Zucker-
 30 rübe, Luzerne).
 35

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

40

1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. hordei (barley stem rust), *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. hordei (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV),
 45

22

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Schizaphis graminum* (greenbug); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Euschistus servus* (brown stink bug); *Deliaplatura* (seedcorn maggot); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Petrobia latens* (brown wheat mite).

2. Sojabohne:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp. *glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojae*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar); *Plathypena scabra* (green cloverworm); *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle); *Myzus persicae* (green peach aphid); *Empoasca fabae* (potato leaf hopper); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestanii* (strawberry spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

40

3. Canola:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

45

4. Alfalfa:

Pilz,, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*,
 5 *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*,
 10 *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*,
Stemphylium herbarum, *Stemphylium alfalfae*.

5. Weizen:

Pilz-,bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae*
 15 p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris*
 p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*,
Fusarium avenaceum, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*,
 20 *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum*
graminicola, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis*
graminis f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*,
Puccinia striiformis, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*,
Septoria tritici, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*,
 25 *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium*
aphanidermatum, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*,
Bipolaris sorokiniana, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome
 Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak
 Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat
 30 Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*,
Ustilago tritici, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium*
arrhenomanes, *Pythium graminicola*, *Pythium aphanidermatum*,
 High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis*
 f.sp. *tritici* (Wheat stem rust),
 35 *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery
 Mildew)

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata* (army
 worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus*
 40 *lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western
 cutworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk
 borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera punctata*
 (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi*
 (southern corn rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis*
 45 *graminum* (greenbug); *Macrosiphum avenae* (English grain
 aphid); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper);
Melanoplus differentialis (differential grasshopper); *Melano-*

24

plus sanguinipes (migratory grasshopper); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Sitodiplosis mosellana* (wheat midge); *Meromyza americana* (wheat stem maggot); *Hylemya coarctata* (wheat bulb fly); *Frankliniella fusca* (tobacco thrips); *Cephus cinctus* (wheat stem sawfly); *Aceria tulipae* (wheat curl mite);

6. Sonnenblume:

10 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Plasmophora halstedii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*, *Phomopsis helianthi*, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*, *Phoma macdonaldii*, *Macrophoma phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus oryzae*,
 15 *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium dahliae*, *Erwinia carotovorum* p.v. *Carotovora*, *Cephalosporium acremonium*, *Phytophthora cryptogea*, *Albugo tragopogonis*.

20 Pathogene Insekten / Nematoden: *Suleima helianthana* (sunflower bud moth); *Homoeosoma electellum* (sunflower moth); *zygogramma exclamationis* (sunflower beetle); *Bothyrus gibbosus* (carrot beetle); *Neolasioptera murtfeldtiana* (sunflower seed midge);

25

7. Mais:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*), *Stenocarpella maydi* (*Diplodia maydis*), *Pythium irregulare*, *Pythium debaryanum*, *Pythium graminicola*, *Pythium splendens*, *Pythium ultimum*, *Pythium aphanidermatum*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris maydis* 0, T (*Cochliobolus heterostrophus*), *Helminthosporium carbonum* I, II & III (*Cochliobolus carbonum*), *Exserohilum turcicum* I, II & III, *Helminthosporium pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophoma phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*,
 30 *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganese* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*, *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia carotovora*, Cornstunt spiroplasma, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinesis*, *Peronosclerospora*

45

maydis, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Spodoptera frugiperda*. (fall armyworm); *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Diatraea saccharalis* (surgarcane borer); *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm); *Diabrotica longicornis barberi* (northern corn rootworm); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); *Melanotus* spp. (wireworms); *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer; white grub); *Cyclocephala immaculata* (southern masked chafer; white grub); *Popillia japonica* (Japanese beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Anuraphis maidiradicis* (corn root aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus sanguinipes* (migratory grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Agromyza parvicornis* (corn blot leafminer); *Anaphothrips obscurus* (grass thrips); *Solenopsis milesta* (thief ant); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

8. Sorghum:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Sugarcan mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

Sclerospora graminicola, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium graminicola*.

5 Pathogene Insekten / Nematoden: *Chilo partellus* (sorghum borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn ear-worm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Feltia subterranea* (granulate cutworm); *Phyllophaga crinita* (white grub); *Eleodes*, *Conoderus* und *Aeolus* spp. (wireworm); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Siphaflava* (yellow sugarcane aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Contarinia sorghicola* (sorghummidge); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite); *Tetranychus urticae* (two spotted spider mite).

10

15

9. Baumwolle:

20 Pathogene Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); *Anthonomus grandis grandis* (boll weevil); *Aphis gossypii* (cotton aphid); *Pseudatomoscelis seriatus* (cotton flea-hopper); *Trialeurodes abutilonea* (bandedwinged whitefly); *Lygus lineolaris* (tarnished plant bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Frankliniella fusca* (tobacco thrips); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite); *Tetranychus urticae* (two-spotted spider mite);

25

30

10. Reis:

35 Pathogene Insekten / Nematoden: *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Colaspis brunnea* (grape colaspis); *Lissorhoptrus oryzophilus* (rice water weevil); *Sitophilus oryzae* (rice weevil); *Nephotettix nigropictus* (rice leafhopper); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug);

40

11. Raps:

45 Pathogene Insekten / Nematoden: *Brevicoryne brassicae* (cabbage aphid); *Phyllotreta cruciferae* (Flea beetle); *Mamestra*

conjgurata (Bertha armyworm); *Plutella xylostella* (Diamond-back moth); *Delia* ssp. (Root maggots).

"RacB-Protein" meint im Rahmen der Erfindung das RacB-Protein aus
5 Gerste gemäß SEQ ID NO: 2, sowie seine Homologen aus Reis (*Oryza sativa*) gemäß SEQ ID NO: 4 und Mais (*Zea mays*) gemäß SEQ ID NO: 6 als auch funktionelle Äquivalente der vorgenannten.

"Proteinmenge" meint die Menge eines RacB-Polypeptides in
10 einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengenmäßige Verminderung der Menge eines RacB-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren -
15 im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders
20 bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

"Aktivität" meint bevorzugt die GTPase Aktivität eines RacB-Poly-
25 peptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. "Verminderung" der Aktivität meint die Verminderung der Gesamt-Aktivität eines RacB-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren -
30 im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders
35 bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

"Funktion" meint bevorzugt die Substratbindekapazität eines RacB-
40 Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. Als Substrate kommen niedermolekulare Verbindungen wie GTP aber auch die Proteininteraktionspartner eines RacB-Proteins in Frage. "Verminderung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Verminderung der Bindekapazität
45 oder Bindestärke eines RacB-Proteins zu mindestens einem Substrat in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen

Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Unter Verminderung ist auch die Ver-

5
änderung der Substratspezifität zu verstehen, wie sie beispielsweise durch den k_{cat}/K_m -Wert ausgedrückt werden kann. Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20%, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %. Bindepartner für RacB können beispielsweise durch das Hefe-2-Hybridsystem in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge, der Aktivität von

15
GTPasen oder der Substratbindekazität sind dem Fachmann bekannt und vielfach für GTPasen, wie auch für Rac-Proteine aus verschiedenen Gattungen und Arten beschrieben (u.a. Benard V et al. (1999) J Biol Chem 274(19):13198-204; Burstein ES (1998) Oncogene. 17(12):1617-23).

20
"Funktionelle Äquivalente" eines RacB-Proteins meint bevorzugt solche Sequenzen, die von einem RacB-Protein beschrieben durch SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 abgeleitet oder zu diesem homolog sind und im wesentlichen die gleichen Eigenschaften aufweisen.

25
"Im wesentlichen gleiche Eigenschaften" eines funktionellen Äquivalentes meint vor allem die Verleihung eines pathogenresistenten Phänotypes oder die Verleihung oder Steigerung der Pathogenresistenz gegen zumindest ein Pathogen bei Verminderung der Protein-

30
menge, Aktivität oder Funktion des besagten funktionellen RacB Äquivalentes in einer Pflanze bzw. in einem Gewebe, Teil oder Zellen derselben. Ferner ist das Ausbleiben eines spontan-induzierten Zelltodes bei besagter Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion des funktionellen Äquivalentes als

35
wesentliche Eigenschaft zu verstehen.

Dabei kann die Effizienz der Pathogenresistenz sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten bei Verminderung eines der RacB-Proteine gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6

40
abweichen. Bevorzugt sind solche funktionelle Äquivalente, bei denen sich die Effizienz der Pathogenresistenz - gemessen beispielsweise an der Penetrationseffizienz eines Pathogens (Haustoriumbildung) - um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten

45
unter Verminderung eines RacB-Proteins gemäß NO:2, 4 oder 6 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, bei deren Verminderung die Effizienz der Pathogenresistenz quanti-

29

tativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten bei Verminderung eines der RacB-Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 übersteigt.

5

Der Vergleich wird bevorzugt unter analogen Bedingungen durchgeführt. "Analoge Bedingungen" bedeutet, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Kultur- oder Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate, Pathogenkonzentration etc.) zwischen den zu vergleichenden Versuchen identisch gehalten werden und die Ansätze sich allein durch die Sequenz der zu vergleichenden RacB-Polypeptide, ihrem Ursprungsorganismus und gegebenenfalls dem Pathogen unterscheiden. Bei Wahl des Pathogens ist für den Vergleich jeweils das Pathogen zu wählen, das dem jeweils anderen - unter Berücksichtigung der Artspezifität - am nächsten kommt.

"Funktionelle Äquivalente" meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der RacB-Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen, welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten RacB Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise *Arabidopsis thaliana*) können z.B. durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der RacB-Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonde - leicht aufgefunden werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Polypeptides gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 erhält.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 50	Length Weight: 3
Average Match: 10	Average Mismatch: 0

45

- a) Eine G1-Elementes GXXXXGKS/T bevorzugt im N-terminalen Bereich. Ganz besonders bevorzugt ein Element mit der Sequenz GDGAVGKT, am meisten bevorzugt ein Element mit der Sequenz KCVTVGDGAVGKTC.
- 5 b) Eine G2-Effektorregion beinhaltend ein Sequenzmotiv mit PTVFDN, besonders bevorzugt NTFPTDYVPTVFDNFSANVV.
- c) Ein G3-Elemente beinhaltend LWDTAGQ, besonders bevorzugt
10 NLGLWDTAGQEDYN
- d) Ein G4-Elementes TKXD, besonders bevorzugt TKLD, ganz besonders bevorzugt LVGTKLDRDDKQ
- 15 e) Ein G5-Elementes EXS, bevorzugt ECSS, ganz besonders bevorzugt ECSSKTG
- f) Ein C-terminales Isoprenylierungsmotives (CXXX, Hassanain HH et al. (2000) Biochem Biophys Res Commun. 272(3):783-8.),
20 besonders bevorzugt CSIL.

Besonders bevorzugt kommen mindestens 2 oder 3 dieser Motive (a bis f) in einem funktionell äquivalenten RacB-Protein vor, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle Motive a bis f. Weitere RacB typischen Sequenzmotive, insbesondere auch Motive zur Abgrenzung gegen Rac1-Proteine, kann der Fachmann unschwer aus dem Sequenzvergleich der bekannten RacB (bzw. Rac1) Proteine - wie in Fig. 1 dargestellt - ableiten.

30 Beispiele für die in dem erfindungsgemäßen Verfahren zu vermindernenden funktionellen Äquivalente zu den RacB-Proteinen gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*,
35 *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthum*, durch Homologievergleiche aus Datenbanken auffinden.

Auch die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen-Bibliotheken anderer Organismen, bevorzugt von den weiter unten genannten als
40 Wirt zur Transformation geeigneten Pflanzenarten, unter Verwendung der unter SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde, ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß
45 SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp,

am meisten bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

5

Funktionelle Äquivalente umfasst demgemäß DNA Sequenzen, die unter Standardbedingungen mit der durch SEQ ID NO:1, 3 oder 5 beschriebenen RacB Nukleinsäuresequenz, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder teilen der vorgenannten hybridisieren

10 und als vollständige Sequenzen für Proteine kodieren, die die gleichen Eigenschaften, wie die unter SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 beschriebenen Proteine verfügen.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und

15 meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current

20 Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrilles ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von

25 solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0).

Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrilles von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C,

30 bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden.

Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien

35 wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschrille sind infolge gegeben:

40 (1) Hybridisierungsbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

a) 4X SSC bei 65°C,

45 b) 6X SSC bei 45°C,

33

- c) 6X SSC, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA bei 68°C,
- 5 d) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierter, Lachssperma-DNA bei 68°C,
- e) 6X SSC, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Lachssperma-DNA, 50 % Formamid bei 42°C.
- 10 f) 50 % Formamid, 4XSSC bei 42°C, oder
- g) 50 % (vol/vol) Formamid, 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1 % Ficoll, 0,1 % Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5, 750 mM NaCl, 75 mM Natriumcitrate bei
15 42°C, oder
- h) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- i) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach
20 stringente Bedingung).
- (2) Waschschrirte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:
- 25 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0.1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- 30 d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- 35 f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

Funktionelle Äquivalente abgeleitet von einem Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 umfasst insbesondere auch die Proteine mit der SEQ ID NO: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 52, 54, 56, 58,
40 60, 62, 64, 66, 68 oder 70. Insbesondere meint funktionelle Äquivalente Proteine, die durch eine Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69 kodiert werden.

Die Verminderung der Expression eines RacB-Proteins, der RacB-Aktivität oder der RacB-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

- 5 "Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einem RacB Protein, einer RacB Aktivität oder RacB-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität
- 10 eines RacB-Proteins in einer Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen. Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung eines RacB-Proteins bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des RacB-Proteins (d.h.
- 15 fehlende Nachweisbarkeit von RacB-Aktivität bzw. RacB-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des RacB-Proteins). Dabei wird die Expression eines bestimmten RacB-Proteins oder die RacB-Aktivität bzw. RacB-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um
- 20 mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90% vermindert.

Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines RacB-Proteins, der RacB-Aktivität oder RacB-

25 Funktion umfasst. Der Fachmann erkennt, dass eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung stehen, um die Expression eines RacB-Proteins, die RacB-Aktivität oder die RacB-Funktion in gewünschter Weise zu beeinflussen.

- 30 Eine Verminderung der RacB-Aktivität oder der RacB-Funktion wird bevorzugt durch eine verminderte Expression eines endogenen RacB-Proteins erreicht.

Eine Verminderung der RacB-Proteinmenge, RacB-Aktivität oder

35 RacB-Funktion kann unter Verwendung nachfolgender Verfahren realisiert werden:

- a) Einbringung einer doppelsträngigen RacB RNA-Nukleinsäuresequenz (RacB-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 40
- b) Einbringung einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die
- 45 antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein RacB-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein RacB-Gentranskript

35

(also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α -anomere Nukleinsäuresequenzen.

- 5 c) Einbringung einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 10 d) Einbringung von RacB sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 15 e) Einbringung einer Nukleinsäuresequenz kodierend für dominant-negatives RacB Protein oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen RacB -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 20 g) Einbringung von den RacB RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 25 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen RacB-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- 30 i) Einführung von Mutationen in endogenen RacB Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der RacB-Expression, RacB-Aktivität oder RacB-Funktion im Sinne
35 der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des RacB-Proteins, des Transports des RacB-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens,
40 Induktion eines RacB-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz beschrieben:

45

36

- a) Einbringung einer doppelsträngigen RacB RNA-Nukleinsäuresequenz (RacB-dsRNA)

5 Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; 10 WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation¹ 15 gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt 20 wird. Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

25 Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der RacB-Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

30 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Samen) die Verminderung eines RacB bewirken.

35 Das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines RacB Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

- a) einer der beiden RNA Stränge im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil einer RacB-Nukleinsäuresequenz, und 40
- b) der jeweils andere RNA Strang im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil des komplementären Stranges einer RacB Nukleinsäuresequenz. 45

37

In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines RacB Proteins

- 5 a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB Protein, und
- 10 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

15 In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint RacB-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder ein funktionelles Äquivalent derselben gemäß SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69

20 Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der RacB Zielsequenz oder einer funktionell äquivalenten Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben (bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben).

30

35 Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

40

45 Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Speicherprotein Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B. in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

5 "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

10 "Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA transkribiert von einer für ein RacB-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäuresequenz, bevorzugt von einem RacB-Gen. Dabei haben die Fragmente bevorzugt
15 eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen, bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die vollständige transkribierte RNA oder mRNA.
20

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer Pathogenresistenz in Pflanzen.
25

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribonukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside vorliegen. Beispielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie
30 zumindest ein Stickstoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahingehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modifikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung von antisense-RNA beschrieben.
35

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in
40 die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-synthetisch hergestellt werden.

45

39

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

5

Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein, das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird.

10

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

15

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

20

a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

25

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

30

c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

35

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

40

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom

45

einer Pflanze insertiert, um eine dauerhafte Expression der dsRNA zu gewährleisten.

5 Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

10 Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem RacB Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der RacB Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen,
15 wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der RacB Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die RacB Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenzhomologie zwischen den RacB Sequenzen aus Reis,
20 Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der offenbarten RacB Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.
25

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen RacB-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten möglich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten RacB-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer RacB-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von RacB-Proteinen in anderen verwandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von RacB-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.
30
35

40 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Polyadenylierungssignal) gebracht werden. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine
45

41

Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

5 Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden. Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakterio-
phagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-
Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu
in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016;
10 US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214,
US 5,804,693). Eine chemisch oder enzymatisch in vitro
syntetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle,
Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispiels-
weise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese,
15 Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder
teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar
in die Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär
(z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

20 Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem
Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA
realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren sind
weiter unten beschrieben.

b) Einbringung einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenz

25 Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch
Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die
"antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen -
beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:
30 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett
268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridi-
siert bzw. bindet mit der zellulären mRNA und/oder genom-
ischen DNA kodierend für das zu supprimierende RacB-Ziel-
protein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation
35 des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf
konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex
oder - im Fall von genomischer DNA - durch Bindung des anti-
sense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA
durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der
40 DNA-Helix entstehen.

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung
eines RacB-Proteins kann unter Verwendung der für dieses
Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise
45 der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5, oder
der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein funktionelles Äqui-
valent derselben, beispielsweise einer Sequenz gemäß SEQ ID

42

NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69, nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden. Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosine, N⁶-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N⁶-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

40

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines RacB-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines RacB-Gens (z.B. einem RacB Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des RacB-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind be-

45

schrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

5 In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. 10 (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

15

c) Einbringung einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym.

20

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334: 585-591.

35

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. RacB - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257).

40

In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können

45

zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden RacB Proteins aufweisen (siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

15

- d) Einbringung einer RacB sense-Nukleinsäuresequenz zur Induktion eines Kosuppression

20

25

30

Die Expression einer RacB Nukleinsäuresequenz in sense-Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise representieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

35

40

Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5, oder der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein funktionelles Äquivalent derselben, beispielsweise einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69.

45

- e) Einbringung von Nukleinsäuresequenzen kodierend für ein dominant-negatives RacB Protein

Die Funktion oder Aktivität eines RacB Protein kann effektiv auch durch Expression einer dominant-negativen Variante dieses RacB-Proteins realisiert werden. Verfahren zur Verminderung der Funktion bzw. Aktivität eines Protein mittels Koexpression seiner dominant-negativen Form sind dem Fachmann bekannt (Lagna G und Hemmati-Brivanlou A (1998) Current Topics in Developmental Biology 36:75-98; Perlmutter RM und Alberola-Ila J (1996) Current Opinion in Immunology 8(2):285-90; Sheppard D (1994) American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology. 11(1):1-6; Herskowitz I (1987) Nature 329(6136):219-22).

Eine dominant-negative RacB Variante kann beispielsweise durch Veränderung der Aminosäure Threonin an Position 20 bei den RacB Proteinen aus Mais, Reis oder Gerste in bevorzugt Asparagin-Säure realisiert werden. Das bevorzugt zu mutierende Threonin oder eventuell auch Serin (analog zu dem Threonin an Position 20 in RacB aus Mais, Reis oder Gerste) in RacB Homologen aus anderen Arten kann beispielsweise mittels Computer-unterstütztem Vergleich ("Alignment") ermittelt werden. Diese Mutationen zum Erreichen einer dominant-negativen RacB Variante werden bevorzugt auf der Ebene der Nukleinsäuresequenz kodierend für RacB Proteine durchgeführt. Eine entsprechende Mutation kann beispielsweise durch PCR vermittelte in vitro Mutagenese unter Verwendung entsprechender Oligonukleotidprimer, durch welche die gewünschte Mutation eingeführt wird, realisiert werden. Dazu werden dem Fachmann geläufige Verfahren verwendet. Beispielsweise kann zu diesem Zweck der "LA PCR in vitro Mutagenesis Kit" (Takara Shuzo, Kyoto) verwendet werden. Ein Verfahren zur Herstellung einer dominant-negativen Variante des RacB-Proteins aus Mais ist auch in WO 00/15815 (Beispiel 4, S. 69) beschrieben.

Besonders bevorzugt sind die unter den SEQ ID NO: 7, 8 und 9 beschriebenen dominant-negativen Varianten der RacB-Proteine aus Gerste, Reis oder Mais.

- f) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen RacB Gene, -RNAs oder Proteine

Eine Verminderung einer RacB Genexpression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese

Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen RacB Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem 275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines RacB-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder - ausgehend von einer RacB cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich. Die dazu erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann geläufig.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das RacB Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürlí RW (1999) *Current Opinion in Chemical Biology* 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) *Gene Expr* 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Genesequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) *Bioorg Med Chem.* 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) *Chem Biol.* 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) *J Mol Biol.* 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) *Org Lett* 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) *Bioorg Med Chem* 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) *J Biol Chem.* 275(32):24246-54).

20 g) Einbringung von den RacB RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die RacB Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen RacB RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) *Plant J.* 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediiert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) *Plant J* 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) *Plant Mol Biol* 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) *Plant Cell* 10(6): 937-46).

40 h) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen RacB-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.

45 Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter RacB-Aktivität verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen RacB Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert

wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und vermindert wird.

Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird der Wirtsorganismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus E. coli und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378)

- i) Einführung von Mutationen in endogene RacB Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

- Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der RacB-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene RacB Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeroplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).
- 5
- 10
- 15 Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der RacB-Funktion oder Aktivität mit dominant-negativen RacB-Varianten sind besonders vor-
- 20 teilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Ent-
- 25 sprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAI-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den RacB-Proteinen aus Mais, Reis und Gerste kann auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Protein bei Pflanzen
- 30 geschlossen werden. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der RacB-Nukleinsäuresequenzen aus Gerste, Mais oder Reis auch die Expression von homologen RacB-Proteinen in anderen Arten effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Struktur-
- 35 erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines RacB-Proteins aus Reis, Mais oder Gerste die Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.
- 40
- Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines RacB-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-RacB"-Verbindungen zusammengefasst.
- 45 Der Begriff "anti-RacB"-Verbindung schließt explizit die in

den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

"Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die
5 dazu geeignet eine "anti-RacB"-Verbindung, direkt oder indirekt,
in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ
oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte
und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann
zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-
10 RacB"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber
auch zu einer dauerhaften (stabilen).

Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze
kann die "anti-RacB"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben
15 (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes RacB Gen). Die
Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA
(zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und
Translation in ein Protein (zum Beispiel bei Bindungsfaktoren)
ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende
20 "anti-RacB"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion,
Transduktion oder Transformation.

25 "Anti-RacB" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch
rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression (d.h.
Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer RacB-
dsRNA oder einer RacB "antisense"-RNA - bevorzugt in einer
Pflanze oder einem Teil, Gewebe, Organ oder Samen derselben -
30 bedingen.

In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül,
dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine
"anti-RacB"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller
35 Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontrollelement
(beispielsweise einem Promotor), das eine Expression in einem
Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet. Soll das
Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die
"anti-RacB"-Verbindung (beispielsweise die RacB dsRNA) dort in
40 plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische
Kontrollelemente (beispielsweise Promotoren) bevorzugt. Die
"anti-RacB"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen
oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden
(wie in Beispiel 6 und 7 beschrieben). In diesem sind all
45 prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente

(beispielsweise Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

- Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel
- 5 die sequentielle Anordnung eines Promotors mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-RacB"-Verbindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der
 - 10 Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten
 - 15 Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist
 - 20 dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.
- 25 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor
- 30 Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In:
 - 35 Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymchnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusions-
 - 40 proteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen ein Promoter - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - hinter ein endogenes RacB-Gen platziert wird, und durch Expression einer antisense RacB-RNA die
5 erfundungsgemäße Verminderung eines RacB-Proteins bewirkt wird. Analog kann auch eine "anti-RacB" Verbindung (zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz kodierend für eines RacB dsRNA oder eine RacB antisense RNA) derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen
10 zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen
15 steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

20 a) Konstitutive Promotoren

Bevorzugt sind Vektoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). "Konstitutiver" Promotor meint solche
25 Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor,
30 der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221-228)
35 oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase
40 aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen

53

- Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) *Gene* 170:197-200).
- 5
- b) Gewebespezifische Promotoren
- 10 Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.
- Samenspezifische Promotoren
- 15 wie zum Beispiel der Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) *Plant Cell* 1(9):839-53), des 2S Albumingens (Joseffson LG et al. (1987) *J Biol Chem* 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225(3):459-67), des
- 20 Napin Gens (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) *L Planta* 199:515-519), des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388) oder der Legumin B4-Promotor (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) *Mol Gen Genet* 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) *Plant Journal* 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) *Biotechnology (NY)* 13(10):1090f), der Oleosin-Promoter aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Bce4-Promoter aus *Brassica* (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der
- 25 Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter
- 30 des lpt2 oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).
- 40 Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- 45 Blattspezifische Promotoren wie Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco

54

(Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind Epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

Blütenspezifische Promotoren
wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

Antheren-spezifische Promotoren
wie den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

15 c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

35 Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gst1* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP-A 0 375 091).

45

55

Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *Fis1*-Promotor (WO 96/34949), den *Vst1*-Promotor (Schubert et al. (1997) *Plant Mol Biol* 34:417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpene-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).

5

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245-254; Uknes, et al. (1992) *Plant Cell* 4:645-656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111-116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335-342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325-342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2:93-98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955-966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191-201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961-968(1989).

10

15

20

25

Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des *pinII* Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425-449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494-498), des *wun1* und *wun2*-Gens (US 5,428,148), des *win1*- und *win2*-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200-208), des Systemin (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570-1573), des *WIP1*-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73-76), des *MPI*-Gens (Corderok et al. (1994) *Plant J* 6(2):141-150) und dergleichen.

30

35

40

45

Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt die Region -364 bis -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) *Plant Mol Biol* 30, 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten β -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt auf. Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Abundanz durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen-induziert, sind die "acidic PR-5"-(*aPR5*)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) *Plant Physiol* 114:79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) *Plant Mol Biol* 16:329-331). *aPR5*-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um

eine erhöhte pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14, 749-762; WO 00/01830; 5 WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684;

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

10

Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise frucht-reifungs-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum

15

Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare und epidermis-

20

spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbar und epidermis-spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die

25

eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

30 Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss

35

auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-strom-

40

aufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz den Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar

45

jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

- Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.
- 10 Weitere vorteilhafte Kontrollsequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFa , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.
- 15 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.
- 20 Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist
- 25 gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-
- 30 Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebespezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).
- Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere
- 35 sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische
- 40 Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.
- Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind
- 45 pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase)

des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator.

5

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der

- 10 natürliche Promoter eines bestimmten Gens gegen einen Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus
- 15 (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten

- 20 Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber
- 25 nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum
- 30 Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und
- 35 Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase),
- 40 das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht,
- 45 das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycinphosphotransferase (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen

- 5 Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphospho-
transferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin
vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine
Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht (z.B.
mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra
Mutation).
- 10 b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine
kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine
Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressions-
ortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders
bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Gros-
kreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green
15 fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al.(1995) Plant Journal
8(5):777-784; Haseloff et al.(1997) Proc Natl Acad Sci USA
94(6):2122-2127; Reichel et al.(1996) Proc Natl Acad Sci
USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep
16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol
20 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques.
23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase
(Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992)
Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher
et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268),
25 die β -Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das
die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in
pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der
Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfstoffe oder
chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In:
30 Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts,
18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz be-
sonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al.,
EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
- 35 c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungs-
gemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel
E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin
of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori
(Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual,
2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
40 Harbor, NY, 1989).
- d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzen-
transformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die
rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.
45

Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen, der den erfolgreich rekombinierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid

5 (zum Beispiel ein Herbizid), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84).

10

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von

15 Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden

20 selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

25 Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobacterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom

30 ermöglichen.

Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle

35 eingebracht wird.

Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology

40 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA

45 kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur

Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilanz et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112;
5 Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhaase et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al. (1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology
10 (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Trans-
15 formation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplasten-
transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte
20 "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Trans-
25 formation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind be-
ispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225:
30 1229f).

Werden *Agrobacterien* verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischen-
vektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen
35 binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

40 Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in *Agrobacterium* replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken
45 T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in *Agrobacterium* transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Das Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion

- transformierter Agrobakteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblisserdam, Chapter V; An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).
- 15 Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).
- 20 Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus und Zelltyp eignen.
- Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.
- 30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, das eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide (wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin etc.) zu verleihen vermag (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbizides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, das Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von trans-

63

formierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

Dem Fachmann sind auch Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992) Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533 verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Verfahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten, Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Stressresistenz oder eine andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM, Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51 Spec No; Seite 487-96.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft das RacB Protein aus Gerste gemäß SEQ ID NO: 2, sowie dominant-negative Variante desselben, beispielsweise beschrieben durch SEQ ID NO: 7.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für das RacB-Protein aus Gerste, bevorzugt die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, die dazu komplementär

64

täre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft das Polypeptide
5 kodierend für funktionelle Äquivalente des RacB Protein aus Gerste gemäß SEQ ID NO: 35, 37 oder 39.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen kodierend für funktionelle Äquivalente des RacB Protein
10 aus Gerste, bevorzugt die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 34, 36 oder 38, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleitete Sequenzen.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen umfassen. In den erfindungsgemäßen transgenen Expressionskassetten ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-Protein aus Gerste mit mindestens einem genetischen
20 Kontrollelement nach obiger Definition derart verknüpft, das die Expression (Transkription und ggf. Translation) in einem beliebigen Organismus - bevorzugt in Pflanzen - realisiert werden kann. Dazu geeignete genetische Kontrollelemente sind oben beschrieben. Die transgenen Expressionskassetten können auch
25 weitere Funktionselementen gemäß obiger Definition enthalten. Die insertierte Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Protein aus Gerste kann in sense- oder antisense-Orientierung in die Expressionskassette insertiert sein, und damit zu Expression von sense- oder antisense-RNA führen. Erfindungsgemäß sind auch
30 transgene Vektoren, die die transgenen Expressionskassetten beinhalten.

"Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend
35 besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandgekommene Konstruktionen, in denen sich entweder

- 40 a) die RacB Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der RacB Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- 45 c) (a) und (b)

65

- sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer
- 5 Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise
- 10 erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise
- 15 die natürlich vorkommende Kombination des RacB-Promotors mit dem entsprechenden RacB-Gen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben
- 20 (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

- Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungs-
- 25 gemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.- oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und
- 30 pflanzliche Organismen.

Bevorzugt sind

- a) Pilze, wie *Aspergillus*, *Eremothecium*, *Trichoderma*, *Ashbya*,
 35 *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* oder weitere in Indian Chem Eng. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyii*.
- 40 b) Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178),
- c) Pflanzen gemäß der obengenannten Definition für "Pflanzen"

- d) Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind nicht-humane Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie Drosophila S2 und Spodoptera Sf9 oder Sf21 Zellen,
- e) prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien wie Acetobacter, Gluconobacter, Corynebacterium, Brevibacterium, Bacillus, Clostridium, Cyanobacter, Escherichia (vor allem Escherichia coli), Serratia, Staphylococcus, Aerobacter, Alcaligenes, Penicillium oder Klebsiella genannt.
- 15 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. Insbesondere als Wirtsorganismen bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, auf die der erfindungsgemäße Verfahren zum Erzielen einer Pathogenresistenz gemäß oben genannten Kriterien angewendet werden kann. Ganz besonders bevorzugt sind monokotyle Pflanzen wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, als diktyledone Kulturpflanzen wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis oder Zucchini.
- 35 Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Organismen realisiert werden.
- 40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein
5 oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien
10 wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen
15 bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

20

25

30

35

40

45

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 5
2. SEQ ID NO: 2 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
3. SEQ ID NO: 3 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Reis (*Oryza sativa*).
- 10
4. SEQ ID NO: 4 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Reis (*Oryza sativa*).
- 15
5. SEQ ID NO: 5 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Mais (*Zea mays*).
6. SEQ ID NO: 6 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB Protein aus Mais (*Zea mays*).
- 20
7. SEQ ID NO: 7 : Aminosäuresequenz kodierend für eine dominant-negative Variante des RacB Proteins aus (*Hordeum vulgare*).
- 25
8. SEQ ID NO: 8 : Aminosäuresequenz kodierend für eine dominant-negative Variante des RacB Proteins aus Reis (*Oryza sativa*).
9. SEQ ID NO: 9 : Aminosäuresequenz kodierend für eine dominant-negative Variante des RacB Proteins aus Mais (*Zea mays*).
- 30
10. SEQ ID NO: 10 Oligonukleotidprimer ONP-1
5'-GGATCCGATGAGCGGTCCAGGTT-3'
- 35
11. SEQ ID NO: 11 Oligonukleotidprimer ONP-2
5'-GTCGACCTTCGCCCTTGTCTTTGTC-3'
12. SEQ ID NO: 12 RACE-RacB Primer
5'-gtgggcacatagtcggtggggaaggt-3'
- 40
13. SEQ ID NO: 13 GeneRacer™ 5'-Primer:
5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3
- 45
14. SEQ ID NO: 14 GeneRacer™ 5'-Nested Primer:
5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3

15. SEQ ID NO: 15 RacB-sense Primer
5'-gttcatcaagtgcgtcaccgtg-3'
- 5 16. SEQ ID NO: 16 RacB-antisense Primer
5'-ttagcttcctcagttcttcctg-3'
17. SEQ ID NO: 17 BAS-sense Primer
5'-cgcgccgcagccgagtagc-3'
- 10 18. SEQ ID NO: 18 BAS-antisense Primer
5'-gtcacaaaaacacatgtaacc-3'
19. SEQ ID NO: 19 OXLP-sense Primer
5'-ggccgacatgcattcaccag-3'
- 15 20. SEQ ID NO: 20 OXLP-antisense Primer
5'-catctgatattgctgggtctg-3'
21. SEQ ID NO: 21 UBI-sense Primer
20 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3'
22. SEQ ID NO: 22 UBI-antisense Primer
5'-ttcgcgataggtaaaagagca-3'
- 25 23. SEQ ID NO: 23 M13-fwd Primer
5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3'
24. SEQ ID NO: 24 M13-Rev Primer
5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
- 30 25. SEQ ID NO: 25 HvRop6 LEFT PRIMER
5'-GTGGAGGCGGGCGAGA-3'
26. SEQ ID NO: 26 HvRop6 RIGHT PRIMER
35 5'-CCATGCTTCATCTCCATAGTCA-3'
27. SEQ ID NO: 27 HvRacD LEFT PRIMER
5'-ggatccCGATTCCATCAGGAAAGCAT-3'
- 40 28. SEQ ID NO: 28 HvRacD RIGHT PRIMER
5'-gtcgcacGCGAGACACTGCAAAACAAA-3'
29. SEQ ID NO: 29 HvRop4 LEFT PRIMER
45 5'-GGATCcttctcgtccatttagccggc-3'

70

30. SEQ ID NO: 30 HvRop4 RIGHT PRIMER
5'-GTCGACtgatcacttgaagcatgccag-3'
- 5 31. SEQ ID NO: 31 RacB5'BamHI Primer
5'-GGATCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3'
32. SEQ ID NO: 32 RacB3'SalI Primer
5'-GTCGACCTTCGCCCTTGTCTTTGTC-3'
- 10 33. SEQ ID NO: 33 V15 Mutagenese Primer
5'-ACCGTGGGGGACGTCGCCGTCGGCAAGAC-3'
34. SEQ ID NO: 34 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRop6 aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 15 35. SEQ ID NO: 35 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRop6 aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
36. SEQ ID NO: 36 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRacD aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 20 37. SEQ ID NO: 37 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRacD aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 25 38. SEQ ID NO: 38 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRop4 aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
39. SEQ ID NO: 39 : Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog HvRop4 aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
- 30 40. SEQ ID NO: 40 : Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog *Zea mays* ROP6 (GenBank Acc.-No.:
AJ278665)
- 35 41. SEQ ID NO: 41 Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog *Zea mays* ROP6
42. SEQ ID NO: 42 Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-
Homolog *Oryza sativa* subsp. *japonica* RACDP
(RACD) (GenBank Acc.-No.: AF218381)
- 40 43. SEQ ID NO: 43 Aminosequenz kodierend für das RacB-
Homolog *Oryza sativa* subsp. *japonica* RACDP

71

44. SEQ ID NO: 44 Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-Homolog *Oryza sativa* ROP4 (GenBank Acc.-No.: AF380335)
- 5 45. SEQ ID NO: 45 Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-Homolog *Oryza sativa* ROP4
46. SEQ ID NO: 46 Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-Homolog *Zea mays* RACA (GenBank Acc.-No.: AF126052)
- 10
47. SEQ ID NO: 47 Aminosäuresequenz kodierend für das RacB-Homolog *Zea mays* RACA
- 15 48. SEQ ID NO: 48 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Hordeum vulgare* (GenBank Acc.-No.: BM816965)
49. SEQ ID NO: 49 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At3g51300)
- 20
50. SEQ ID NO: 50 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At3g51300)
- 25 51. SEQ ID NO: 51 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At2g17800)
52. SEQ ID NO: 52 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At2g17800)
- 30
53. SEQ ID NO: 53 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g35950)
54. SEQ ID NO: 54 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g35950)
- 35
55. SEQ ID NO: 55 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At1g75840)
- 40 56. SEQ ID NO: 56 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At1g75840)
57. SEQ ID NO: 57 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g35020)
- 45

58. SEQ ID NO: 58 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g35020)
- 5 59. SEQ ID NO: 59 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At1g20090)
60. SEQ ID NO: 60 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At1g20090)
- 10 61. SEQ ID NO: 61 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At5g45970)
62. SEQ ID NO: 62 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At5g45970)
- 15 63. SEQ ID NO: 63 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At3g48040)
64. SEQ ID NO: 64 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At3g48040)
- 20 65. SEQ ID NO: 65 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At5g62880)
- 25 66. SEQ ID NO: 66 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At5g62880)
67. SEQ ID NO: 67 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g28950)
- 30 68. SEQ ID NO: 68 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At4g28950)
69. SEQ ID NO: 79 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At2g44690)
- 35 70. SEQ ID NO: 70 Aminosäuresequenz kodierend für ein RacB-Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (At2g44690)
- 40 71. SEQ ID NO: 71 Oligonukleotidprimer Fra 186
5'-ATGAGCGCGTCCAGGTTTCATA-3'
72. SEQ ID NO: 72 Oligonukleotidprimer Fra 187
5'-ATCAAACACGCCCTTCACGTT-3'
- 45

73. SEQ ID NO: 73 Transgener Expressionsvektor
pSUN3NIT_AtRacB_s für Expression von
Arbidopsis thaliana RacB in sense
Orientierung
- 5
74. SEQ ID NO: 74 Transgener Expressionsvektor
pSUN3NIT_AtRacB_as für Expression von
Arbidopsis thaliana RacB in antisense
Orientierung
- 10
75. SEQ ID NO: 75 Transgener Expressionsvektor
pSUN3NIT_HvRacB_s für Expression eines
Gerste RacB Fragmentes in sense
Orientierung
- 15
76. SEQ ID NO: 76 Transgener Expressionsvektor
pSUN3NIT_HvRacB_as für Expression eines
Gerste RacB Fragmentes in antisense
Orientierung
- 20

Abbildungen

1. Fig. 1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von Gerste RacB,
25 Reis RacB, Mais RacB, sowie humanen Rac1 und Rac2 Proteinen.

Grauhinterlegte Bereiche zeigen die Position des G1-Elementes
(GXXXXGKS/T; Aminosäure 13 bis 20), der G2-Effektorregion
(Aminosäure 29 bis 45), des G3-Elementes (LWDTAGQ; Aminosäure
30 58 bis 64), des G4-Elementes (TKXD; Aminosäure 118 bis 121),
des G5 Elementes (EXS) und des C-terminalen Isoprenylierungs-
motives (CXXX, Hassanain HH et al. (2000) Biochem Biophys Res
Commun. 272(3):783-8.) an. Bindestriche zeigen Sequenzlücken
an. Sterne stellen identische Aminosäuren in allen Homologen
35 dar. Aminosäuren die zwischen Gerste einerseits und Mais und
Reis andererseits differieren sind weiß auf schwarzem Grund
dargestellt. Die Position die zum Erhalt einer dominant-
negativen RacB-Variante vorteilhaft verändert wird, ist
oberhalb der Sequenz mit einem schwarzen Dreieck markiert.

40

2. Fig. 2: Expression von RacB in epidermalen Gewebe

RT-PCR von RNA aus den Gerste-Linien Pallas und BCPMla12
(P10) 24 h nach Inokulation ("hai" hours after inoculation")
45 mit BghA6. Zur Extraktion der RNA wurden abaxial epidermale
Streifen (E, aus inokulierten Stellen der Blätter) vom Meso-
phyll und der adaxialen Epidermis (M) abgetrennt. Ubiquitin 1

(Ubi) fungierte als Marker für eine gewebsunspezifische Expression, OXLP als Positivkontrolle für die Genexpression in der Epidermis, Bas als Positivkontrolle für die Genexpression in Mesophyllzellen. RT-PCR wurde mit 25 Amplifikationszyklen wie unten beschrieben ausgeführt. RT-PCR-Produkte wurden im Gel denaturiert, geblotted und mittels antisense RNA-Sonden unter stringenten Bedingungen detektiert.

3. Fig. 3: *RacB* wird konstitutiv in verschiedenen resistenten Gerste-Linien exprimiert.

RNA wurde aus der Sorte Ingrid (*Mlo*, *Ror1*, *Bgh* suszeptibel), BCIngrid-*mlo5* (*mlo5*, *Ror1*, *Bgh* resistent) und A89 (*mlo5*, *ror1*, *BghA6* moderat suszeptibel) unmittelbar vor Inokulation (0 Ø) bzw. 8, 15, 24 h nach Inokulation mit *Bgh*, sowie 24 h danach aus nicht-inokulierten Kontrollpflanzen (24 Ø) isoliert. Ubiquitin 1 (*Ubi*) wurde als Marker für eine konstitutive Expression verwendet, *OXLP* als Positivkontrolle für eine *Bgh*-induzierte Genexpression in der epidermalen Schicht. Die *OXLP*-Expression wurde per Northern-Blot nachgewiesen. Die RT-PCR für *RacB* und *Ubi* wurde wie beschrieben mit 25 Amplifikationszyklen durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden im Gel denaturiert, geblotted und mittels antisense RNA-Proben unter stringenten Bedingungen detektiert.

4. Fig. 4: "RNA Interference" mit *RacB*-dsRNA vermindert die Penetrationseffizienz des Echten Gerstenmehltau *BghA6* in Gerste.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) wurde in sechs individuellen Experimenten bei Inokulation mit *Bgh* aus Gerste cv Pallas bestimmt. Die RPE errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei *RacB*-dsRNA transformierten Zellen und der Penetrationseffizienz bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 57 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei RacB-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\% \text{-RPE} = 100 * (\text{RPE} - 1)$$

Die schwarzen Säulen stellen die %-RPE bei Evaluierung von mindesten 100 Interaktionsstellen für jeweils ein unabhängiges Experiment dar. Die weiße Säule stellt die durch-

schnittliche %-RPE der Experimente mit der RacB-dsRNA dar ("RACB-dsRNA"). Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

5 "Control" stellt die parallelen Experimente mit einer Kontroll-dsRNA.

10 Die %-RPE war in Zellen, die mit RacB-dsRNA beschossen wurden, deutlich vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA (*TR*: humaner Thyroidrezeptor-dsRNA) bombardiert wurden.

5. Fig 5: Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Funktion von RacB

15 Die %-RPE wurde in 5 unabhängigen Experimenten durch Inokulation von Gerste cv Pallas, Ingrid oder A89 mit BghA6 untersucht, die zuvor mit RacB-dsRNA transformiert wurden.

20 Die %-RPE ist in Pallas (*Mlo Ror1*, Schwarze Balken, Experiment 1 und 2) oder Ingrid (*Mlo Ror1*, Schwarze Balken, Experiment 3, 4 und 5) deutlich reduziert. %-RPE der suszeptiblen Mutante A89 (*mlo5 ror1*, schwarze Balken, Experimente 1 bis 5) war jedoch nicht vermindert. Weiße Balken geben den Mittelwert an, Fehlerbalken den Standardfehler.

25 6. Fig.6: Überexpression einer konstitutiv aktiven RacB-Mutante in Gerste der Sorte Pallas

30 Eine konstitutiv aktive Mutante von Gerste RACB (Austausch G->V an Position 15; RacB-V15) wurde unter Verwendung des Expressionskonstruktes pGY-RacBV15 in 5 unabhängigen Experimenten transient in Gerste der Sorte Pallas überexprimiert. Im Vergleich wurden entsprechende Versuche mit dem Vektor alleine ohne RacB-Insert (pGY) durchgeführt.

35 Die Expression einer konstituiven RacB-Mutante bewirkt eine signifikant erhöhte Anfälligkeit gegen Pathogenbefall mit Gerstenmehltau im Vergleich zu den Kontrollen (Fig. 6-A). Die relative Suszeptibilität gegenüber dem Pilzpathogen ist in allen Fällen erhöht (Fig. 6-B). Auch diese Ergebnisse belegen die Schlüsselfunktion von *racB* bei der Pathogenabwehr.

40

7. Fig. 7: Plasmidkarte zu Expressionsvektor pGY-1 (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 647-54; Shinshi H et al. (1990) Plant Mol Biol 14:357-368).

45

Beispiele

Allgemeine Methoden:

- 5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor
- 10 Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

20

Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

- Die Gerstensorte Ingrid stammt von James McKey, University of Uppsala, Schweden. Die Sorte Pallas und die rückgekreuzte
- 25 Linie BCIngrid-*mlo5* wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Kopenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907). Die Linie A89 wurde durch Paul Schulze-Lefert (Max-Planck-Institut
- 30 für Züchtungsforschung, Köln, Deutschland) bereitgestellt.

- Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ
- 35 P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16 bis 18°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8-stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis 8 Tage
- 40 lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

- Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente wurden
- 45 die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C, nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16stündi-

gen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidien/mm².

15 Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit ca. 100 Konidien/mm² (soweit nicht anders angegeben).

20 Beispiel 2: RNA-Extraktion

Gesamt RNA wurde aus 8 bis 10 primären Blattsegmenten (Länge 5 cm) mittels "RNA Extraction Buffer" (AGS, Heidelberg, Germany) extrahiert.

25

Dazu wurden die zentrale Primärblattsegment von 5 cm Länge geerntet und in flüssigem Stickstoff in Mörsern homogenisiert. Das Homogenisat wurde bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert.

30 Aus dem tiefgefrorenen Blattmaterial wurde mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits (AGS, Heidelberg) Gesamt-RNA extrahiert. Dazu wurden 200 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in einem Mikrozentrifugenröhrchen (2 mL) mit 1,7 mL RNA-Extraktionspuffer (AGS) überschichtet und sofort gut durchmischt. Nach Zugabe von 200 µL

35 Chloroform wurde erneut gut gemischt und bei Raumtemperatur 45 min auf einem Horizontalschüttler bei 200 U/min geschüttelt. Anschließend wurde zur Phasentrennung 15 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und die untere verworfen. Die wässrige

40 Phase wurde erneut mit 900 µL Chloroform gereinigt, indem 3 mal für 10 sec homogenisiert und erneut zentrifugiert (s.o.) und abgehoben wurde. Zur Fällung der RNA wurde dann 850 µL 2-Propanol hinzugegeben, homogenisiert und für 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurde für 20 min zentrifugiert (s.o),

45 vorsichtig der Überstand dekantiert, 2 mL 70 %iges Ethanol (-20°C) hinzu pipettiert, durchmischt und erneut 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wiederum dekantiert und das Pelet vor-

sichtig mit einer Pipette von Flüssigkeitsresten befreit, bevor es an einem Reinluftarbeitsplatz im Reinluftstrom getrocknet wurde. Danach wurde die RNA in 50 µL DEPC-Wasser auf Eis gelöst, durchmischt und 5 min zentrifugiert (s.o.). 40 µl des Überstandes
5 wurden als RNA-Lösung in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei -70°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:99 (v/v) mit destilliertem Wasser verdünnt
10 und die Extinktion (Photometer DU 7400, Beckman) bei 260 nm gemessen ($E_{260 \text{ nm}} = 1$ bei 40 µg RNA/mL). Gemäß der errechneten RNA-Gehalte wurden die Konzentrationen der RNA-Lösungen anschließend mit DEPC-Wasser auf 1 µg/µL angeglichen und im Agarosegel überprüft.

15

Zur Überprüfung der RNA-Konzentrationen im horizontalen Agarosegel (1 % Agarose in 1 x MOPS-Puffer mit 0,2 µg/mL Ethidiumbromid) wurde 1 µL RNA-Lösung mit 1 µL 10 x MOPS, 1 µL Farbmarker und 7 µL DEPC-Wasser versetzt, nach Ihrer Größe bei 120 V Spannung im Gel
20 in 1 x MOPS-Laufpuffer über 1,5 h aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Eventuelle Konzentrationsunterschiede der RNA-Extrakte wurden mit DEPC-Wasser ausgeglichen und die Anpassung erneut im Gel überprüft.

25 Beispiel 3: Klonierung der RacB cDNA Sequenz aus Gerste

Die zur Isolation der HvRacB cDNA, ihrer Klonierung, Sequenzierung und Herstellung von Sonden benötigten cDNA
30 Fragmente wurden mittel RT-PCR unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland oder Qiagen, Hilden, Deutschland) erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gerste-Sämlingen als Matrize verwendet. Die RNA wurde aus Pallas 3, 5 und 7 Tage nach Keimung isoliert. Darüberhinaus wurde RNA
35 aus Pallas und den rückgekreuzten Linien mit *mlo5*, *Mlg* oder *Mla12* 1, 2 und 5 Tage nach Inokulation mit *BghA6* am 7 Tag nach Keimung isoliert. Für die RT-PCR werden die folgenden Primer verwendet:

ONP-1 5'-GGATCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 10) und

40 ONP-2 5'-GTCGACCTTCGCCCTTGTCTTTGTC-3' (SEQ ID NO: 11)

Für die Reaktion (25 µL-Ansatz) wurden je 1000 ng Gesamt-RNA, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 mM OPN-1 und OPN-2 Primer, 10 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Enzymmix in 1x RT-Puffer (*one step RT-PCR Kit*,
45 Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100TM Modell 96V; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

- 1 Zyklus mit 30 min bei 50°C
 - 5 1 Zyklus mit 150 sec bei 94°C
 - 30 Zyklen mit 94°C für 45 sec, 55°C für 1 min und 72°C für 2 min
 - 1 Zyklus mit 72°C für 7 min
- 10 Die PCR Produkt wurde mittels 2% w/v Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein RT-PCR Produkt von insgesamt 642 bp erhalten, dass sich aus der RacB-Sequenz (SEQ ID NO: 1) und terminalen Sequenzen kodierend für Restriktionsendonukleasaschnittstellen zusammensetzt. Das Fragment kodiert für ein offnes Leseraster von 591 bp kodierend für ein Polypeptid aus 197 Aminosäuren. Die entsprechende cDNA wurde aus einem Agarosegel isoliert und in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) mittels T-Überhang-Ligation kloniert. Die cDNAs wurden ausgehend von der Plasmid-DNA unter Verwendung des "Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham, Freiburg, Deutschland) sequenziert.

- Da als Ausgangsprimer OPN-1 ein Primer von der RacB-Sequenz aus Reis abgeleitet worden ist (GenBank Acc.-No.: AF250327) wurde
- 25 dieser Bereich (d.h. das 5'-Ende) der RacB-cDNA aus Gerste nochmals mittel der RACE-Technologie unter Verwendung des "GeneRacer Kit" (INVITROGENE Life Technologies) verifiziert. Dazu wurden 100 ng poly-A mRNA, 1 µL 10x CIP-Puffer, 10 Units RNase-Inhibitor, 10 Units CIP ("calf intestinal phosphatase") und DEPC-behandeltes
- 30 Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µL für 1 h bei 50°C behandelt. Zur Präzipitation der RNA wurden weitere 90 µL DEPC-Wasser und 100 µL Phenol:chloroform hinzugegeben und intensiv für ca. 30 sec durchmischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 20.000 g wurde die obere Phase mit 2 µl 10 mg/ml Mussel Glycogen, 10 µl 3 M
- 35 Natriumacetat (pH 5,2) in einem neuen Mikroreaktionsgefäß versetzt. 220 µl 95 % Ethanol wurden hinzugegeben und die Mischung auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation für 20 min bei 20.000 g und 4°C präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, 500 µl 75 % Ethanol hinzugegeben, kurz
- 40 gevortext und wieder für 2 min zentrifugiert (20000 g). Der Überstand wurde wiederum verworfen, das Präzipitat für 2 min bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und anschließend in 6 µl DEPC-Wasser suspendiert. mRNA CAP-Strukturen wurden durch Zugabe von 1 µl 10xTAP Puffer, 10 Units RNasin und 1 Unit TAP ("tobacco
- 45 acid pyrophosphatase") entfernt. Die Mischung wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die RNA wurde wiederum- wie oben beschrieben - präzipitiert und in ein Reak-

tionsgefäß mit 0,25 µg GeneRacer Oligonukleotid-Primer überführt. Der Oligonukleotid-Primer wurde in der RNA-Lösung resuspendiert, die Mischung für 5 min bei 70°C inkubiert und dann auf Eis gekühlt. 1 µl 10xLigasepuffer, 10 mM ATP, 1 Unit RNAsin und 5 Units
5 T4 RNA-Ligase wurden hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde wiederum - wie oben beschrieben - präzipitiert und in 13 µl DEPC-Wasser resuspendiert. 10 pMol oligo-dT Primer wurden zu der RNA gegeben, sofort auf 70°C erhitzt und wieder auf Eis gekühlt. 1 µL jeder dNTP-Lösung (25 mM), 2 µL
10 10xRT buffer, 5u (1 µl) AMV reverse Transkriptase und 20 Units RNAsin wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei 42°C und anschließend für 15 min bei 85°C inkubiert. Die so hergestellte Erststrang-cDNA wurde bei -20°C gelagert.

15 Zur Amplifikation der 5'-cDNA-Endes wurde nachfolgender Primer verwendet:

RACE-RacB Primer:

5'-gtggggcacatagtcggtggggaaggt-3' (SEQ ID NO: 12)

20

GeneRacer™ 5'-Primer:

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3 (SEQ ID NO: 13)

GeneRacer™ 5'-Nested Primer:

25 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3 (SEQ ID NO: 14)

Der Ansatz (Gesamtvolumen 25 µL) hatte nachfolgende Zusammensetzung:

30 1 µl Primer RACE-RacB (5 pmol/µL),
 0,5 µl GeneRacer 5'-Primer (10 pmol/µL)
 2,5 µl 10xPuffer Qiagen,
 2,5 µl dNTPs (2mM)
 0,5 µl cDNA
35 0,2 µl QiagenTAG (5 u/microL)
 17,8 µl H2O

Die PCR-Bedingungen lauteten:

40 94°C 5 min Denaturierung

5 Zyklen mit 70°C 30 sek (Annealing),
 72°C 1 min (Extension),
 94°C 30 sek (Denaturierung)

45

81

- 5 Zyklen mit 68°C 30 sek (Annealing),
72°C 1 min (Extension),
94°C 30 sek (Denaturierung)
- 5 28 Zyklen mit 66°C 30 sek (Annealing),
72°C 1 min (Extension),
94°C 30 sek (Denaturierung)
- 72°C 10 min abschließende Extension
- 10 4°C Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

Die PCR ergab ein Produkt von ca. 400 bp Produkt. Davon ausgehend wurde eine "nested"-PCR mit dem RacB-spezifischen Oligonukleotidprimer und dem "GeneRacer Nested 5'-Primer" durch-

15 geführt:

- 94°C 5 min Denaturierung
- 20 30 Zyklen mit 64°C 30 sek (Annealing),
72°C 1 min (Extension),
94°C 30 sek (Denaturierung)
- 72°C 10 min abschließende Extension
- 4°C Kühlung bis zur Weiterverarbei
- 25

Das erhaltene PCR-Produkt wurde über ein Gel isoliert, aus dem Gel extrahiert und in pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation kloniert und sequenziert. Die Sequenz im Bereich des Primers OPN-1 war absolut identisch zu der von racB aus Reis, so dass mittels Primers

30 keine Punktmutationen erzeugt wurden. Die unter SEQ ID NO: 1 wiedergegebene Sequenz ist also identisch mit der RacB-Sequenz aus Gerste.

Beispiel 4: Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion
(RT-PCR)

- Für die semi-quantitative RT-PCR wurde der "OneStep RT-PCR Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Dabei wurde RNA (herstellung s.o.) zuerst in cDNA übersetzt (Reverse Transkription) und in
- 40 einer anschließenden PCR-Reaktion mit spezifischen Primern die gesuchte cDNA amplifiziert. Um die Ausgangsmenge an Matrizen RNA abzuschätzen, wurde die Amplifikation während der exponentiellen Phase unterbrochen um Unterschiede in der Ziel-RNA wiederzu-
- 45 spiegeln. Die PCR Produkte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt, denaturiert, auf Nylonmembranen geblottet und mit spezifischen, nicht-radioaktiv-markierten Sonden unter stringenten

OXLP-sense 5'-ggccgacatgcattcaccag-3' (SEQ ID NO: 19)
 OXLP-antisense 5'-catctgatattgctgggtctg-3' (SEQ ID NO: 20)

- d) Amplifikation eines 513 bp *Ubi* cDNA Fragment (GenBank
 5 accession M60175)

UBI-sense 5'-ccaagatgcagatcttcgtga-3' (SEQ ID NO: 21)
 UBI-antisense 5'-ttcgcgataggtaaaagagca-3' (SEQ ID NO: 22)

- 10 Alle erhaltenen Fragmente wurden zudem in den Vektor pGEM-T mittels T-Überhang-Ligation ligiert und dienten als Ausgangs-plasmide für die Herstellung von Sonden (z.B. für Northern-Blot) bzw. dsRNA. Die einzelnen Konstrukte trugen die Bezeichnung pGEMT-RAC1, pGEMT-BAS, pGEMT-OXLP, pGEMT-UBI.

- 15
 Beispiel 5: Northern-Blot Analyse

- Zur Vorbereitung des Northern-Blottings wurde die RNA im Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Ein
 20 Teil RNA-Lösung (entsprechend 5 µg RNA) wurde dazu mit gleichem Volumen Probenpuffer (mit Ethidiumbromid) gemischt, 5 min bei 94°C denaturiert, 5 min auf Eis gestellt, kurz zentrifugiert und aufs Gel aufgetragen. Das 1 x MOPS-Gel (1,5 % Agarose, *ultra pure*) enthielt 5 Volumenprozent konzentrierte Formaldehydlösung
 25 (36,5 % [v/v]). Die RNA wurde bei 100 V 2 h lang aufgetrennt und anschließend geblottet.

- Das Northern-Blotting erfolgte als aufwärtsgerichteter RNA-Transfer im Kapillarstrom. Das Gel wurde dazu zunächst 30 min
 30 in 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,5) geschwenkt und zurechtgeschnitten. Ein Whatmanpapier wurde so vorbereitet, dass es auf einer horizontalen Platte auflag und auf 2 Seiten in eine Wanne mit 25 mM Natriumhydrogen/dihydrogen-phosphat-Puffer (pH 6,5) ragte. Auf dieses Papier wurde das Gel
 35 aufgelegt, wobei nicht bedeckte Teile des Whatmanpapiers mit einer Plastikfolie abgedeckt wurden. Das Gel wurde dann mit einer positiv geladenen Nylonmembran (Boehringer-Mannheim) luftblasen-frei abgedeckt, wonach die Membran wiederum mit saugfähigem Papier in mehreren Lagen etwa 5 cm hoch bedeckt wurde. Das saugfähige
 40 Papier wurde noch mit einer Glasplatte und einem 100 g Gewicht beschwert. Das Blotting erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die Membran wurde kurz in A. bidest. geschwenkt und zur RNA-Fixierung mit einer Lichtenergie von 125 mJ im *Crosslinker* (Biorad) UV-Licht bestrahlt. Die Überprüfung des gleichmäßigen
 45 RNA-Transfers auf die Membran erfolgte auf der UV-Lichtbank.

Zur Detektion von Gersten mRNA wurden 10 µg Gesamt-RNA aus jeder Probe über ein Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarttransfer auf eine positiv-geladene Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit dem DIG-Systeme.

5

Herstellung der Sonden: Zur Hybridisierung mit den zu detektierenden mRNAs wurden mit Digoxigenin oder Fluoreszein markierte RNA Sonden hergestellt. Diese wurden durch *in vitro* Transkription eines PCR-Produktes mittels einer T7 oder SP6 RNA Polymerase mit markierten UTPs erstellt. Als Vorlage für die PCR gestützte Amplifikation dienten die oben beschriebenen Plasmidvektoren pGEMT-RAC1, pGEMT-BAS, pGEMT-OXLP, pGEMT-UBI.

Je nach Orientierung des Inserts wurden unterschiedliche RNA-Polymerasen zur Herstellung des antisense-Stranges herangezogen. Die T7-RNA-Polymerase wurde für pGEMT-BAS und pGEMT-OXLP verwendet, die SP6-RNA-Polymerase für pGEMT-RAC1 und pGEMT-UBI.

Das Insert der einzelnen Vektor wurde über PCR mit flankierenden Standard-Primern (M13 fwd und rev) amplifiziert. Die Reaktion lief dabei mit folgenden Endkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 50 µL PCR-Puffer (Silverstar) ab:

M13-fwd: 5'-GTAAAACGACGGCCAGTG-3' (SEQ ID NO: 23)
 25 M13-Rev: 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID NO: 24)

10 % Dimethylsulfoxid (v/v)
 je 2 ng/µL Primer (M13 forward und reversed)
 1,5 mM MgCl₂,
 30 0,2 mM dNTPs,
 4 Units Taq-Polymerase (Silverstar),
 2 ng/µL Plasmid-DNA.

Die Amplifikation verlief in einem *Thermocycler* (Perkin-Elmer 35 2400) temperaturgesteuert:

	94°C	3 min Denaturierung
40	30 Zyklen mit	94°C 30 sek (Denaturierung) 58°C 30 sek (Annealing), 72°C 1,2 min (Extension),
	72°C	5 min abschließende Extension
	4°C	Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

45

Der Erfolg der Reaktion wurde im 1 %igen Agarosegel überprüft. Die Produkte wurden anschließend mit einem "High Pure PCR-Product Purification Kit" (Boehringer-Mannheim) aufgereinigt. Man erhielt etwa 40 µL Säuleneluat, das erneut im Gel überprüft und bei -20°C
5 gelagert wurde.

Die RNA Polymerisation, die Hybridisierung und die Immuno-
detektion wurden weitestgehend nach Angaben des Herstellers
des Kits zur nicht-radioaktiven RNA-Detektion durchgeführt (*DIG*
10 *System User's Guide, DIG-Luminescence detection Kit*, Boehringer-
Mannheim, Kogel et al. (1994) *Plant Physiol* 106:1264-1277). 4 µl
gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 2 µL Transskriptionspuffer,
2 µl NTP-Markierungsmix, 2 µl-NTP-Mix und 10 µl DEPC-Wasser ver-
setzt. Anschließend wurden 2 µL der T7-RNA-Polymeraselösung zu
15 pipettiert. Die Reaktion wurde dann 2 h bei 37°C durchgeführt und
anschließend mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Die RNA-Sonde
wurde im Ethidiumbromidgel detektiert und bei -20°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Hybridisierung wurden die Membranen zunächst
20 1 h bei 68°C in 2 x SSC (*Salt, Sodiumcitrate*), 0,1 % SDS-Puffer
(*Sodiumdodecylsulfate*) geschwenkt, wobei der Puffer 2 bis 3 mal
erneuert wurde. Die Membranen wurden anschließend an die Innen-
wand auf 68°C vorgeheizter Hybridisierungsröhren angelegt und
30 min mit 10 mL *Dig-Easy*-Hybridisierungspuffer im vorgeheizten
25 Hybridisierungssofen inkubiert. Währenddessen wurden 10 µL Sonden-
lösung in 80 µL Hybridisierungspuffer bei 94°C für 5 min denatu-
riert, anschließend auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Zur
Hybridisierung wurde die Sonde dann in 10 mL 68°C warmem Hybridi-
sierungspuffer überführt, und der Puffer in der Hybridisierungs-
30 röhre durch diesen Sondenpuffer ersetzt. Die Hybridisierung er-
folgte dann ebenfalls bei 68°C über Nacht.

Vor Immundetektion von RNA-RNA Hybriden wurden die Blots strin-
gent zweimal für jeweils 20 min in 0.1 % (w/v) SDS, 0.1 x SSC bei
35 68°C gewaschen.

Zur Immunodetektion wurden die Blots zunächst zweimal für 5 min
bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS geschwenkt. Anschließend erfolgten
2 stringente Waschschrte bei 68°C in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für
40 je 15 min. Die Lösung wurde anschließend durch Waschpuffer ohne
Tween ersetzt. Es wurde 1 min geschüttelt und die Lösung durch
Blockingreagenz ausgetauscht. Nach weiteren 30 min Schütteln
wurden 10 µL Anti-Fluoreszein-Antikörperlösung hinzugefügt und
weitere 60 min geschüttelt. Es folgten zwei 15 minütige Wasch-
45 schritte in Waschpuffer mit Tween. Die Membran wurde anschließend
2 min in Substratpuffer äquibriert und nach Abtropfen auf eine
Kopierfolie überführt. Auf der "RNA-Seite" der Membran wurde dann

ein Gemisch aus 20 µL CDP-StarTM und 2 mL Substratpuffer gleichmäßig verteilt. Im Anschluss wurde die Membran mit einer zweiten Kopierfolie abgedeckt und an den Rändern mit Hitze luftblasenfrei und wasserdicht verschweißt. Die Membran wurde dann in einer

5 Dunkelkammer für 10 min mit einem Roentgenfilm bedeckt und dieser anschließend entwickelt. Je nach Stärke der Lumineszenzreaktion wurde die Belichtungszeit variiert.

Wenn nicht extra gekennzeichnet waren die Lösungen im Liefer-
10 umfang des *Kits* enthalten (*DIG-Luminescence detection Kit*, Boehringer-Mannheim). Alle anderen wurden aus folgenden Stammlösungen durch Verdünnung mit autoklaviertem, destilliertem Wasser hergestellt. Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders spezifiziert, mit DEPC (wie DEPC-Wasser) angesetzt und
15 anschließend autoklaviert.

- DEPC-Wasser: Destilliertes Wasser wird über Nacht bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC, 0,1 %, w/v) behandelt und anschließend autoklaviert

20

- 10 x MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS (Morpholin-3-propansulfonsäure), 0,05 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA, pH mit 10 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt

25 - 20 x SSC (Natriumchlorid-Natriumzitat, *Salt-Sodiumcitrate*): 3 M NaClO, 0.3 M triNatriumcitrat x 2 H₂O, pH mit 4 M HCl auf pH 7,0 eingestellt.

- 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, *Sodiumdodecylsulfate*) Natriumdodecylsulfat (w/v), ohne DEPC
30

- RNA-Probenpuffer: 760 µL Formamid, 260 µL Formaldehyd, 100 µL Ethidiumbromid (10 mg/mL), 80 µL Glycerol, 80 µL Bromphenolblau (gesättigt), 160 µL 10 x MOPS, 100 µL Wasser.
35

- 10 x Waschpuffer ohne Tween: 1,0 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl; ohne DEPC, mit NaOH (fest, ca. 77 g) und 10 M NaOH auf pH 7,5 einstellen.

40 - Waschpuffer mit Tween: aus Waschpuffer ohne Tween mit Tween (0,3 %, v/v)

- 10 x Blockingreagenz: 50 g Blockingpulver (Boehringer-Mannheim) in 500 mL Waschpuffer ohne Tween suspendieren.
45

- Substratpuffer: 100 mM Tris (Trishydroxymethylamino-methan), 150 mM NaCl mit 4 M HCl auf pH 9,5 einstellen.
- 10 x Farbmaler: 50 % Glycerol (v/v), 1,0 mM EDTA pH 8,0,
- 5 0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v).

Beispiel 6: In vitro Synthese der RacB dsRNA

Alle Plasmide (pGEMT-RAC1, pGEMT-BAS, pGEMT-OXLP, pGEMT-UBI) die für die in vitro Transkription eingesetzt wurden beinhalten den T7 und SP6 Promotor (pGEM-T, Promega) an den jeweiligen Enden der insertierten Nukleinsäuresequenz, was die Synthese von sense- bzw. antisense RNA ermöglicht. Die Plasmide können mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert werden, um eine korrekte Transkription der insertierten Nukleinsäuresequenz zu gewährleisten und ein Durchlesen in vektorielle Sequenzen zu verhindern.

Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA jeweils mit an der distal vom Promoter gelegenen Seite des Inserts geschnitten. Die geschnittenen Plasmide werden in 200 µl Wasser mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß (RNase frei) transferiert und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. 180 µl der Plasmid-Lösung wurden mit 420 µl Ethanol versetzt, auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 g und -4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE Puffer aufgenommen.

Zur Herstellung der RacB-dsRNA wurde das Plasmid pGEMT-Rac1 mit SpeI verdaut und sense-RNA mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Ferner wurde pGEMT-Rac1 mit NcoI verdaut und antisense-RNA mit der SP6-RNA-Polymerase transkribiert. RNA Polymerasen wurden von Roche Molecular Biology, Mannheim, Deutschland bezogen.

Jeder Transkriptionsansatz beinhaltet in einem Volumen of 40 µl:

- 2 µl linearisierte Plasmid DNA (1 µg)
- 2 µl NTP's (25 mM) (1,25 mM von jedem NTP)
- 40 4 µl 10xReaktionspuffer (Roche Molecular Biology),
- 1 µl RNasin RNasin (27 Units; Roche Molecular Biology),
- 2 µl RNA Polymerase (40 Units)
- 29 µl DEPC-Wasser

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze aus der Transkription des "sense"- bzw. "antisense"-Stranges gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und an-

schließlich durch Abkühlung über 30 min auf eine Endtemperatur von 37°C miteinander hybridisiert ("annealing"). Alternativ kann nach der Denaturierung das Gemisch aus sense- und antisense-Strang auch für 30 min bei -20°C gekühlt werden. Das Proteinpräzipitat, das sich während Denaturierung und Hybridisierung bildet wurde durch kurze Zentrifugation bei 20.800 g abgetrennt und der Überstand direkt zur Beschichtung von Wolframpartikeln verwendet (s. unten). Zur Analyse wurden jeweils 1 µl jeden RNA-Stranges und der dsRNA auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Eine erfolgreiche Hybridisierung zeigte sich, durch eine Bandenverschiebung zu höherem Molekulargewicht im Vergleich zu den Einzelsträngen.

4 µl der dsRNA wurden Ethanol-präzipitiert (durch Zugabe von 6 µl Wasser, 1 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 25 µl Ethanol, sowie Zentrifugation für mindestens 5 min bei 20000 g und 4°C) und in 500 µl Wasser resuspendiert. Das Absorptionsspektrum zwischen 230 und 300 nm wurde gemessen, bzw. die Absorption bei 280 und 260 nm bestimmt, um die Reinheit und die Konzentration der dsRNA zu bestimmen. In der Regel wurden 80 bis 100 µg dsRNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 1,80 bis 1,95 erhalten. Ein Verdau mit DNase I kann optional durchgeführt werden, beeinflusst jedoch nachfolgende Ergebnisse nicht wesentlich.

Als Kontroll-dsRNA fungierte die dsRNA des humanen Thyroindrezeptors (Ausgangsvektor pT7betaSal (Norman C et al. (1988) Cell 55(6):989-1003) zur Verfügung gestellt von Dr. Baniahmad, Institut für Genetik, Gießen, Deutschland; die Sequenz des Insert ist beschrieben unter der GenBank Acc.-No.: NM_000461). Für die Herstellung der sense-RNA wurde das Plasmid mit PvuII, für die antisense-RNA mit HindIII verdaut und die RNA dann mit T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Die einzelnen Verfahrensschritte zur Herstellung der Kontroll-dsRNA werden analog den oben für die RacB-dsRNA beschriebenen durchgeführt.

35 Beispiel 7: Transiente Transformation, RNAi und Evaluation der Pilzpathogenentwicklung

Gerste cv Pallas Blattsegmente wurden mit einer RacB-dsRNA zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert. Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung auf eben diesen Zellen beurteilt. In allen sechs Experimenten führte die Bombardierung von Gerste cv Pallas mit RacB-dsRNA zu einer verminderten Anzahl von erfolg-

reich durch Bgh penetrierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer fremden Kontroll-dsRNA (humaner Thyroidhormonrezeptor dsRNA, TR) bombardiert wurden. Der resistenzinduzierende Effekt der *RacB*-dsRNA bedingte eine durchschnittliche Verminderung der Penetrationseffizienz durch Bgh um 44 % (Fig. 4).

Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt das bereits für die biolistische Einführung von dsRNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1 µm (Partikeldichte 25 mg/ml) wurden mit dsRNA (Herstellung siehe oben) zusammen mit Plasmid-DNA des Vektors *pGFP* (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors) als Transformationsmarker beschichtet. Dazu wurden pro Schuss die nachfolgender Mengen an dsRNA bzw. Reporterplasmid zur Beschichtung verwendet: 1 µg *pGFP* und 2 µg dsRNA. Dopplesträngige RNA wurde mittels Verschmelzens von "sense" und "antisense"-RNA *in vitro* synthetisiert (s.o.).

Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50 %igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert. Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuss 1 µg Plasmid, 2 µg dsRNA (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilter-

90

- halter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die
- 5 Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer
- 10 P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer Schweizer P, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmons wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger
- 15 Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6) inokuliert und für weitere 36 bis 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.
- 20 Blattsegmente wurden mit den beschichteten Partikeln unter Verwendung einer "particle inflow gun" bombardiert. Pro Schuss wurden 312 µg Wolframpartikel appliziert. 4 h nach der Bombardierung wurde Inokulation mit *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau (Rasse A6) inokuliert und nach weiteren 40 h bezüglich
- 25 der Infektionsanzeichen ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen mit reifem Haustorium und einer Sekundärhyph ("secondary elongating hyphae"), wurde mittels Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 100 Conidia/mm²
- 30 ergibt eine Angriffsfrequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten
- 35 Zellen konnten unterschieden werden:
- 1 Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.
- 40
2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.
- 45
3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

91

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von *Bgh* wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,1 % Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In *RacB*-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei transformierten Zellen (Transformation mit *RacB*- oder Kontroll-dsRNA) und der Penetrationseffizienz bei untransformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 57 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

$$20 \quad RPE = \frac{[PE \text{ bei } RacB\text{-dsRNA transformierten Zellen}]}{[PE \text{ bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\%RPE = 100 * (RPE-1)$$

25 Der %-RPE-Wert (Abweichung von der durchschnittlichen Penetrationseffizienz der Kontrolle) dient der Bestimmung der Suszeptibilität von Zellen, die mit *RacB*-dsRNA transfiziert sind (Fig. 4).

30 Bei der Kontroll-dsRNA wurde bei fünf unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen der Transfektion mit der Kontroll dsRNA und Wasser bezüglich der Penetrationseffizienz von *Bgh* beobachtet.

Ferner wurde die Abweichung der PE in verschiedenen Genotypen untersucht. Um die funktionelle Verbindung zum *Mlo*-Gen zu demonstrieren wurde ein *mlo5*-Genotyp (A89, *mlo5 ror1*, Hintergrund: Ingrid) eingesetzt, der nur moderat anfällig gegen einen *Bgh* Befall aufgrund einer Mutation des *Ror1*-Gen ist (Freialdenhoven A et al. (1996) Plant Cell 8:5-14). In diesem doppelt-mutantem Genotyp wurde die Effizienz von *RacB*-dsRNA im Vergleich zu einem Wildtyp *Mlo*-Genotyp untersucht. In fünf unabhängigen Experimenten konnte jedoch keine Verhinderung der Haustorium-Ausbildung in A89 beobachtet werden. Wohingegen die PE bei parallelen Experimenten mit Pallas und Ingrid deutlich reduziert war (Fig. 5). Interessanterweise war der Effekt der *RacB*-dsRNA in Pallas ausgeprägter

als in Ingrid (Fig. 5, Experiments 1 und 2 im Vergleich zu 3, 4 und 5).

Um einen Einfluss auf der dsRNA auf die Transformationsrate oder Überlebensrate der angegriffenen Zellen auszuschließen, wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen Kontroll- und *RacB*-dsRNA Experimenten verglichen (Tabelle 7). Die *RacB*-dsRNA hatten keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl- oder die Anzahl der angegriffenen GFP-exprimierenden Zellen.

10

Tabelle 7: Transformationsraten an Gerstenblättern nach Bombardierung mit dsRNA

Linie	Anzahl der GFP exprimierenden Zellen pro Schuss ^a				n ^c
	Gesamt (Kontroll- dsRNA)	Angegriffen (Kontroll- dsRNA)	Gesamt (<i>RacB</i> -dsRNA)	Angegriffen (<i>RacB</i> -dsRNA)	
Pallas (<i>Mlo Ror1</i>)	34.3±4.6	16.0±2.2	33.9±4.8	15.5±1.4	6 (21)
Ingrid (<i>Mlo Ror1</i>)	51.0±8.9	27.6±8.7	49.9±5.6	31.5±7.8	3 (11)
A89 (<i>mlo5 ror1</i>)	34.4±5.4	18.1±4.0	34.1±5.5	16.7±3.8	5 (22)

a: 4 Blätter wurden pro Schuss bombardiert.

25 Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler

c: Anzahl der unabhängigen Versuche (Schüsse n jeweils für Kontroll- und *RacB*-dsRNA).

Beispiel 8: Konstitutiv aktive Mutante von RACB

30

Zur Positiv-Identifizierung von RACB als Suszeptibilitätsfaktor wurde eine putativ konstitutiv aktive Mutante von Gerste RACB erstellt (Austausch G->V an Position 15; *RacB*-V15) und in Gerste der Sorte Pallas überexprimiert. Zunächst wurde RACB full-length über RT-PCR dargestellt. Dazu wurden nachfolgende Oligonukleotid-primere eingesetzt:

35

RacB5'BamHI : 5'-GGATCCGATGAGCGCGTCCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 31)

40

RacB3'SalI : 5'-GTCGACCTTCGCCCTTGTTCTTTGTC-3' (SEQ ID NO: 32)

Die cDNA wurde in pGEM-T kloniert und anschließend über die Primerschnittstellen ausgeschnitten und in pGY-1 (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12: 647-54; Fig. 7) über BamHI / SalI Schnittstellen kloniert. Das Konstrukt trägt die Bezeichnung pGY1-RacB.

45

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für die konstitutiv aktive RacB-Mutante RACB-V15 wurde hergestellt mit dem "Transformer@Site-Directed Mutagenesis Kit" (Clontech, Heidelberg) nach Anleitung des Herstellers. Als Ausgangsvektor wurde pGY1-RacB
 5 eingesetzt. Als Mutagenese-Primer wurde nachfolgendes Oligonukleotid verwendet:

V15 : 5'-ACCGTGGGGGACGTCGCCGTCGGCAAGAC-3' (SEQ ID NO: 33)

- 10 RACB-V15 wurde dann in 5 unabhängigen Experimenten transient in Gerste der Sorte Pallas unter Kontrolle des 35S CamV Promotors überexprimiert. Die Experimente wurden wie in Schultheiss et al. (Schultheiss H et al. (2002) Plant Physiol 128:1447-1454) beschrieben durchgeführt, nur wurde nach dem Partikelbeschuss 24
 15 statt 4 h vor der Inokulation gewartet. Das coating der Partikel lief wie in Schweizer et al. (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) beschrieben.

- Die Expression einer konstitutiven RacB-Mutante bewirkt eine sig-
 20 nifikant erhöhte Anfälligkeit gegen Pathogenbefall mit Gerstenmehltau im Vergleich zu den Kontrollen. Auch diese Ergebnisse belegen die Schlüsselfunktion von RacB bei der Pathogenabwehr. Die RACB-V15 Effekte (s.Fig 6-A/B) sind im t-test signifikant, wenn man einen zweiseitigen gepaarten Test macht. Die relative Suszep-
 25 tibilität gegenüber dem Pilzpathogen ist in allen Fällen erhöht (Fig. 6-B).

Beispiel 9: Weitere HvRac-Homologe

- 30 Alle Volllänge-Sequenzen wurden mit spezifischen Primern aus RNA Isoliert und in pGEM-T kloniert und sequenziert (Hückelhoven et al. (2001) Plant Mol Biol; Schultheiss et al. (2002) Plant Physiol 128:1447-1454). Die Sequenzen sind RacB z.T. sehr ähnlich.

- 35 a) HvRop6:

LEFT PRIMER 5'-GTGGAGGCGCGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 25)
 RIGHT PRIMER 5'-CCATGCTTCATCTCCATAGTCA-3' (SEQ ID NO: 26)

- 40 b) HvRacD:

LEFT PRIMER 5'-ggatccCGATTCCATCAGGAAAGCAT-3' (SEQ ID NO: 27)
 RIGHT PRIMER 5'-gtcgacGCGAGACACTGCAAAACAAA-3' (SEQ ID NO: 28)

- 45 c) HvRop4:

LEFT PRIMER 5'-GGATCCTtctcgtccatntagccggc-3' (SEQ ID NO: 29)

RIGHT PRIMER 5'-GTCGACTgatcacttgaagcatgccag-3' (SEQ ID NO: 30)

Beispiel 10: Herstellung von Sense- und Antisense-Konstrukten mit dem Gen *AtRacB* zur Expression in *Arabidopsis thaliana*

5

Ein Fragment eines *RacB*-Homologs aus *Arabidopsis* (MIPS-Code: AT4g35950; SEQ ID NO: 53; infolge *AtRacB*) wird via PCR aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bibliothek isoliert. Die verwendeten Primersequenzen lauten:

10

Fra 186: 5'-ATGAGCGCGTCCAGGTTTCATA-3' (SEQ ID NO: 71)

Fra 187: 5'-ATCAAACACGCCCTTCACGTT-3' (SEQ ID NO: 72)

15 Die Amplifikation verläuft in einem Thermocycler T3 der Firma Biometra temperaturgesteuert:

35 Zyklen mit 1 min 95°C, 0,5 min 59°C und 3 min 72°C.
Abschließende Extension für 5 min bei 72°C.

20

Die PCR-Produkte wird in den Vektor pCR2.1 (gemäß *pCR Script Cloning Kit*, Firma Stratagene, Heidelberg) nach Herstellerangaben kloniert. Über das Restriktionsenzym EcoRI (Firma Roche, Mannheim) wird ein Fragment aus dem Vektorkonstrukt geschnitten. Das

25 Fragment läßt sich über eine Gelelektrophorese mit anschließender Aufreinigung über Anionenaustauschersäulen (QIAex Purification Kit, Fa. Qiagen, Hilden) isolieren. Entsprechend wird der binäre Vektor pSUN3-Nit über die Enzyme XmaI und EcoRI aufgeschnitten und einer Reinigung mittels Gelelektrophorese mit anschließender

30 Elution über Anionenaustauschersäulen (QIAex Purification Kit, Fa. Qiagen, Hilden) unterzogen.

Da für die Klonierung Insert und Vektor mit 5'-überhängenden Enden glatte Enden ("blunt ends") generiert werden müssen, wird so-

35 wohl das eluierte *AtRacB*-Fragment als auch das eluierte pSUN3-Nit-Fragment mit 2 µl dNTP-Mix I (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Firma Pharmacia, Freiburg) und 1,6 µl Klenow-Fragment (Fa. USB/ Amersham, Braunschweig, 2 U/µl) zum Auffüllen des Überhanges behandelt und 30 min bei 37°C inkubiert. Um eine Religation

40 zu verhindern, werden die Vektoren zuerst über eine QIAquick Spin Column (Firma Qiagen, Hilden) gereinigt, mit CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Fa. GibcoBRL, Eggenstein, 1 U/µl) behandelt und abschließend über ein 0,8%-iges Agarosegel aufgereinigt.

45 Für den folgenden Ligationsansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl wird zu den 10 µl geschnittener DNA noch 34 µl H₂O, 5 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 Ligase (Firma Roche, Mannheim) gegeben.

Dieser Ansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wird die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert. An die Ligation schließt sich wieder eine Fällung mit 0,1 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol an. Nach Zentrifugation (30 min, 5 15000 g, 4°C) wird das Pellet in 70% Ethanol getrocknet und in 10 µl H₂O resuspendiert. 2 µl dieses Pellets werden durch Elektroporation (*E. coli*-Pulser, Firma Bio-Rad) in *Escherichia coli*-Bakterien Stamm DH5α transformiert. Die mit der DNA behandelten Bakterien werden auf LB-Platten plattiert, die das Antibiotikum Ampicillin (50 mg/l) enthalten. Nach einer Inkubation über 16 h bei 37°C werden von den gewachsenen Kolonien Bakterien abgestrichen und in jeweils Reagenzgläser mit 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37°C werden die dicht gewachsenen Kulturen zentrifugiert. Aus den Bakterienpellets wird 15 mittels QIAprep DNA-Minipräparationskit (Firma Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben Plasmid-DNA isoliert und analytischen Verdauungen mit verschiedenen Enzymkombinationen unterzogen. Durch diese Kontrollverdauungen lassen sich Konstrukte isolieren, bei denen das Gen AtRacB in sense-Orientierung bzw. antisense-Orientierung hinter den in Pflanzen konstitutiv aktiven des Nitrilase-1 (*nit1*) 20 Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200) kloniert vorliegt. Diese Konstrukte werden mit pSUN3NIT_AtRacB_s (SEQ ID NO: 73) und pSUN3NIT_atRacB_as (SEQ ID NO: 74) bezeichnet und für 25 die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet. Die Konstrukte beinhalten die vollständige Sequenz von AtRacB, so dass der Expressionsvektor pSUN3NIT_HvRacB_s, der das Fragment in sense-Orientierung enthält, befähigt ist ein funktionelles AtRacB-Protein zu exprimieren. Der Vektor dient primär als Negativkontrolle und ergibt in den meisten Fällen eine verminderte Pathogenresistenz, in einigen Fällen (s.u.) jedoch auch eine Erhöhung der Pathogenresistenz vermutlich über einen Cosuppressionseffekt.

35 Beispiel 11: Herstellung von Sense- und Antisense-Konstrukten mit dem Gen *HvRacB* zur Expression in *Arabidopsis thaliana*

Von dem Gen *HvRacB* sollen verschiedene nicht-funktionelle Fragmente zur Expression in *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt werden. Dazu wird das Plasmid, welches das *HvRacB*-Gen subkloniert in den 40 bakteriellen Vektor pGEM-T enthielt mit den Enzymkombinationen BamHI / HindIII (Firma Roche, Mannheim) verdaut. Durch eine Behandlung mit der Klenow-Polymerase in Anwesenheit eines Gemischs von Nukleotiden (s.o.) werden überhängende 5'-Einzelstränge aufgefüllt. Das entstehende *HvRacB*-Fragment mit den auf diese Weise 45 geglätteten Enden wird direkt in einen pSUN3NIT-Vektor kloniert, der in seiner Multiple Cloning Site mit den Enzymen BglII und SpeI (Firma Roche, Mannheim) geöffnet wird und dessen 5'-überhän-

- gende Enden mittels Behandlung mit Klenow-Polymerase (wie oben beschrieben) aufgefüllt werden. Für die Ligationsansätze jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl werden zu den 10 µl geschnittener DNA noch 34 µl H₂O, 5 µl Ligationspuffer und 1 µl T4 Ligase (Firma
- 5 Roche, Mannheim) gegeben. Dieser Ansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wird die Ligase bei 65°C für 10 min inaktiviert. An die Ligation schließt sich wieder eine Fällung mit 0,1 Volumen Natriumacetat (pH5,2) und 2,5 Volumen Ethanol an. Nach Zentrifugation (30 min, 15000 g, 4°C) wird das Pellet in 70%
- 10 Ethanol getrocknet und in 10 µl H₂O resuspendiert. 2 µl dieses Pellets werden durch Elektroporation (*E. coli*-Pulser, Firma Bio-Rad) in *Escherichia coli*-Bakterien Stamm DH5α transformiert. Die mit der DNA behandelten Bakterien werden auf LB-Platten plattiert, die das Antibiotikum Ampicillin (50 mg/l) enthalten. Nach
- 15 einer Inkubation über 16 h bei 37°C werden von den gewachsenen Kolonien Bakterien abgestrichen und in jeweils Reagenzgläser mit 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium überführt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37°C werden die dicht gewachsenen Kulturen zentrifugiert. Aus den Bakterienpellets wird mittels QIAprep DNA-Minipräparationskit
- 20 (Firma Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben Plasmid-DNA isoliert und analytischen Verdaus mit verschiedenen Enzymkombinationen unterzogen. Durch diese Kontrollverdaus lassen sich Konstrukte identifizieren, bei denen das entsprechende Genkonstrukt in sense bzw. in antisense-Orientierung hinter den in Pflanzen
- 25 konstitutiv aktiven Promotor des Nitrilase-1 Gens aus *A.thaliana* (s.o.) kloniert vorliegt. Diese Konstrukte werden mit pSUN3NIT_HvRacB_s (SEQ ID NO: 75) und pSUN3NIT_HvRacB_as (SEQ ID NO: 76) bezeichnet und für die Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet. Die Konstrukte beinhalten ein verkürztes
- 30 Fragment von hvRacB, so dass auch der Expressionsvektor pSUN3NIT_HvRacB_s, der das Fragment in sense-Orientierung enthält, nicht befähigt ist ein funktionelles HvRacB-Protein zu exprimieren. Der Vektor dient primär als Negativkontrolle, ergibt aber auch in einigen Fällen (s.u.) eine Erhöhung der Pathogenre-
- 35 sistenz vermutlich über einen Cosuppressionseffekt.

Beispiel 12: Transformation von *Arabidopsis thaliana* und Analyse der Pilzresistenz

- 40 Wildtyp *A.thaliana* Pflanzen (Columbia) werden mit dem *Agrabacterium tumefaciens* Stamm (EHA105) auf Grundlage einer modifizierten Methode (Steve Clough und Andrew Bent (1998) Plant J 16(6):735-743) der Vacuum Infiltrationsmethode nach Bechtold et al. (Bechtold N et al. (1993) CR Acad Sci Paris, Life Sciences 316:1194-
- 45 1199).

Die verwendeten *A.tumefaciens* Zellen werden im Vorfeld mit den Plasmiden pSUN3NIT_AtRacB_s (SEQ ID NO: 73), pSUN3NIT_atRacB_as (SEQ ID NO: 74), pSUN3NIT_HvRacB_s (SEQ ID NO: 75) und pSUN3NIT_HvRacB_as (SEQ ID NO: 76) transformiert.

5

Samen der Agrobacterium-transformierten Primärtransformanden werden auf Grundlage der Kanamycin-Resistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge werden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

10

Zur Analyse der Resistenz der transgene *Arabidopsis*-Pflanzen gegenüber pathogene Pilzen werden Inokulationen mit den biotrophen Pilzen *Peronospora parasitica* und *Erysiphe cichoracearum* vorgenommen.

15

a) *Peronospora parasitica*

5 bis 8 Wochen alte Pflanzen werden mit einer Konidiensporensuspension (ca. 10^6 Sporen / ml) besprüht. Die inokulierten Pflanzen werden über Nacht in einem Kühlschrank bei ca. 16°C mit einer Plastiktüte überdeckt dunkel und feucht gehalten. Nach einem Tag wird die Plastiktüte etwas geöffnet und später vollständig entfernt. Sechs Tage nach Inokulation werden die Pflanzen wieder über Nacht mit der Plastiktüte zugedeckt, wodurch die Sporulation induziert wird. Am folgenden Tag werden die Blätter auf das Auftreten von Konidiophoren untersucht. Das interzelluläre Wachstum des Pilzes führt in den nächsten Tagen zur Induktion von schwachen Chlorosen bis hin zu starken Nekrosen in den Blättern. Diese Symptome werden quantifiziert und auf Signifikanz getestet.

25

b) *Erysiphe cichoracearum*

Der biotrophe Mehltau-Pilz wird auf *Arabidopsis*-Pflanzen kultiviert. Zur Infektion der 4 Wochen alten transgenen *RacB*-exprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen werden mit einem feinen Pinsel Konidienträger auf der Oberfläche der Blätter abgenommen und auf die Blätter der transgene Pflanzen gestrichen. Die Pflanzen werden für 7 Tage bei 20°C inkubiert. 7 Tage nach Inokulation werden die Konidienträger auf den Blättern sichtbar, und es treten in den folgenden Tagen Chlorosen und Nekrosen zutage. Diese Symptome werden quantifiziert und auf Signifikanz getestet.

30

c) Ergebnisse

45 Die transgenen *Arabidopsis* Pflanzen die antisense-Sequenzen für AtRacB oder HvRacB exprimieren, zeigen in zeigen sowohl gegen *Peronospora parasitica* als auch gegen *Erysiphe cichoracearum* eine

signifikant erhöhte Resistenz im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtyp-Pflanzen.

Die transgenen Arabidopsis Pflanzen die sense-Sequenzen für das
5 vollständige AtRacB exprimieren, zeigen in den meisten
Fällen sowohl gegen *Peronospora parasitica* als auch gegen *Erysiphe cichoracearum* eine signifikant erhöhte Anfälligkeit im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtyp-Pflanzen. In einigen Fällen kann jedoch auch eine erhöhte Resistenz (vermutlich über einen
10 Cosuppressionseffekt) beobachtet werden.

Die transgenen Arabidopsis Pflanzen die sense-Sequenzen für das
ein Fragment von HvRacB exprimieren, zeigen in einigen
Fällen sowohl gegen *Peronospora parasitica* als auch gegen *Erysiphe cichoracearum* eine signifikant erhöhte Resistenz im Vergleich
15 zu nicht-transgenen Wildtyp-Pflanzen.

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen
5 mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,
dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
- a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion
10 eines RacB-Proteins in einer Pflanze oder einem Gewebe,
Organ, Teil oder Zelle derselben und
- b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder
Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen
15 mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das
RacB Protein ausgewählt ist aus der Gruppe der Proteine
bestehend aus
- 20 a) einem Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6, und
- b) einem funktionellen Äquivalent eines Polypeptides gemäß
SEQ ID NO: 2, 4 oder 6.
- 25 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das
funktionelle Äquivalent eine Homologie von mindestens 64 %
zu einem der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 hat.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei das funktionelle
30 Äquivalent beschrieben ist durch ein Polypeptid gemäß SEQ ID
NO: 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62,
64, 66, 68 oder 70.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-
35 zeichnet, dass die Verminderung des RacB-Proteins gewähr-
leistet wird durch Anwendung eines Verfahrens ausgewählt
aus der Gruppe bestehend aus
- a) Einbringen einer doppelsträngigen RacB RNA-Nukleinsäure-
40 sequenz (RacB-dsRNA) oder einer deren Expression gewähr-
leistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten,
- b) Einbringen einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenz oder
einer deren Expression gewährleistenden Expressions-
45 kassette,

- c) Einbringen einer RacB antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 5 d) Einbringen von RacB sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 10 e) Einbringen einer Nukleinsäuresequenz kodierend für dominant-negatives RacB Protein oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 15 f) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen RacB -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 20 g) Einbringen von den RacB RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- h) Einbringen von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen RacB-Genen und
- 25 i) Einführung von Mutationen in ein endogenes RacB Gen.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, umfassend
- 30 (a) die stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für
- 35 a) eine doppelsträngigen RacB RNA-Nukleinsäuresequenz oder
- b) eine RacB antisense-Nukleinsäuresequenz oder
- 40 c) eine RacB antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder
- d) eine RacB sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder
- 45 e) ein dominant-negatives RacB Protein

101

- f) DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen RacB -Gene, -RNAs oder -Proteine
- g) den RacB RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen
- 5
- (b) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und
- (c) Expression besagter Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend um eine Pathogenresistenz in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.
- 10
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Pathogen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Pilzen, Insekten, Viren und Nematoden.
- 15
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.
- 20
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.
- 25
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.
- 30
11. RacB-Protein aus Gerste gemäß SEQ ID NO: 2.
- 35
12. Polypeptid kodierend für ein funktionelles Äquivalent des RacB Protein aus Gerste gemäß SEQ ID NO: 35, 37 oder 39.
13. Dominant-negative Variante eines RacB-Proteins aus Gerste gemäß Anspruch 11.
- 40
14. Dominant negative Variante nach Anspruch 13 beschrieben durch SEQ ID NO: 7.
- 45
15. Nukleinsäuresequenz kodierend für das RacB-Protein aus Gerste gemäß Anspruch 11.

16. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 15 beschrieben durch SEQ ID NO: 1, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenz und die durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Sequenzen.
- 5
17. Nukleinsäuresequenz kodierend für ein funktionelles Äquivalent des RacB Protein aus Gerste gemäß Anspruch 12.
18. Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 17 beschrieben durch SEQ ID NO: 34, 36 oder 38, die dazu komplementäre Nukleinsäuresequenzen und die durch Entartung (Degeneration) des genetischen Codes abgeleiteten Sequenzen.
- 10
19. Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dominant-negative Variante eines RacB-Proteins gemäß einem der Ansprüche 13 oder 14.
- 15
20. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines RacB Proteins, dadurch gekennzeichnet, dass
- 20
- a) einer der beiden RNA Stränge im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil einer RacB-Nukleinsäuresequenz , und
- 25
- b) der jeweils andere RNA Strang im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil des komplementären Stranges einer RacB-Nukleinsäuresequenz.
21. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines RacB Proteins umfassend
- 30
- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB Protein, und
- 35
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.
- 40
22. dsRNA-Molekül nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass die beiden RNA-Stränge kovalent miteinander verbunden sind.
23. dsRNA-Molekül nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei einer der beiden RNA-Stränge kodiert wird durch zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Protein gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eines funktionellen Äquiva-
- 45

lentes derselben gemäß SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69.

24. Transgene Expressionskassette enthalten in funktioneller Verknüpfung mit einem Promotor eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19 oder eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein dsRNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23.
25. Transgene Expressionskassette enthaltend zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein RacB-Protein gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eines funktionellen Äquivalentes derselben gemäß SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 61, 63, 65, 67 oder 69, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in antisense-Orientierung mit einem Promotor funktionell verknüpft ist.
26. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 24 oder 25, wobei die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz funktionell mit einem in Pflanzen funktionellen Promotor verknüpft ist.
27. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 26, wobei der in Pflanzen funktionelle Promotor ein pathogen-induzierbarer Promotor ist.
28. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 24 bis 27.
29. Transgener Organismus enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 15 bis 19, eine dsRNA gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 24 bis 27 oder einen Vektor gemäß Anspruch 28.
30. Transgener Organismus nach Anspruch 29 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen.
31. Transgener Organismus nach Anspruch 29 oder 30, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.

FIG.2

2/7

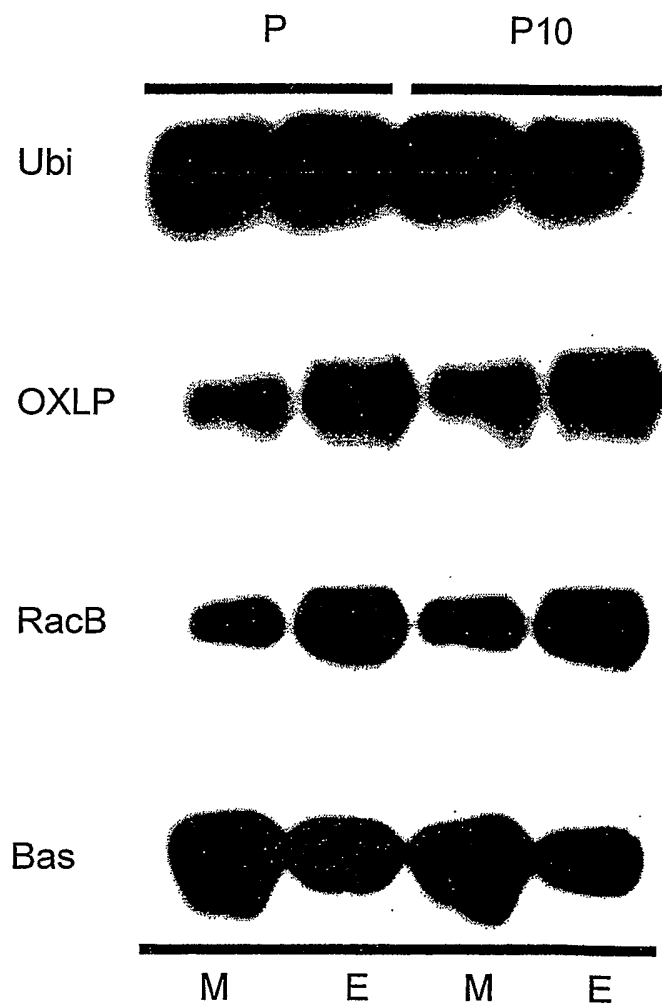


FIG.3

3/7

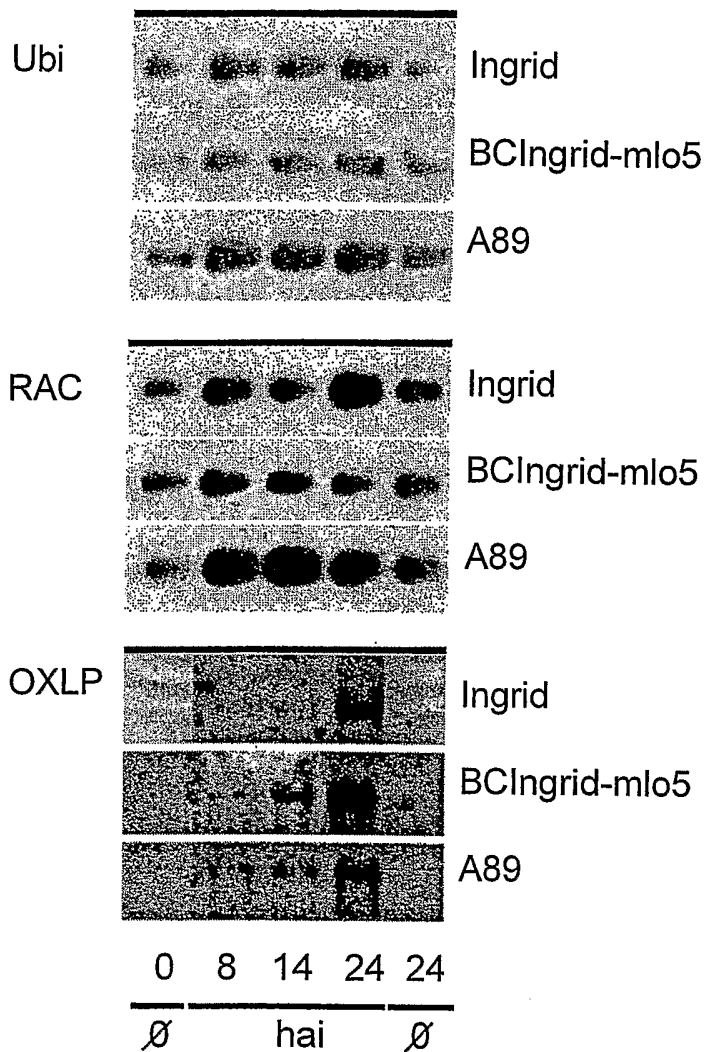


FIG.4

4/7

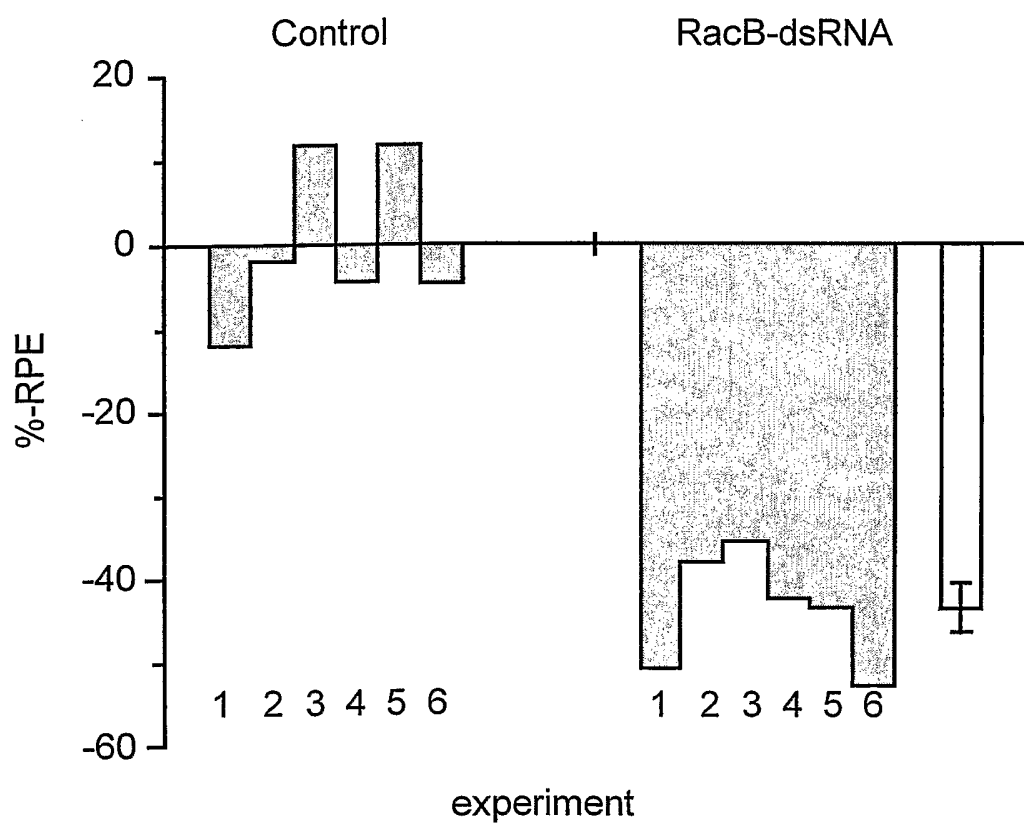


FIG.5

5/7

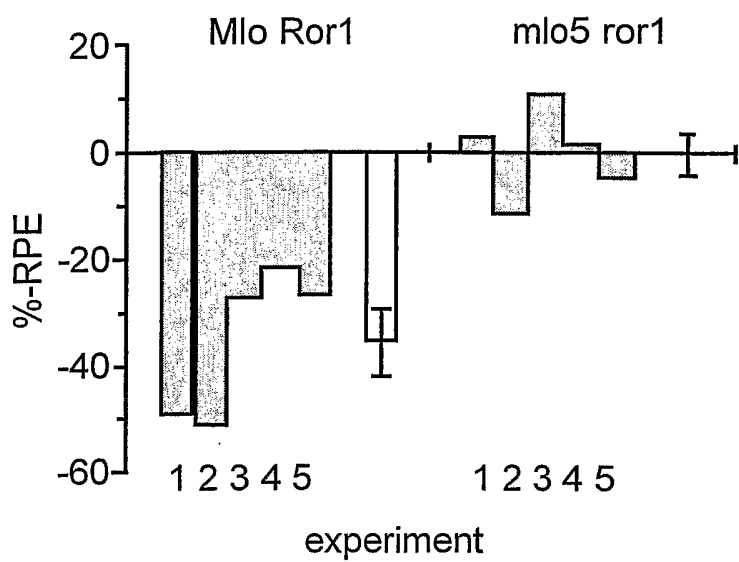
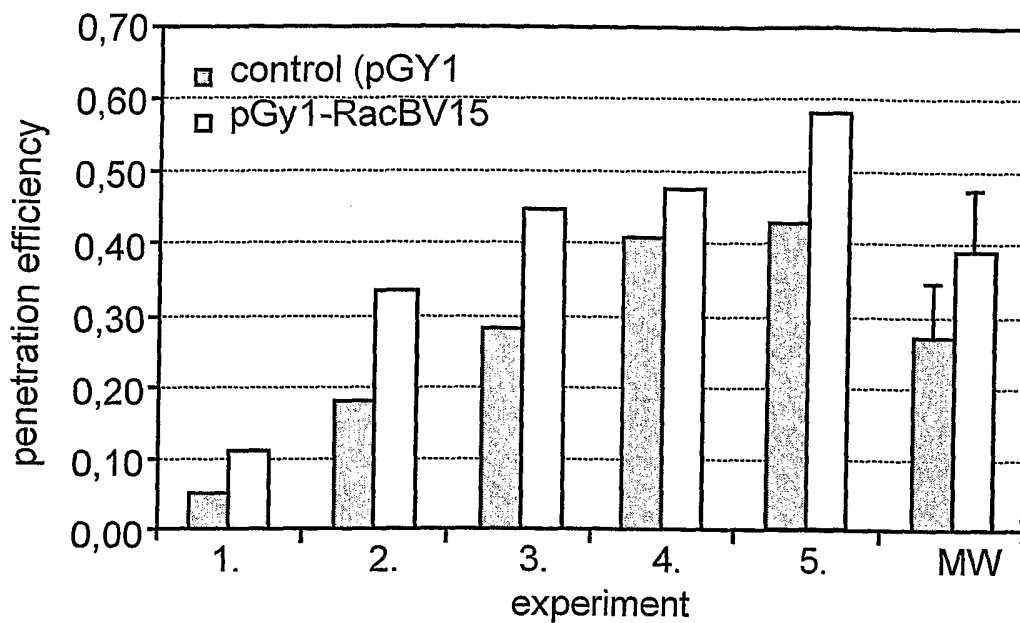


FIG.6

6/7

A



B

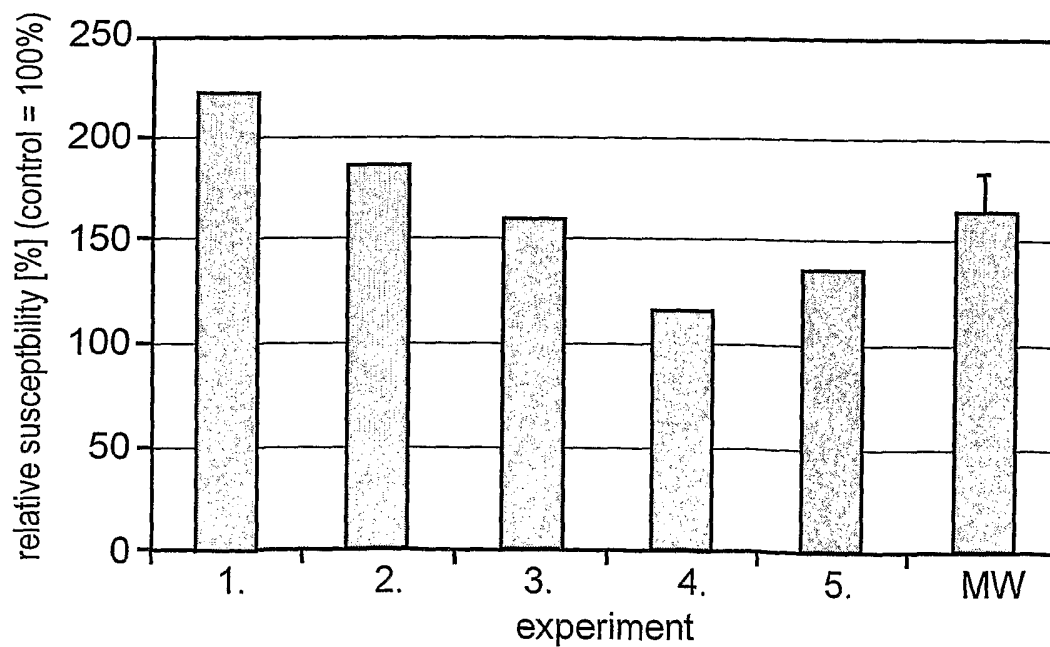
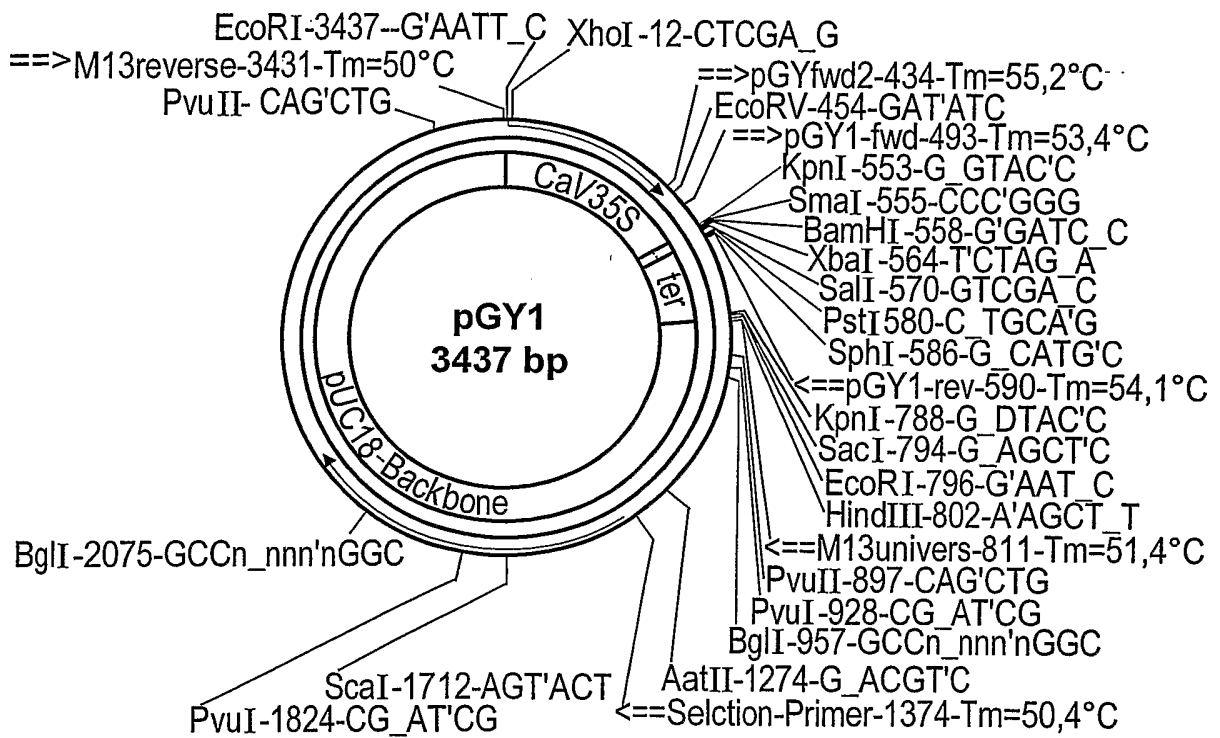


FIG.7



SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Neue Nukleinsäuresequenzen und deren Verwendung in Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen.

<130> NAE 369/02 / NAE 761/01 AT

<140>

<141>

<160> 76

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 857

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (90)..(680)

<400> 1

```

atcttaacca gctccctacc tccccttctt cttcctcctc ctcccctgtc tcgcccgcag 60
cttcaccggc agcgagggaa agaggggagg atg agc gcg tcc agg ttc ata aag 113
                               Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys
                               1                               5

tgc gtc acc gtg ggg gac ggc gcc gtc ggc aag acc tgc atg ctc atc 161
Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile
   10                               15                               20

tcc tac acc tcc aac acc ttc ccc acc gac tat gtg ccc acg gtg ttt 209
Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe
   25                               30                               35                               40

gac aac ttc agt gct aat gtt gtg gtt gat ggc aac act gtc aac ctt 257
Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu
                               45                               50                               55

ggg cta tgg gat act gca ggt cag gaa gac tac aac aga ctg aga ccg 305
Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro
                               60                               65                               70

ctg agt tat cgt gga gct gat gtc ttc ctt ctg gcc ttc tcg ctt atc 353
Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile
   75                               80                               85

agc aag gct agc tat gag aat gtt tca aag aag tgg ata cct gaa ctg 401
Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu
   90                               95                               100

aag cat tat gca cca ggt gtg cct att atc ctc gtg gga aca aag ctt 449
Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu
  105                               110                               115                               120

gat ctt cga gat gac aag cag ttc ttt gtg gac cat cct ggt gct gtt 497
Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val
                               125                               130                               135

cct atc act act gct cag ggg gag gaa cta aaa aag tta ata ggc gca 545
Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala
                               140                               145                               150

```


2

ccc tac tac atc gaa tgc agc tcg aag acc caa cta aat gtc aag ggt 593
 Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly
 155 160 165

gta ttt gat gcg gca ata aag gtg gta ctg cag cca cca aag gca aag 641
 Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys
 170 175 180

aag aag aaa aag gcg cag agg ggg gct tgc tcc atc ttg tgatctaadc 690
 Lys Lys Lys Lys Ala Gln Arg Gly Ala Cys Ser Ile Leu
 185 190 195

aatcggtaga caaagaacaa gggcgaagtt gccgccatgc tatattattg ttacgtcttg 750

cttcagcgga gctgcactct catggctcgtc ctncttccc tcacccccac cccaccctag 810

gttaccacc ggcagctgca acaaggtctc tttgtcgagg catcggg 857

<210> 2

<211> 197

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30

Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45

Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80

Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95

Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110

Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140

Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160

Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175

Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Lys Lys Ala Gln Arg Gly
 180 185 190

Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 3

<211> 1113

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (158)..(748)

<400> 3

```

ccttgctttg ctctccttc aaccttcttc tttcttggag tttcttgaga gagagagaga 60
gagagagaga gagagagaga gagagagaga ggggggggag cggtcgcagg aggaggagga 120
cggcggcgcgc tgctgcgacc gacgggggagc ggcgagg atg agc gcg tcc agg ttc 175
                                     Met Ser Ala Ser Arg Phe
                                     1             5

ata aag tgc gtc acc gtc ggg gac ggc gcc gtc ggc aag acc tgc atg 223
Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met
                10                15                20

ctc atc tcc tac acc tcc aac acc ttc ccc act gat tat gtt ccg acg 271
Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr
                25                30                35

gtg ttt gac aac ttc agt gcc aac gtc gtg gtt gat ggt aac acc gtc 319
Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val Asp Gly Asn Thr Val
                40                45                50

aac ctc ggg cta tgg gac act gca ggt cag gag gat tac aac aga ctg 367
Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu
                55                60                65                70

aga cca ctg agt tat cgt gga gct gat gtt ttc ctt ctg gcc ttc tcg 415
Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Leu Leu Ala Phe Ser
                75                80                85

cta atc agc aag gcc agc tat gag aat gtt tca aag aag tgg ata cct 463
Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val Ser Lys Lys Trp Ile Pro
                90                95                100

gag ctg aag cat tat gca cct ggt gtt cct atc atc ctt gtg gga aca 511
Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr
                105                110                115

aag ctt gat ctt cga gat gac aag cag ttt ttt gtg gac cat cct ggt 559
Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe Val Asp His Pro Gly
                120                125                130

gct gtt cct atc acc act gct cag gga gag gaa cta aga aag caa ata 607
Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu Arg Lys Gln Ile
                135                140                145                150

ggc gcc cca tac tac atc gaa tgc agc tca aag acc caa cta aac gtc 655
Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Leu Asn Val
                155                160                165

aag ggc gtt ttc gat gcg gca ata aag gtg gtg ctg cag cca ccc aag 703
Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Lys
                170                175                180

gcg aag aag aag aaa aag gcg caa agg ggg gcg tgc tcc att ttg 748
Ala Lys Lys Lys Lys Lys Ala Gln Arg Gly Ala Cys Ser Ile Leu
                185                190                195

tgatctaadc atcagtagac gacgaagaag aagaacgatg aagttgccag gctttattat 808
tgttgcgtct tgcttcagcg aacagcatt catggtccgg ggatcctagt ttactggcag 868
ctgcagcaag gcctctttgt cgaggcaatg agcgatccgt ttgtttcatt ttctcctttc 928
tgacctgtga ttatctcgtg tgactgacaa gtcgtggcaa ttaggtaact ttcttagatg 988
    
```


ctcccccttc ttcctccctc aaaccagacg ctgcgcccc tttcctccac gcctatcttc 300
 ttcagacgac cagcaggagg tacgaggaag accacctagg aggCctctct ctctctctcc 360
 ccagccaccc ccgtagcgag agggagggcg gaagagg atg agc gcg tcc agg ttc 415
 Met Ser Ala Ser Arg Phe
 1 5

ata aag tgc gtc acg gtc ggg gac ggc gcc gtc ggc aag acc tgc atg 463
 Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met
 10 15 20

ctc atc tcc tac acc tcc aac acc ttc ccc acc gac tat gtt ccg aca 511
 Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr
 25 30 35

gtg ttt gat aac ttc agt gcc aac gtt gtg gtt gat ggt aat act gtc 559
 Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val Asp Gly Asn Thr Val
 40 45 50

aac ctc ggc ctc tgg gac act gca ggt caa gag gat tac aac aga ctg 607
 Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu
 55 60 65 70

aga cca ctg agc tat cgt gga gct gat gtt ttt ctt ctg gct ttc tca 655
 Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Leu Leu Ala Phe Ser
 75 80 85

ctg atc agt aag gcc agc tat gag aat gtt tcg aag aag tgg ata cct 703
 Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val Ser Lys Lys Trp Ile Pro
 90 95 100

gaa ctg aag cat tat gca cct ggt gtg cca att att ctc gta ggg aca 751
 Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr
 105 110 115

aag ctt gat ctt cga gac gac aag cag ttc ttt gtg gac cat cct ggt 799
 Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe Val Asp His Pro Gly
 120 125 130

gct gtc cct atc act act gct cag gga gag gag cta aga aag caa ata 847
 Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu Arg Lys Gln Ile
 135 140 145 150

ggc gct cca tac tac atc gaa tgc agc tcg aag acc caa cta aac gtg 895
 Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Leu Asn Val
 155 160 165

aag ggc gtc ttc gat gcg gcg ata aag gtt gtg ctg cag ccg cct aag 943
 Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Lys
 170 175 180

gcg aag aag aag aaa aag gtg cag agg ggg gcg tgc tcc att ttg 988
 Ala Lys Lys Lys Lys Lys Val Gln Arg Gly Ala Cys Ser Ile Leu
 185 190 195

tgatctaadc atcggtagat gaagaaacaa gggcgaagg gcatggctt tatcatcgtc 1048
 gcgtcttgct tcagtggaac agcatgaatg gtccccaccc cctctagggtt tactggcggc 1108
 tcggctgcag cgagttctca tctctttgtc gaggcattga gcgatatggt tgtttcattt 1168
 tcctccttcc tgccttgatga ttatctgggtg tgtgtgtgtg tgtgactgac gaagtcgcgg 1228
 cgattaggta actcgcttag aaggtatttc ccgtgtttga gcaaaagaaa gtatccctgt 1288
 tatctctggt ccataagtta gacatgatgt aatcgtacta agtttatttt tacttatttc 1348
 acttgaatgg aaaagtatgc ttcccattta aaaaaaaaa aaaaa 1393

<210> 6
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Zea mays
 <400> 6
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Lys Val Gln Arg Gly
 180 185 190
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 7
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 dominant-negative mutant of barley RacB protein
 <220>
 <221> SITE
 <222> (20)
 <223> Thr/Asn mutation for dominant-negative phenotype

<400> 7
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Asn Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45

Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
65 70 75 80

Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
85 90 95

Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
100 105 110

Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
115 120 125

Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
130 135 140

Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
145 150 155 160

Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
165 170 175

Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Lys Ala Gln Arg Gly
180 185 190

Ala Cys Ser Ile Leu
195

<210> 8

<211> 197

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: :
dominant-negative mutant of rice RacB protein

<220>

<221> SITE

<222> (20)

<223> Thr/Asn mutation for dominant-negative phenotype

<400> 8

Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
1 5 10 15

Val Gly Lys Asn Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
20 25 30

Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
35 40 45

Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
65 70 75 80

Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
85 90 95

Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
100 105 110

Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
115 120 125

8

Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Lys Ala Gln Arg Gly
 180 185 190
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 9

<211> 197

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> SITE

<222> (20)

<223> Thr/Asn mutation for dominant-negative phenotype

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 dominant-negative mutant of maize RacB protein

<400> 9

Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Asn Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Pro Tyr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Leu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Lys Val Gln Arg Gly
 180 185 190
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 10
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 10
 ggatccgatg agcgcgtcca ggtt 24

<210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 11
 gtcgaccttc gcccttgttc tttgtc 26

<210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 12
 gtgggcacat agtcggtggg gaaggt 26

<210> 13
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 13
 cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 14
 ggacactgac atggactgaa ggagta 26

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 15
gttcatcaag tgcgtcaccg tg 22
<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 16
ttagcttcct cagttcttcc ctg 23
<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 17
cgcgccgcag ccgagtacga c 21
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 18
gtcacaaaaa cacatgtaac c 21
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 19
ggccgacatg cattcaccag 20
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
oligonucleotide primer

<400> 20
catctgatat tgctgggtct g 21
<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 21
 ccaagatgca gatcttcgtg a 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 22
 ttcgcatag gtaaaagagc a 21

<210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 23
 gtaaaacgac ggccagtg 18

<210> 24
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 24
 ggaaacagct atgaccatg 19

<210> 25
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 25
 gtggaggcgc ggcgaga 17

<210> 26
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 26
 ccatgcttca tctccatagt ca 22

<210> 27
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 27
 ggatcccgat tccatcagga aagcat 26

<210> 28
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 28
 gtcgacgcga gacactgcaa aacaaa 26

<210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 29
 ggatccttct cgtccattta gccggc 26

<210> 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 30
 gtcgactgat cacttgaagc atgccag 27

<210> 31
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 31
 ggatccgatg agcgcgtcca ggtt 24

<210> 32
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

14

aag gct gtg ttt gac acc gcc ata aag gtg gtc ctc cag ccg ccg agg 583
 Lys Ala Val Phe Asp Thr Ala Ile Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Arg
 170 175 180

aga agg gag gtg atg tcc gcc agg aag aaa acc agg cga agc tct gga 631
 Arg Arg Glu Val Met Ser Ala Arg Lys Lys Thr Arg Arg Ser Ser Gly
 185 190 195

tgc tcc atc aag cac ttg atc tgc ggg agt acg tgc gct gct 673
 Cys Ser Ile Lys His Leu Ile Cys Gly Ser Thr Cys Ala Ala
 200 205 210

tgaattagca ccatggaggc ctggactgac tatggagatg aagcatgg 721

<210> 35
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 35
 Met Ser Val Thr Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Arg Phe Pro
 20 25 30
 Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ser
 35 40 45
 Val Asp Gly Asn Ile Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Ser Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Leu Lys Lys Trp Met Pro Glu Leu Arg Arg Phe Ala Pro Asn Val Pro
 100 105 110
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp His Arg Ala Tyr
 115 120 125
 Leu Ala Asp His Pro Gly Ala Ser Ala Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Ala Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Thr Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Arg Arg Arg Glu Val Met Ser Ala Arg Lys Lys
 180 185 190
 Thr Arg Arg Ser Ser Gly Cys Ser Ile Lys His Leu Ile Cys Gly Ser
 195 200 205
 Thr Cys Ala Ala
 210

<210> 36
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(657)

<223> coding for RacB homologue (RacD)

<400> 36

```

ggatcccgat tccatcagga aagcatatag actagcccag taaatagaaa taagnaaga 60
tcggcg atg agc gca tct cgg ttc atc aag tgc gtg acg gtg ggg gac 108
      Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
          1             5             10

ggc gcc gtg gga aag aca tgc ctc ctc atc tca tac aca tcc aac acc 156
Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr
 15             20             25             30

ttc ccc aca gac tat gtc cca aca gtt ttc gac aac ttc agc gct aac 204
Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn
          35             40             45

gtc gtg gtt gac ggc agc acc gtc aac ctc gga tta tgg gat act gca 252
Val Val Val Asp Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
          50             55             60

gga caa gaa gac tat aat cga cta cgc cca cta agc tac cgt ggt gcc 300
Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
          65             70             75

gat gtc ttc ctg ctc gcc ttt tct ctc atc agc aaa gca agc tac gag 348
Asp Val Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu
          80             85             90

aat gtc act aag aag tgg att cca gag tta cgg cac tat gct cct ggc 396
Asn Val Thr Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly
          95             100            105            110

gtg ccc ata att ctt gtt gga aca aag ctt gat ctg cgg gat gac aag 444
Val Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys
          115            120            125

cag ttt ttt gtg gat cac cct ggg gcg gtt cct att tcc act gct cag 492
Gln Phe Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Ser Thr Ala Gln
          130            135            140

ggg gaa gag ctg aag aag gtg att ggc gcg act gcc tac atc gag tgc 540
Gly Glu Glu Leu Lys Lys Val Ile Gly Ala Thr Ala Tyr Ile Glu Cys
          145            150            155

agc tca aaa aca cag cag aac atc aag gcg gtg ttt gat gcg gcg atc 588
Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Ile Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile
          160            165            170

aag gtg gtc ctc cag cct ccg aag cag aag cgg aag aag agg aag tca 636
Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Arg Lys Lys Arg Lys Ser
          175            180            185            190

cag aaa gga tgc agc atc ttg taaagctaaa atcccttttg ttttgagtg 687
Gln Lys Gly Cys Ser Ile Leu
          195

tctcgcgtcg ac 699

```

<210> 37

<211> 197

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

16

<400> 37

```

Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1           5           10           15
Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
           20           25           30
Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
           35           40           45
Val Asp Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
           50           55           60
Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
           65           70           75           80
Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
           85           90           95
Thr Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
           100          105          110
Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
           115          120          125
Phe Val Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Ser Thr Ala Gln Gly Glu
           130          135          140
Glu Leu Lys Lys Val Ile Gly Ala Thr Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
           145          150          155          160
Lys Thr Gln Gln Asn Ile Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
           165          170          175
Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Arg Lys Lys Arg Lys Ser Gln Lys
           180          185          190
Gly Cys Ser Ile Leu
           195

```

<210> 38

<211> 677

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(665)

<223> coding for RacB homologue (Rop4)

<400> 38

```

ggatccttct cgtccattta gccggc atg gcg tcc agc gcc tcc cgg ttc atc   53
                               Met Ala Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ile
                               1           5
aag tgc gtc acc gtc ggg gac ggc gcc gtc ggc aag acc tgc atg ctc   101
Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu
 10           15           20           25
atc tgc tac acc agc aac aag ttc ccc acc gac tac gtg ccc acc gtg   149
Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val
           30           35           40
ttc gac aat ttc agc gcg aac gtg gtg gtg gac ggc acc acc gtg aac   197
Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val Asp Gly Thr Thr Val Asn
           45           50           55

```

ctg ggc ctc tgg gac act gca ggg cag gag gac tac aac aga ttg aga 245
 Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg
 60 65 70

ccg ctg agc tac cgg gga gcc gac gtc ttc gtg ctc tcc ttc tcg ctc 293
 Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Val Leu Ser Phe Ser Leu
 75 80 85

gtc agc cga gcc agc tac gag aat gtc atg aag aag tgg cta ccg gag 341
 Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu Asn Val Met Lys Lys Trp Leu Pro Glu
 90 95 100 105

ctt cag cac cat gca ccc ggc gtg cca aca gtg ctg gtt ggt aca aag 389
 Leu Gln His His Ala Pro Gly Val Pro Thr Val Leu Val Gly Thr Lys
 110 115 120

cta gat cta cgt gaa gac aag caa tac tta ctt gac cac ccc ggc gtg 437
 Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys Gln Tyr Leu Leu Asp His Pro Gly Val
 125 130 135

gtg cct gtt act aca gct cag ggg gag gaa ctc cgc aag cac atc ggt 485
 Val Pro Val Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu Arg Lys His Ile Gly
 140 145 150

gca act tgt tat gtc gaa tgc agc tca aag aca cag cag aat gtc aaa 533
 Ala Thr Cys Tyr Val Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys
 155 160 165

gct gtg ttt gat gct gcc atc aag gta gtg atc aaa cct cca aca aag 581
 Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val Ile Lys Pro Pro Thr Lys
 170 175 180 185

cag agg gaa agg agg aag aag aaa gca cgg caa gga tgt gca tca ttg 629
 Gln Arg Glu Arg Arg Lys Lys Lys Ala Arg Gln Gly Cys Ala Ser Leu
 190 195 200

ggt acc ctg tca aga agg aag ctg gca tgc ttc aag tgatcagtcg ac 677
 Gly Thr Leu Ser Arg Arg Lys Leu Ala Cys Phe Lys
 205 210

<210> 39
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 39
 Met Ala Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
 20 25 30
 Phe Pro Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn
 35 40 45
 Val Val Val Asp Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60
 Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Val Phe Val Leu Ser Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
 85 90 95
 Asn Val Met Lys Lys Trp Leu Pro Glu Leu Gln His His Ala Pro Gly
 100 105 110
 Val Pro Thr Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys
 115 120 125

18

Gln Tyr Leu Leu Asp His Pro Gly Val Val Pro Val Thr Thr Ala Gln
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Arg Lys His Ile Gly Ala Thr Cys Tyr Val Glu Cys
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile
 165 170 175
 Lys Val Val Ile Lys Pro Pro Thr Lys Gln Arg Glu Arg Arg Lys Lys
 180 185 190
 Lys Ala Arg Gln Gly Cys Ala Ser Leu Gly Thr Leu Ser Arg Arg Lys
 195 200 205
 Leu Ala Cys Phe Lys
 210

<210> 40
 <211> 945
 <212> DNA
 <213> Zea mays
 <220>
 <221> CDS
 <222> (37)..(672)
 <223> coding for RacB homologue (Rop6)

<400> 40
 gagaagaagg gggcctgccg gccggggctg ggagac atg agc gtg acc aag ttc 54
 Met Ser Val Thr Lys Phe
 1 5
 atc aag tgc gtc acg gtg ggc gac ggc gcg gtg ggc aag acc tgc atg 102
 Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met
 10 15 20
 ctc atc tgc tac acc agc aac aag ttc ccc acg gac tac atc ccc acg 150
 Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr
 25 30 35
 gtg ttc gac aac ttc agc gcc aac gtc tcc gtg gac ggc agc atc gtc 198
 Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ser Val Asp Gly Ser Ile Val
 40 45 50
 aac ctg ggc ctc tgg gac acc gcg ggg caa gag gac tac agc agg ctg 246
 Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Ser Arg Leu
 55 60 65 70
 cgg ccg ctg agc tac agg ggc gcg gac gtg ttc gtg ctg gcc ttc tcc 294
 Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Val Leu Ala Phe Ser
 75 80 85
 ctg atc agc agg gcg agc tac gag aac gtt ctt aag aag tgg gtg cca 342
 Leu Ile Ser Arg Ala Ser Tyr Glu Asn Val Leu Lys Lys Trp Val Pro
 90 95 100
 gag ctt cgc aga ttc gcg ccc aac gtc ccg gtc gtt ctt gtt ggg acc 390
 Glu Leu Arg Arg Phe Ala Pro Asn Val Pro Val Val Leu Val Gly Thr
 105 110 115
 aag tta gat ctc cgc gac cac aga gcc tac ctc gcc gac cat cct gga 438
 Lys Leu Asp Leu Arg Asp His Arg Ala Tyr Leu Ala Asp His Pro Gly
 120 125 130
 gct tca gca gtc acc acg gcg cag ggt gag gaa ctg agg aag cag atc 486
 Ala Ser Ala Val Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu Arg Lys Gln Ile
 135 140 145 150

19

ggc gct gcg gcc tac atc gag tgc agt tcc aaa acc cag cag aac gtc 534
 Gly Ala Ala Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val
 155 160 165

aag tct gtc ttc gat acg gcc atc aaa gtg gtc ctt cag ccc cca cgg 582
 Lys Ser Val Phe Asp Thr Ala Ile Lys Val Val Leu Gln Pro Pro Arg
 170 175 180

agg agg gag gca gtg cct gcc agg aag aag aac agg cgt gcc tcc gga 630
 Arg Arg Glu Ala Val Pro Ala Arg Lys Lys Asn Arg Arg Gly Ser Gly
 185 190 195

tgc tct ata atg aac ctt gtg tgt ggc agc aca tgt gct gct 672
 Cys Ser Ile Met Asn Leu Val Cys Gly Ser Thr Cys Ala Ala
 200 205 210

tagggagtct actagaacac tgaaccggaa gggaggtgaa ggcgtgattc atgggtgtgta 732
 atgtgctgtg gcaactggca agttagtttg ctatagatga ggatgactgc tgcttttgtt 792
 ttccttggcc catctgctgt agttcgtcag gctcttcaag ggctgacttt ttaccagact 852
 gcagtgttgt gtaagaagtt tgctagacgc tgtaactgta atgttctccg ctgatgtgg 912
 ataactaaga tacgagtaag cttgagcgtg ttc 945

<210> 41
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 41
 Met Ser Val Thr Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ser
 35 40 45
 Val Asp Gly Ser Ile Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Arg Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Leu Lys Lys Trp Val Pro Glu Leu Arg Arg Phe Ala Pro Asn Val Pro
 100 105 110
 Val Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp His Arg Ala Tyr
 115 120 125
 Leu Ala Asp His Pro Gly Ala Ser Ala Val Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Ala Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ser Val Phe Asp Thr Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Arg Arg Arg Glu Ala Val Pro Ala Arg Lys Lys
 180 185 190
 Asn Arg Arg Gly Ser Gly Cys Ser Ile Met Asn Leu Val Cys Gly Ser
 195 200 205

Thr Cys Ala Ala
210

<210> 42

<211> 850

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (112)..(702)

<223> coding for RacB homologue (RACDP / RACD)

<400> 42

```

agcaagcagc agctgaggtg aggtccgtgg cgttggagtg aggactgagg aggaagaaga 60
gggcgggatc tagggtaccg gatgcgctgg ctgtgctgag tgagagtaga g atg agc 117
                                         Met Ser
                                         1

gcg tct cgg ttc atc aag tgc gtc acc gtg ggg gac ggc gcc gtg ggc 165
Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val Gly
                    5                      10                      15

aag acc tgc atg ctc atc tcc tac acc tcc aac acc ttc ccc acg gac 213
Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr Asp
                    20                      25                      30

tat gtt cca act gtt ttt gat aac ttc agt gca aat gtt gtg gtc gat 261
Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val Asp
                    35                      40                      45                      50

ggg agc act gtg aac ttg ggg ttg tgg gat aca gca gga caa gag gac 309
Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Asp
                    55                      60                      65

tac aat agg cta cgc ccg ttg agc tat cgt ggc gct gat gtt ttc ctg 357
Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe Leu
                    70                      75                      80

ctg gcc ttt tct ctg atc agc aaa gca agc tat gag aat gtt tct aaa 405
Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val Ser Lys
                    85                      90                      95

aag tgg ata cct gaa tta agg cat tat gct cct ggt gtg cca ata att 453
Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile Ile
                    100                      105                      110

ctc gtt gga aca aag ctt gat ctg cgg gat gat aag caa ttt ttc gta 501
Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe Val
                    115                      120                      125                      130

gat cac cct ggt gct gta cct att tcc act gct cag ggc gaa gag ctg 549
Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Ser Thr Ala Gln Gly Glu Glu Leu
                    135                      140                      145

agg aaa ctc att ggt gca gcg gca tac att gaa tgc agt tca aaa aca 597
Arg Lys Leu Ile Gly Ala Ala Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr
                    150                      155                      160

cag caa aac atc aag gca gtt ttc gat gct gcg att aag gtg gtt ctc 645
Gln Gln Asn Ile Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val Leu
                    165                      170                      175

cag cct cca aag caa aag aag aag aag aaa aag gcg cag aaa gga tgt 693
Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Lys Lys Ala Gln Lys Gly Cys
                    180                      185                      190

```

gcc atc ttg taattaaatg gtagacagtg cagtgcagat cgatgtatcc 742
 Ala Ile Leu
 195

cttcatttgt agcctctggc ttcaatcgtc gcttgtttgt ataattacgc tagatgccac 802
 cggcagaaga tataatatag tcctcctgcc tttgtggtgt tggctctc 850

<210> 43

<211> 197

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 43

Met	Ser	Ala	Ser	Arg	Phe	Ile	Lys	Cys	Val	Thr	Val	Gly	Asp	Gly	Ala
1				5					10					15	
Val	Gly	Lys	Thr	Cys	Met	Leu	Ile	Ser	Tyr	Thr	Ser	Asn	Thr	Phe	Pro
			20					25					30		
Thr	Asp	Tyr	Val	Pro	Thr	Val	Phe	Asp	Asn	Phe	Ser	Ala	Asn	Val	Val
		35					40					45			
Val	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Leu	Trp	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln
	50					55					60				
Glu	Asp	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Ala	Asp	Val
65					70				75					80	
Phe	Leu	Leu	Ala	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Lys	Ala	Ser	Tyr	Glu	Asn	Val
				85					90					95	
Ser	Lys	Lys	Trp	Ile	Pro	Glu	Leu	Arg	His	Tyr	Ala	Pro	Gly	Val	Pro
			100					105					110		
Ile	Ile	Leu	Val	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Leu	Arg	Asp	Asp	Lys	Gln	Phe
		115					120					125			
Phe	Val	Asp	His	Pro	Gly	Ala	Val	Pro	Ile	Ser	Thr	Ala	Gln	Gly	Glu
	130					135					140				
Glu	Leu	Arg	Lys	Leu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ile	Glu	Cys	Ser	Ser
145				150						155				160	
Lys	Thr	Gln	Gln	Asn	Ile	Lys	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Ile	Lys	Val
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Pro	Pro	Lys	Gln	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ala	Gln	Lys
			180				185						190		
Gly	Cys	Ala	Ile	Leu											
			195												

<210> 44

<211> 1169

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (169)..(813)

<223> coding for RacB homologue (Rop 4)

<400> 44

aacagttcag agaggaagca tgtgacactt ccctctgtcc ctctctctct ctctagcctc 60
 caaccatcgc ttcaccaaga agccatcacc tcctcctctc tatcaagttc tctcccctct 120

cttgctgtct ctgcttgctg ctgctgctgc tcgattcggc cggcggcc atg gcg tcc 177
Met Ala Ser
1

agc gcg tcg cgg ttc atc aag tgc gtc acg gtc ggg gac ggc gcc gtc 225
Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val
5 10 15

ggc aag acc tgc atg ctc atc tgc tac acc agc aac aag ttc ccc act 273
Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys Phe Pro Thr
20 25 30 35

gat tac gta ccc act gtt ttt gac aat ttc agt gca aac gtg gtg gtc 321
Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val
40 45 50

gac ggc acc acg gtg aat ttg ggt ctc tgg gat act gca ggg cag gaa 369
Asp Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
55 60 65

gat tac aac aga ttg agg ccg cta agc tac cgt ggc gcc gat gtc ttt 417
Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe
70 75 80

gtg ctt gcc ttc tcc cta gtg agc cga gct agc tat gag aat gtc atg 465
Val Leu Ala Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu Asn Val Met
85 90 95

aag aag tgg tta cca gag ctt cag cat tat gca cca ggg gtg cca att 513
Lys Lys Trp Leu Pro Glu Leu Gln His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile
100 105 110 115

gtg ttg gtt ggg acc aaa ttg gat ctt cgt gaa gat aaa cac tac tta 561
Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys His Tyr Leu
120 125 130

ctt gac cat cct agc ttg gtg cct gtg act aca gca cag gga gag gaa 609
Leu Asp His Pro Ser Leu Val Pro Val Thr Thr Ala Gln Gly Glu Glu
135 140 145

ctc cgc aag cac att ggc gca acg tgt tac atc gaa tgc agc tca aag 657
Leu Arg Lys His Ile Gly Ala Thr Cys Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys
150 155 160

aca cag cag aat gta aaa gct gtg ttt gat gct gcc atc aag gta gta 705
Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val
165 170 175

atc aag cct cca aca aag cag agg gac agg aag aag aag aaa aca cgg 753
Ile Lys Pro Pro Thr Lys Gln Arg Asp Arg Lys Lys Lys Lys Thr Arg
180 185 190 195

cgc gga tgt tct ttc ttc tgc aag ggt gtc atg tcc aga aga agg cta 801
Arg Gly Cys Ser Phe Phe Cys Lys Gly Val Met Ser Arg Arg Arg Leu
200 205 210

gta tgc ttc aag tgaacaagag gggttctttg atgagcagag cagaggtctg 853
Val Cys Phe Lys
215

tgagacaaaa tgatgtcttg tgtttgataa ttgctttatc tcaaaagttc cagtttgata 913

gttgcaatttc caacctatat atatcctggt tggcaattaa ctactacctc cgtcccaaaa 973

tataacaact tttggctatg aatctgaacg cacagttatc cagattcata gctaaaaata 1033

cttatatctt gggacggagg gagtactagt agtagattac tatcctgtcc atgtaatgta 1093

ttaggaaggt taatagcact ccctacatct cagaatggaa gttgttttgg ttttaaaaaa 1153
 aaaaaaaaaa aaaaaa 1169

<210> 45

<211> 215

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 45

Met	Ala	Ser	Ser	Ala	Ser	Arg	Phe	Ile	Lys	Cys	Val	Thr	Val	Gly	Asp
1				5					10					15	
Gly	Ala	Val	Gly	Lys	Thr	Cys	Met	Leu	Ile	Cys	Tyr	Thr	Ser	Asn	Lys
			20					25					30		
Phe	Pro	Thr	Asp	Tyr	Val	Pro	Thr	Val	Phe	Asp	Asn	Phe	Ser	Ala	Asn
		35					40					45			
Val	Val	Val	Asp	Gly	Thr	Thr	Val	Asn	Leu	Gly	Leu	Trp	Asp	Thr	Ala
	50					55					60				
Gly	Gln	Glu	Asp	Tyr	Asn	Arg	Leu	Arg	Pro	Leu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Ala
65					70					75				80	
Asp	Val	Phe	Val	Leu	Ala	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	Arg	Ala	Ser	Tyr	Glu
				85					90					95	
Asn	Val	Met	Lys	Lys	Trp	Leu	Pro	Glu	Leu	Gln	His	Tyr	Ala	Pro	Gly
			100					105					110		
Val	Pro	Ile	Val	Leu	Val	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Leu	Arg	Glu	Asp	Lys
		115					120					125			
His	Tyr	Leu	Leu	Asp	His	Pro	Ser	Leu	Val	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	Gln
	130					135					140				
Gly	Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	His	Ile	Gly	Ala	Thr	Cys	Tyr	Ile	Glu	Cys
145					150				155					160	
Ser	Ser	Lys	Thr	Gln	Gln	Asn	Val	Lys	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Ile
				165					170					175	
Lys	Val	Val	Ile	Lys	Pro	Pro	Thr	Lys	Gln	Arg	Asp	Arg	Lys	Lys	Lys
			180					185					190		
Lys	Thr	Arg	Arg	Gly	Cys	Ser	Phe	Phe	Cys	Lys	Gly	Val	Met	Ser	Arg
		195					200					205			
Arg	Arg	Leu	Val	Cys	Phe	Lys									
210						215									

<210> 46

<211> 1127

<212> DNA

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(831)

<223> coding for RacB homologue (RacA)

<400> 46

gtcgaccac gcgtccgcc agaagtcacg caccaaacac caccaccaa gaaggcgaga 60
 acgtactccg tcctcccct ccctcccct cccttccc tcgaggctcc aggaccgtct 120
 cctcgctgc tcatccgcc ctgcttcct tctctgggt cggagaaccg gagagaagcg 180

24

cgcgcgggcc atg gcg tcc agc gcc tct cgg ttc atc aag tgc gtc acg gtc 231
 Met Ala Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val
 1 5 10

ggc gac ggt gcc gtg ggc aag aca tgt atg ctc atc tgc tac acc agc 279
 Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser
 15 20 25 30

aac aag ttc ccc act gac tac ata cct acg gtg ttc gac aat ttc agt 327
 Asn Lys Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser
 35 40 45

gca aat gta gtt gtg gat ggc acc act gtg aat ttg ggc ctt tgg gat 375
 Ala Asn Val Val Val Asp Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp
 50 55 60

acc gct ggg cag gaa gat tac aac cgc ctg agg cct cta agc tac cga 423
 Thr Ala Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg
 65 70 75

ggc gca gat gtt ttc gtg ctt gca ttc tca ctt gtg agc cga gct agc 471
 Gly Ala Asp Val Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser
 80 85 90

tat gag aat atc atg aag aag tgg ata cca gag ctt caa cat tat gca 519
 Tyr Glu Asn Ile Met Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Tyr Ala
 95 100 105 110

cct ggg gtg ccc gtt gtt ttg gca ggc aca aaa ttg gat ctt cgt gaa 567
 Pro Gly Val Pro Val Val Leu Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu
 115 120 125

gac aag cac tac ttg atg gac cat cct gga ttg gtg cct gtt acc act 615
 Asp Lys His Tyr Leu Met Asp His Pro Gly Leu Val Pro Val Thr Thr
 130 135 140

gca cag ggg gag gaa ctt cgt aga caa att ggt gct atg tat tac att 663
 Ala Gln Gly Glu Glu Leu Arg Arg Gln Ile Gly Ala Met Tyr Tyr Ile
 145 150 155

gaa tgc agc tca aag aca cag cag aat gtc aaa gct gtg ttc gat gct 711
 Glu Cys Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala
 160 165 170

gcc atc aag gta gta atc cag cct cca act aaa ata aga gaa aag aag 759
 Ala Ile Lys Val Val Ile Gln Pro Pro Thr Lys Ile Arg Glu Lys Lys
 175 180 185 190

aag aaa aaa tca cgc aaa gga tgt tct atg atg aac atc ttc ggt gga 807
 Lys Lys Lys Ser Arg Lys Gly Cys Ser Met Met Asn Ile Phe Gly Gly
 195 200 205

aga aaa atg cta tgc ttc aag tcc tgaatggttc aaggggggtct tacatggact 861
 Arg Lys Met Leu Cys Phe Lys Ser
 210

gataccacga gtgtgacccc gagtttgcca agcttgaaat cttgatgtgc tcgttgcca 921

tgtgtatatt tgcacctttg gttattaatg actagaggta ggtaattgaa actagtctgc 981

ttaagcgttc tgcactgctg gtgtggtag ctctatgagt taagcagttc gacagaggcc 1041

aaaccgacag tgagattttg ttctttcatg gaaatgtgcc aatgtcacag ctttttcgtg 1101

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1127

<210> 47
 <211> 214

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 47

```

Met Ala Ser Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1           5           10           15
Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
          20           25           30
Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn
          35           40           45
Val Val Val Asp Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
          50           55           60
Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65           70           75           80
Asp Val Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
          85           90           95
Asn Ile Met Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Tyr Ala Pro Gly
          100          105          110
Val Pro Val Val Leu Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys
          115          120          125
His Tyr Leu Met Asp His Pro Gly Leu Val Pro Val Thr Thr Ala Gln
          130          135          140
Gly Glu Glu Leu Arg Arg Gln Ile Gly Ala Met Tyr Tyr Ile Glu Cys
145           150           155           160
Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile
          165           170           175
Lys Val Val Ile Gln Pro Pro Thr Lys Ile Arg Glu Lys Lys Lys Lys
          180          185          190
Lys Ser Arg Lys Gly Cys Ser Met Met Asn Ile Phe Gly Gly Arg Lys
          195          200          205
Met Leu Cys Phe Lys Ser
          210

```

<210> 48

<211> 901

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(901)

<223> coding for RacB homologue (RacA)

<400> 48

```

ccccgggctgc aggaattcgg cacgaggcaa gaagtcacgc accaaacacc accccccatc 60
accgccgctc cgctccccag tccccaccc ctctcgcgc cccttctctg agccgagctc 120
cgggggaagg aatcggagag gccggcgcg gcgagccat ggcgtccagc gcctcccggt 180
tcatcaagtg cgtcacggtg ggcgacggcg ccgtcggcaa gacctgcatg ctcatctgct 240
acaccagcaa caagttcccc accgactaca taccacgggt gttcgacaat ttcagcgcga 300
acgtggtggc ggacggcacc acggtgaatt tgggcctttg ggacaccgcc gggcaggagg 360
attacaaccg gctgaggcct ctaagctacc gcggcgccga cgtttctgtg cttgccttct 420
cccttgtgag ccgagctagc tatgagaata tcatgaagaa gtggataacc gagcttcagc 480

```



```

attacgcgcc cggcgtacct gttgtgctgg taggcacaaa actggatctt cgtgaagata 540
agcactatctt gctggaccac cctgggatga tacccgttac cacagcacag ggggaggaac 600
ttcgtaaagca agttgggtgct ttatattaca tagagtgcag ctcaaagaca caacagaatg 660
tcaaagctgt gtttgatgct gctatcaagg tagtaatcca gccccccact aaacaaagag 720
aaaagaagaa aaagaaacag cgtcggggat gttctatgat gaacttcagc ggaaggaaat 780
gctatgcttc aaatcctgaa tgatgaaaga gaaggttcct tgccctngaac gattgtcacg 840
gttgcgctgc accaatttga caacacctcc aaaccggttg aatgtgctgg attgcaccgt 900
c 901

```

```

<210> 49
<211> 594
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(591)
<223> coding for RacB homologue

```

```

<400> 49
atg agc gct tcg agg ttc gta aag tgc gtg acg gtt ggt gat gga gct 48
Met Ser Ala Ser Arg Phe Val Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
gtc gga aaa act tgt ttg ttg att tct tac aca agc aac act ttc cct 96
Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
acg gat tat gtg cct acc gtt ttc gat aat ttc agt gcc aat gtt gtg 144
Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
gtt aat gga agc act gtg aat ctt gga ttg tgg gac act gca ggg caa 192
Val Asn Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
gag gat tac aat aga tta aga cca ctg agt tac cgt gga gca gat gtt 240
Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
ttc att ttg gcc ttc tct ctt atc agt aaa gcc agt tat gaa aac gtc 288
Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
tcc aaa aag tgg atc ccg gag ttg aaa cat tac gcg cct ggt gtc ccc 336
Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
atc gtc ctt gtt gga aca aag ctt gat ctt cga gat gat aaa cag ttc 384
Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
ttt atc gac cat cct ggt gct gtt ccg att act act gct cag gga gag 432
Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
gag ctg agg aag caa ata gga gca cct act tac atc gaa tgc agt tcc 480
Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Pro Thr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
aaa act caa gag aat gtg aag gcg gtg ttt gac gca gcc atc cga gtg 528
Lys Thr Gln Glu Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
 165 170 175
gtg ttg caa ccg cca aag cag aag aag aag agc aaa gcg cag aag 576
Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Ser Lys Ala Gln Lys
 180 185 190

```

gca tgc tcc att cta tga
Ala Cys Ser Ile Leu
195

<210> 50
<211> 197
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 50
Met Ser Ala Ser Arg Phe Val Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
1 5 10 15
Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
20 25 30
Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
35 40 45
Val Asn Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
50 55 60
Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
65 70 75 80
Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
85 90 95
Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
100 105 110
Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
115 120 125
Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
130 135 140
Glu Leu Arg Lys Gln Ile Gly Ala Pro Thr Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
145 150 155 160
Lys Thr Gln Glu Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
165 170 175
Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Ser Lys Ala Gln Lys
180 185 190
Ala Cys Ser Ile Leu
195

<210> 51
<211> 594
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(591)
<223> coding for RacB homologue

<400> 51
atg agc gct tgc agg ttc ata aag tgt gtc acc gtt ggc gac gga gct 48
Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
1 5 10 15
ggt ggt aaa acc tgt ttg ctg att tct tac acc agc aac act ttt cct 96
Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
20 25 30

28

acg gat tat gta ccg act gtt ttc gat aac ttt agc gca aat gtg gtt 144
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45

gtt aat gga gcc act gtg aat ctt ggg cta tgg gat acc gca ggg cag 192
 Val Asn Gly Ala Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60

gag gat tat aac aga tta aga cct ttg agt tac cgc ggt gct gat gtt 240
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80

ttc atc tta gca ttc tct ctt atc agt aag gct agt tat gag aat gtc 288
 Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95

tcc aag aag tgg atc cca gag ctg aag cat tat gcc cct ggt gtc cct 336
 Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110

ata gtt ctt gtt gga acc aaa cta gat ctt cgg gat gac aaa cag ttc 384
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

ttc att gac cac cct ggc gct gta cca att act act gct cag gga gag 432
 Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140

gaa ctg aag aaa cta att gga gct ccc gca tac atc gag tgc agt tca 480
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160

aaa aca caa gag aac gtg aaa gga gta ttt gat gca gcg atc cga gtg 528
 Lys Thr Gln Glu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
 165 170 175

gtt ctt caa cct cca aag cag aag aaa aag aaa agc aaa gca caa aaa 576
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Ser Lys Ala Gln Lys
 180 185 190

gcc tgc tcc att ttg taa 594
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 52
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 52
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 Val Asn Gly Ala Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95

29

Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Glu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Ser Lys Ala Gln Lys
 180 185 190
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 53
 <211> 594
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(591)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 53
 atg agc gca tca agg ttc ata aag tgc gtc acc gtt ggt gat gga gct 48
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 gtt ggt aaa acc tgt ttg ctg att tct tat acc agc aac acc ttt ccc 96
 Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 acg gat tat gtt ccg act gtt ttc gat aac ttt agt gca aat gtg gtt 144
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 gtt aat gga gcc acg gtg aat ctt gga ttg tgg gat act gca ggg caa 192
 Val Asn Gly Ala Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 gag gac tat aac aga tta aga cct ttg agt tac cgt ggt gct gat gtt 240
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 ttc att ctt gcc ttc tct ctc att agt aag gct agt tat gag aat gtt 288
 Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 tcc aag aag tgg att cct gag ttg aag cac tat gct cct ggt gtc cca 336
 Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 att gtc ctt gtt gga acc aaa cta gat ctt cga gat gac aaa cag ttt 384
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 ttc atc gac cat cct ggt gct gtc cct att acc act gtt cag gga gag 432
 Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Val Gln Gly Glu
 130 135 140

30

gag ctg aag aag cta att gga gcg cca gct tac atc gag tgc agt tca 480
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160

aaa tca caa gag aac gtg aag ggc gtg ttt gat gca gcg atc aga gtg 528
 Lys Ser Gln Glu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
 165 170 175

gtc ctt caa cct cca aag cag aag aaa aag aag aac aaa gca caa aag 576
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Asn Lys Ala Gln Lys
 180 185 190

gcc tgc tcc atc ttg taa 594
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 54
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 54
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 Val Asn Gly Ala Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Ser Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Val Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Ser Gln Glu Asn Val Lys Gly Val Phe Asp Ala Ala Ile Arg Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Asn Lys Ala Gln Lys
 180 185 190
 Ala Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 55
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS

32

Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45
 Val Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95
 Ala Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110
 Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125
 Phe Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Asn Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ser Pro Ile Tyr Ile Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Asn Lys Asn Arg
 180 185 190
 Cys Val Phe Leu
 195

<210> 57
 <211> 597
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(594)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 57
 atg agt gct tca agg ttt atc aag tgt gtc act gtc ggc gac ggt gct 48
 Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 gtt gga aag act tgt ctt ctc atc tcc tac act agc aac act ttc ccc 96
 Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 acg gat tat gtg cca act gtg ttc gat aat ttc agt gcc aat gtg att 144
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ile
 35 40 45
 gtt gat ggc aac act atc aac ttg gga ttg tgg gat act gca ggg caa 192
 Val Asp Gly Asn Thr Ile Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 gag gac tac aat aga cta aga cct ttg agc tat cgc ggt gca gat gtc 240
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80
 ttc tta ctt gca ttc tca ctt gtc agc aaa gct agc tat gaa aat gtt 288
 Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Val Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95

33

tct aaa aag tgg gtt cct gaa ctg aga cat tat gct cct ggt gtt ccc 336
 Ser Lys Lys Trp Val Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110

atc atc ctc gtt gga aca aag ctt gat ctt cga gat gat aag caa ttc 384
 Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

ttt gcc gag cac cct ggt gct gtg cct atc tct acc gct cag ggt gaa 432
 Phe Ala Glu His Pro Gly Ala Val Pro Ile Ser Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140

gaa cta aag aag ctg att ggg gcg cct gct tat atc gaa tgc agt gca 480
 Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ala
 145 150 155 160

aaa act caa cag aat gtg aaa gca gtg ttt gat gcg gct atc aag gtc 528
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175

gtt ctc cag cca cca aaa aac aag aag aag aag aga aaa tct cag 576
 Val Leu Gln Pro Pro Lys Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Ser Gln
 180 185 190

aaa ggt tgt tct ata ctc tga 597
 Lys Gly Cys Ser Ile Leu
 195

<210> 58

<211> 198

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 58

Met Ser Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30

Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ile
 35 40 45

Val Asp Gly Asn Thr Ile Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80

Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Val Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Val
 85 90 95

Ser Lys Lys Trp Val Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro
 100 105 110

Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

Phe Ala Glu His Pro Gly Ala Val Pro Ile Ser Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140

Glu Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ala Pro Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ala
 145 150 155 160

Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val
 165 170 175

Val Leu Gln Pro Pro Lys Asn Lys Lys Lys Lys Arg Lys Ser Gln
 180 185 190

Lys Gly Cys Ser Ile Leu
195

<210> 59
<211> 588
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(585)
<223> coding for RacB homologue
<400> 59
atg gcg tca agg ttt ata aag tgt gtg acc gtc gga gat ggt gcc gtc 48
Met Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val
1 5 10 15
gga aaa act tgc atg ctc att tct tac act agc aat act ttt cct act 96
Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr
20 25 30
gat tat gtg cca act gtt ttc gac aac ttc agt gct aat gtg gtt gtt 144
Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val
35 40 45
gat ggc aac act gtc aat ctt gga ttg tgg gat act gct ggt caa gag 192
Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
50 55 60
gac tac aac agg tta cga cct ttg agt tac cgt ggt gct gat gtt ttc 240
Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe
65 70 75 80
att ctt gct ttc tct ctt att agc aag gct agc tat gag aat ata gcc 288
Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Ile Ala
85 90 95
aag aag tgg att cct gag ctc agg cat tat gct cct ggt gtt ccc att 336
Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile
100 105 110
atc ctt gtt ggg aca aaa ctc gat ctt cga gat gac aag caa ttc ttt 384
Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe
115 120 125
ata gat cat cct ggt gct gtg cca att act aca aac cag gga gag gaa 432
Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Asn Gln Gly Glu Glu
130 135 140
ctg aag aaa ctg att gga tct gct gtc tac att gaa tgt agt tca aag 480
Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ser Ala Val Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys
145 150 155 160
aca cag cag aac gtg aag gca gtg ttt gat gca gct ata aaa gtg gtg 528
Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val
165 170 175
ctt cag cca cca aag cag aag aag aag aaa aag aat aag aac cgt tgc 576
Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Lys Asn Lys Asn Arg Cys
180 185 190
gcg ttc ttg tga 588
Ala Phe Leu
195

35

<210> 60
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 60
 Met Ala Ser Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val Val
 35 40 45
 Asp Gly Asn Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
 50 55 60
 Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val Phe
 65 70 75 80
 Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Ile Ala
 85 90 95
 Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Gly Val Pro Ile
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe Phe
 115 120 125
 Ile Asp His Pro Gly Ala Val Pro Ile Thr Thr Asn Gln Gly Glu Glu
 130 135 140
 Leu Lys Lys Leu Ile Gly Ser Ala Val Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile Lys Val Val
 165 170 175
 Leu Gln Pro Pro Lys Gln Lys Lys Lys Lys Lys Asn Lys Asn Arg Cys
 180 185 190
 Ala Phe Leu
 195

<210> 61
 <211> 606
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(603)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 61
 atg agc aca gca aga ttc att aag tgt gtg act gtc gga gat gga gca 48
 Met Ser Thr Ala Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 gtg gga aag act tgt atg ctc att tca tat acc agc aat acg ttt cct 96
 Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30
 acg gat tat gtt cca aca gtt ttc gac aac ttc agc gca aat gtg gtg 144
 Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45

36

gtc gac ggg agt acc gtg aac ctt ggc ctg tgg gat act gcc ggt cag 192
 Val Asp Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60

gaa gat tat aat agg ctt agg cct ttg agt tac aga gga gca gat gtc 240
 Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80

ttc tta tta gca ttt tcc ctt ata agc aag gcc agt tac gag aat att 288
 Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Ile
 85 90 95

cac aaa aag tgg ctt ccg gag ctg aaa cat tat gct cct ggc atc ccc 336
 His Lys Lys Trp Leu Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Ile Pro
 100 105 110

att gtg ctc gtc gga aca aaa tta gat ttg agg gat gac aag cag ttc 384
 Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

ttg aag gat cat cca gga gca gct tct ata aca act gct cag gga gaa 432
 Leu Lys Asp His Pro Gly Ala Ala Ser Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140

gaa tta agg aaa atg att gga gct gtt agg tac tta gag tgc agc tcc 480
 Glu Leu Arg Lys Met Ile Gly Ala Val Arg Tyr Leu Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160

aaa acc caa cag aat gtg aag gca gtg ttt gat aca gcg ata agg gta 528
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Thr Ala Ile Arg Val
 165 170 175

gct ttg agg cca cca aag gca aag aaa aag ata aaa cca ttg aag act 576
 Ala Leu Arg Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Ile Lys Pro Leu Lys Thr
 180 185 190

aag aga tca aga ata tgc ttt ttc cta taa 606
 Lys Arg Ser Arg Ile Cys Phe Phe Leu
 195 200

<210> 62

<211> 201

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 62

Met Ser Thr Ala Arg Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15

Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Asn Thr Phe Pro
 20 25 30

Thr Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Val
 35 40 45

Val Asp Gly Ser Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60

Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Val
 65 70 75 80

Phe Leu Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Lys Ala Ser Tyr Glu Asn Ile
 85 90 95

His Lys Lys Trp Leu Pro Glu Leu Lys His Tyr Ala Pro Gly Ile Pro
 100 105 110

Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Gln Phe
 115 120 125

37

Leu Lys Asp His Pro Gly Ala Ala Ser Ile Thr Thr Ala Gln Gly Glu
 130 135 140
 Glu Leu Arg Lys Met Ile Gly Ala Val Arg Tyr Leu Glu Cys Ser Ser
 145 150 155 160
 Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Thr Ala Ile Arg Val
 165 170 175
 Ala Leu Arg Pro Pro Lys Ala Lys Lys Lys Ile Lys Pro Leu Lys Thr
 180 185 190
 Lys Arg Ser Arg Ile Cys Phe Phe Leu
 195 200

<210> 63
 <211> 606
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(603)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 63
 atg gct tcg agt gct tca aaa ttc atc aaa tgt gtg act gtt gga gat 48
 Met Ala Ser Ser Ala Ser Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1 5 10 15
 ggt gcc gtt gga aaa act tgt atg ctc atc tgc tac act agc aac aaa 96
 Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
 20 25 30
 ttc cct act gac tac ata cca aca gtt ttt gac aac ttt agt gtt aat 144
 Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Val Asn
 35 40 45
 gtt gtg gtt gaa ggc atc act gtg aac tta ggc ctt tgg gac act gcc 192
 Val Val Val Glu Gly Ile Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60
 ggg caa gaa gac tat aac aga cta agg cct tta agt tac aga gga gca 240
 Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80
 gat gtt ttt gtg ttg gct ttc tca ttg atc agc cga gct agc tat gag 288
 Asp Val Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
 85 90 95
 aat gtg ttt aaa aag tgg atc cct gaa ctc caa cac ttt gca cca gga 336
 Asn Val Phe Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Phe Ala Pro Gly
 100 105 110
 gtc ccc att gtg ctt gtt ggt acc aaa atg gat ctt cgt gaa gat aga 384
 Val Pro Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Met Asp Leu Arg Glu Asp Arg
 115 120 125
 cat tac ttg tct gat cat cct gga ctg tcc ccg gta act aca tca cag 432
 His Tyr Leu Ser Asp His Pro Gly Leu Ser Pro Val Thr Thr Ser Gln
 130 135 140
 gga gag gaa ctc cgc aag cat atc gga gcg act tat tac att gaa tgt 480
 Gly Glu Glu Leu Arg Lys His Ile Gly Ala Thr Tyr Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160

38

agc tca aaa act caa cag aat gtg aaa gcc gta ttt gat gct gct att 528
 Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile
 165 170 175

aaa gta gta att aaa cca gca gtg aaa caa aag gag aag aag aag aag 576
 Lys Val Val Ile Lys Pro Ala Val Lys Gln Lys Glu Lys Lys Lys Lys
 180 185 190

cag aag cct cgc agc gga tgt ctc tcg taa 606
 Gln Lys Pro Arg Ser Gly Cys Leu Ser
 195 200

<210> 64

<211> 201

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 64

Met Ala Ser Ser Ala Ser Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1 5 10 15

Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
 20 25 30

Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Val Asn
 35 40 45

Val Val Val Glu Gly Ile Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60

Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80

Asp Val Phe Val Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
 85 90 95

Asn Val Phe Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Phe Ala Pro Gly
 100 105 110

Val Pro Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Met Asp Leu Arg Glu Asp Arg
 115 120 125

His Tyr Leu Ser Asp His Pro Gly Leu Ser Pro Val Thr Thr Ser Gln
 130 135 140

Gly Glu Glu Leu Arg Lys His Ile Gly Ala Thr Tyr Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ala Ala Ile
 165 170 175

Lys Val Val Ile Lys Pro Ala Val Lys Gln Lys Glu Lys Lys Lys Lys
 180 185 190

Gln Lys Pro Arg Ser Gly Cys Leu Ser
 195 200

<210> 65

<211> 648

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(645)

<223> coding for RacB homologue

<400> 65
 atg gct tca agt gct tca aag ttc atc aag tgt gtg act gtt ggt gat 48
 Met Ala Ser Ser Ala Ser Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1 5 10 15
 ggt gct gtt ggt aaa acc tgt atg ctc atc tgc tac acc agc aat aaa 96
 Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
 20 25 30
 ttc ccc act gac tac ata cca aca gtt ttt gac aac ttt agt gca aat 144
 Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn
 35 40 45
 gtt gtt gtt gaa ggc acc act gtc aat ttg ggg ctt tgg gac act gct 192
 Val Val Val Glu Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60
 ggg caa gaa gac tat aac aga tta agg cct tta agt tac agg gga gca 240
 Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80
 gat gtt ttc gtc ttg tct ttc tca tta gtc agc cga gct agc tac gag 288
 Asp Val Phe Val Leu Ser Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
 85 90 95
 aat gtt ttt aaa aag tgg atc cct gaa ctc caa cac ttt gct cca gga 336
 Asn Val Phe Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Phe Ala Pro Gly
 100 105 110
 gtt ccc ctt gtc ctt gtt ggt acc aaa tta gat ott cgt gaa gat aag 384
 Val Pro Leu Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys
 115 120 125
 cat tat ttg gct gat cat cct gga cta tcc cct gta act act gca cag 432
 His Tyr Leu Ala Asp His Pro Gly Leu Ser Pro Val Thr Thr Ala Gln
 130 135 140
 gga gag gag ttg cgt aag cta att ggt gcg acg tat tac att gag tgt 480
 Gly Glu Glu Leu Arg Lys Leu Ile Gly Ala Thr Tyr Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160
 agt tca aaa act caa cag aat gtg aaa gca gtt ttt gat tct gcg ata 528
 Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ser Ala Ile
 165 170 175
 aag gaa gtg atc aaa cct ctg gtt aaa caa aag gag aag act aag aag 576
 Lys Glu Val Ile Lys Pro Leu Val Lys Gln Lys Glu Lys Thr Lys Lys
 180 185 190
 aag aag aag caa aag tcg aat cac ggc tgt tta tca aat gtt ctg tgt 624
 Lys Lys Lys Gln Lys Ser Asn His Gly Cys Leu Ser Asn Val Leu Cys
 195 200 205
 ggg agg ata gtg act cgg cat tga 648
 Gly Arg Ile Val Thr Arg His
 210 215
 <210> 66
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 66
 Met Ala Ser Ser Ala Ser Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys
 20 25 30

40

Phe Pro Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn
 35 40 45
 Val Val Val Glu Gly Thr Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60
 Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80
 Asp Val Phe Val Leu Ser Phe Ser Leu Val Ser Arg Ala Ser Tyr Glu
 85 90 95
 Asn Val Phe Lys Lys Trp Ile Pro Glu Leu Gln His Phe Ala Pro Gly
 100 105 110
 Val Pro Leu Val Leu Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Glu Asp Lys
 115 120 125
 His Tyr Leu Ala Asp His Pro Gly Leu Ser Pro Val Thr Thr Ala Gln
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Arg Lys Leu Ile Gly Ala Thr Tyr Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160
 Ser Ser Lys Thr Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Ser Ala Ile
 165 170 175
 Lys Glu Val Ile Lys Pro Leu Val Lys Gln Lys Glu Lys Thr Lys Lys
 180 185 190
 Lys Lys Lys Gln Lys Ser Asn His Gly Cys Leu Ser Asn Val Leu Cys
 195 200 205
 Gly Arg Ile Val Thr Arg His
 210 215

<210> 67
 <211> 630
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(627)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 67
 atg agt gct tcg aag ttc ata aaa tgt gtt act gtt gga gat ggg gct 48
 Met Ser Ala Ser Lys Phe Ile Lys Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala
 1 5 10 15
 gtt ggg aag aca tgt atg ctt atc tgt tac act agc aac aag ttt cct 96
 Val Gly Lys Thr Cys Met Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Asn Lys Phe Pro
 20 25 30
 act gat tat ata ccg act gtg ttc gac aat ttc agt gcc aat gta gct 144
 Thr Asp Tyr Ile Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Ser Ala Asn Val Ala
 35 40 45
 gtg gat gga caa atc gtt aat tta ggg cta tgg gac act gcc ggt caa 192
 Val Asp Gly Gln Ile Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln
 50 55 60
 gaa gat tac agt agg tta aga cca ttg agt tat aga gga gct gat atc 240
 Glu Asp Tyr Ser Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala Asp Ile
 65 70 75 80

Arg Lys Gln Ile Gly Ala Ala Ala Tyr Ile Glu Cys Ser Ser Lys Thr
 145 150 155 160
 Gln Gln Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Thr Ala Ile Lys Val Val Leu
 165 170 175
 Gln Pro Pro Arg Arg Lys Glu Val Pro Arg Arg Arg Lys Asn His Arg
 180 185 190
 Arg Ser Gly Cys Ser Ile Ala Ser Ile Val Cys Gly Gly Cys Thr Ala
 195 200 205
 Ala

<210> 69
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(597)
 <223> coding for RacB homologue

<400> 69
 atg gct gca aca tca aca tca tca gca aca gct aca acg ttt ata aag 48
 Met Ala Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ala Thr Ala Thr Thr Phe Ile Lys
 1 5 10 15
 tgt gtc act gtt ggc gat gga gct ctt ttg gtg act gtt gag atc ttg 96
 Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Leu Leu Val Thr Val Glu Ile Leu
 20 25 30
 tta tta cag gat tat gtt cca aca gtg ttc gac aat ttc aat gct aat 144
 Leu Leu Gln Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Asn Ala Asn
 35 40 45
 gtt tta gtc gat ggt aaa act gtc aat ctg ggt ctc tgg gat act gct 192
 Val Leu Val Asp Gly Lys Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60
 ggt caa gaa gac tac aat agg gtt aga cca ttg agt tac aga gga gca 240
 Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Val Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80
 gat gtt ttc att ctt gcc ttc tca ctt att agc agg cct agc ttt gag 288
 Asp Val Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Arg Pro Ser Phe Glu
 85 90 95
 aac att gct aaa aag tgg gta ccc gag ctg aga cat tat gcc ccg act 336
 Asn Ile Ala Lys Lys Trp Val Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Thr
 100 105 110
 gtg cct att gtt ctt gtg gga acc aaa tca gat cta aga gac aac atg 384
 Val Pro Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Ser Asp Leu Arg Asp Asn Met
 115 120 125
 cag ttc cca aag aat tat cca ggt gct tgc aca atc ttc cca gaa cag 432
 Gln Phe Pro Lys Asn Tyr Pro Gly Ala Cys Thr Ile Phe Pro Glu Gln
 130 135 140
 ggt caa gaa cta aga aag gaa ata gga gca tta gca tac ata gag tgc 480
 Gly Gln Glu Leu Arg Lys Glu Ile Gly Ala Leu Ala Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160

43

agc tca aaa gca caa atg aac gta aaa gcc gtg ttt gat gaa gcg atc 528
 Ser Ser Lys Ala Gln Met Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Glu Ala Ile
 165 170 175

aaa gta gtt tta cat cct cct tca aag act aag aag cga aag aga aag 576
 Lys Val Val Leu His Pro Pro Ser Lys Thr Lys Lys Arg Lys Arg Lys
 180 185 190

atc ggt tta tgc cat gtt ctt tga 600
 Ile Gly Leu Cys His Val Leu
 195

<210> 70

<211> 199

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 70

Met Ala Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ala Thr Ala Thr Thr Phe Ile Lys
 1 5 10 15

Cys Val Thr Val Gly Asp Gly Ala Leu Leu Val Thr Val Glu Ile Leu
 20 25 30

Leu Leu Gln Asp Tyr Val Pro Thr Val Phe Asp Asn Phe Asn Ala Asn
 35 40 45

Val Leu Val Asp Gly Lys Thr Val Asn Leu Gly Leu Trp Asp Thr Ala
 50 55 60

Gly Gln Glu Asp Tyr Asn Arg Val Arg Pro Leu Ser Tyr Arg Gly Ala
 65 70 75 80

Asp Val Phe Ile Leu Ala Phe Ser Leu Ile Ser Arg Pro Ser Phe Glu
 85 90 95

Asn Ile Ala Lys Lys Trp Val Pro Glu Leu Arg His Tyr Ala Pro Thr
 100 105 110

Val Pro Ile Val Leu Val Gly Thr Lys Ser Asp Leu Arg Asp Asn Met
 115 120 125

Gln Phe Pro Lys Asn Tyr Pro Gly Ala Cys Thr Ile Phe Pro Glu Gln
 130 135 140

Gly Gln Glu Leu Arg Lys Glu Ile Gly Ala Leu Ala Tyr Ile Glu Cys
 145 150 155 160

Ser Ser Lys Ala Gln Met Asn Val Lys Ala Val Phe Asp Glu Ala Ile
 165 170 175

Lys Val Val Leu His Pro Pro Ser Lys Thr Lys Lys Arg Lys Arg Lys
 180 185 190

Ile Gly Leu Cys His Val Leu
 195

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 71

atgagcgcgt ccaggttcat a

<210> 72
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 72
 atcaaacacg cccttcacgt t 21

<210> 73
 <211> 10828
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: transgenic
 expression vector pSUN3NIT_AtRacB_s for expression
 of A-thaliana RacB sense RNA

<400> 73
 ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
 ttattctaataa aaacgctctt ttctcttagg tttaccgcgc aatataatcct gtcaaact 120
 gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
 tgattacgcc aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatccccca tcaagatctt 240
 ggtgatgtag caagagctaa gttgtacttc gatycggttg gacattactc gagaccagat 300
 gttttacact tgaccgtaaa tgagcaccgg aagaaaccgg taacattcat ttcgaaggta 360
 gagaaagcgg aagatgactc aaacaagtaa tcggttggtga ttcgtcagtt catgtcactc 420
 ctatgaagga gtcaagttca aatggttatg ttgagtttca aacttttatg ctaaactttt 480
 tttcttaatt ttcgtaata atggaagaga accaattctc ttgtatctaa agattatcca 540
 tctatcatcc aatttgagtg ttcaattctg gatgttggtg taccctacat tctacaacca 600
 tgtagccaat tattatgaat ctggctttga tttcagttgt gttcttttct ttttttcttt 660
 gcatatttgc atttagaatg ttaataaatt aagttactgt atttccacat acattagttc 720
 caagaatata catatattaa tttatttttc ttaaaaatgt tttggaatga ctaaatattga 780
 caacgaaaat agaagctatg ctaaaccatt acgtatatgt gacttccacat gttggtggtt 840
 tacattccct atatatatgg atggctgtca caatcagaaa cgtgatcgaa aaaagacaaa 900
 cagtgtttgc ataaaaagac ttttctggtt cattgacaat ttgtgtttat ttgtaaagaa 960
 aagtggcaaa gtggaatttg agttcctgca agtaagaaag atgaaataaa agacttgagt 1020
 gtgtgttttt ttcttttatc tgaaagctgc aatgaaatat tcctaccaag cccgtttgat 1080
 tattaattgg gggttggttt tcttgatgcg aactaattgg ttatataaga aactatacaa 1140
 tccatgttaa ttcaaaaatt ttgatttctc ttgtaggaat atgatttact atatgagact 1200
 ttcttttcgc caataatagt aatccaaag atatttgacc ggacccaaac acattgatct 1260
 attttttagt ttatttaatc cagtttctct gagataattc attaaggaaa acttagtatt 1320
 aacctatcct aagattaaat aggagccaaa ctcacatttc aatattaaa taacataaaa 1380
 tggatttaaa aatctatc gtcaaatttt atttatgaca tttcttattt aaatttatat 1440
 ttaatgaaat acagctaaga caaaccaaaa aaaaaatact ttctaagtgg tccaaaacat 1500
 caattccggt caatattatt aggtagaatc gtacgaccaa aaaaggtagg ttaatacgaa 1560
 attacaaca tatctatata catagtatat attattacct attatgagga atcaaaatgc 1620
 atcaaatatg gatttaagga atccataaaa gaataaattc tacggaaaaa aaaaaagaa 1680
 taaattcttt taagttttta atttgtttt tatttggtag ttctccattt tgttttattt 1740
 cgtttgatt tattgtgtcc aaatactttg taaaccaccg ttgtaattct taaacgggggt 1800
 tttcacttct tttttatatt cagacataaa gcatcggctg gtttaatcaa tcaatagatt 1860
 ttatttttct totcaattat tagtaggttt gatgtgaact ttacaaaaaa aacaaaaaca 1920
 aatcaatgca gagaaaagaa accacgtggg ctagtcccac ctgttttcat ttccaccaca 1980
 ggttcgatct tcgttac'cgt ctccaatagg aaaataaacg tgaccacaaa aaaaaaaca 2040
 aaaaaagtc tatatattgc ttctctcaag tctctgagtg tcatgaacca aagtaaaaaa 2100
 caaagactcg agtggatccc cggaattcgc ccttatgagc gcatcaaggt tcataaagtg 2160
 cgtcaccggt ggtgatggag ctggttggtaa aacctgtttg ctgatttctt ataccagcaa 2220
 cacctttccc acggnatattc atcaatcatt ctccctcctt tttttgatat ctgattcatt 2280

tgattctgat	tgtgccatat	atgaattggg	atccatacat	actaaaaatg	ttgtatacat	2340
ttccattgga	acaggattat	gttccgactg	ttttcgataa	ctttagtgca	aatgtgggtg	2400
tcaatggggc	cacggtgaat	cttggattgt	gggatactgc	aggtaaatga	atgatgatcc	2460
aattcataat	ccttgggtgag	agagctttcc	gtgatgaatc	agaggtcgaa	attatgtttt	2520
tggtttatgc	agggcaagag	gactataaca	gattaagacc	tttgagttac	cgtgggtgctg	2580
atgttttcat	tcttgccttc	tctctcatta	gtaaggctag	ttatgagaat	gtttccaaga	2640
aggtcagttt	cgtccgaact	ggtcgactat	ttaacaattg	agagttccaa	atthttgatgc	2700
ttcttttctt	ttacagtgga	ttcctgagtt	gaagcactat	gctcctgggtg	tccaattgt	2760
ccttgttggg	accaaactag	gttacttcct	cctctcacat	ttgtccttgt	ttatgcattt	2820
atthtatatat	atgtctgatt	cccatgctta	cactgccatt	ttccttttca	ctthattaag	2880
ctgctctgggt	ataatatata	tcatgacatt	agtggacata	aaacttcacc	ttctcttgat	2940
tgtggttaaa	acttgtacat	gttcaagatg	tattcgttag	gtgaaactga	gggtagtttt	3000
cagagaatat	cattgggtcaa	caggcttctt	cttgtatctt	gcacttcttg	tgataaagca	3060
accgtatcct	ataacacacg	cctttaagca	tcctccaatg	aaatagctac	tgatatagcaa	3120
gtgtataacct	ttataaaaga	cacttgcaag	atcttcagtc	aactcatgat	cctggccttt	3180
ttgattgtct	aaccttgggtt	gttgtcagat	cttcgagatg	acaacacagt	ttcatcgac	3240
catcctgggtg	ctgtccctat	taccactgtt	caggtaagaa	tacagttatt	tcctcagtgc	3300
aatthttatca	gctttaccac	cgtaagcat	tttccctctc	tgcatggaag	ggagaggagc	3360
tgaagaagct	aattgggagcg	ccagcttaca	tcgagtgcag	ttcaaaatca	caagaggtaa	3420
acgaataaaa	gacatctcat	gaatcatctt	ttcgggtgta	gattcttctt	ttthttgatga	3480
aaacaatgtg	actataactg	cagaacgtga	agggcgtggt	tgataagggc	gaattaattc	3540
actggccgctc	gtthttacaac	gactcagagc	ttgacaggag	gcccgatcta	gtaacataga	3600
tgacaccgcg	cgcgataatt	tatectagtt	tgccgctat	atthttgttt	ctatcgcgta	3660
ttaaatgtat	aattgcccggg	ctctaactcat	aaaaaccat	ctcataaata	acgtcatgca	3720
ttacatgtta	attattacat	gcttaacgta	attcaacaga	aattatatga	taatcatcgc	3780
aagaccggca	acaggattca	atcttaagaa	actthattgc	caaatgtttg	aacgatcggg	3840
gatcatccgg	gtctgtggcg	ggaactccac	gaaaatatcc	gaaccgagca	agatctagag	3900
cttgggtccc	gctcagaaga	actcgtcaag	aaggcgatag	aaggcgatgc	gctgcgaatc	3960
gggagccggcg	ataccgtaaa	gcaccgagaa	gccgtcagcc	cattccgccc	caagctcttc	4020
agcaatatca	cgggtagcca	acgctatgtc	ctgatagcgg	tcgccacac	ccagccggcc	4080
acagtcgatg	aatccagaaa	agccggccatt	ttccaccatg	atattccgca	agcaggcatc	4140
gccatgggtc	acgacgagat	cctcggccgtc	gggcatgcgc	gccttgagcc	tgccgaacag	4200
ttcggctggc	gcgagcccct	gatgctcttc	gtccagatca	tcctgatcga	caagaccggc	4260
ttccatccga	gtacgtgctc	gctcagatgcg	atgtttcgct	tggtggtcga	atgggcagggt	4320
agccggatca	agcgtatgca	gcccggcgc	tgcatcagcc	atgatggata	cttctcggc	4380
aggagcaagg	tgagatgaca	ggagatcctg	ccccggcact	tcgccaata	gcagccagtc	4440
ccttcccgcct	tcagtgacaa	gctcagacac	agctgcgcaa	ggaaccgccc	tcgtggccag	4500
ccacgatagc	cgcgctgcct	cgtcctgcag	ttcattcagg	gcaccggaca	ggtcggctctt	4560
gacaaaaaga	accgggccc	cctcgcgtga	cagccggaac	accggcggcat	cagagcagcc	4620
gattgtctgt	tgtgcccag	catagccgaa	tagcctctcc	acccaagcgg	ccggagaacc	4680
tgctgtgcaat	ccatcttgg	caatcatgcg	aaacgatcca	gatccgggtc	agattatttg	4740
gattgagagt	gaatatgaga	ctctaattgg	ataccgaggg	gaatttatgg	aacgtcagtg	4800
gagcattttt	gacaagaaat	atthgtctagc	tgatagtgc	cttaggcgac	ttthgaaccg	4860
gcaataatgg	tttctgacgt	atgtgcttag	ctcattaaac	tcagaaaacc	cgcggctgag	4920
tggctccttc	aacgttgcgg	ttctgtcagt	tccaaacgta	aaacggcttg	tcgccgctca	4980
tcggcggggg	tcataacgtg	actcccttaa	ttctccgctc	atgatcagat	tgctgtttcc	5040
cgccttcagt	ttaaactatc	agtthttgac	aggatcctgc	ttggtaataa	ttgtcattag	5100
attgtthttta	tgcatagatg	cactcgaat	cagccaatth	tagacaagta	tcaaacggat	5160
gttaattcag	tacattaaag	acgtccgcaa	tgtgttatta	agttgtctaa	gcgtcaatth	5220
gtttacacca	caatatatcc	tgccaccagc	cagccaacag	ctccccgacc	ggcagctcgg	5280
cacaaaatca	ccaccggtta	ccaccagccc	ggccggccc	atgggtgtga	ccgtgttcgc	5340
cggcattgcc	gagttcagagc	gttccctaat	catcagaccg	accggagcg	ggcgcgaggg	5400
cgccaaaggcc	cgaggcgtga	agthttggccc	ccgcccctacc	ctcaccgccc	cacagatcgc	5460
gcaccgcccgc	gagctgatcg	accaggaagg	ccgcaccgtg	aaagaggcgg	ctgcaactgct	5520
tggcgtgcat	cgcctgaccc	tgtaccgccc	acttgagcgc	agcgaggaag	tgaccgcccac	5580
cgaggccagg	cggcgcgggtg	ccttccgctga	ggaccgattg	accgaggccc	accgcccggc	5640
ggccgcccag	aatgaaccgc	aagaggaaca	agcatgaaac	cgcaccagga	cggccaggac	5700

gaaccgtttt	tcattaccga	agagatcgag	gcgagatga	tcgcggccgg	gtacgtgttc	5760
gagccgcccc	cgcacgtctc	aaccgtgccg	ctgcatgaaa	tcctggccgg	tttgtctgat	5820
gccaaagctgg	cggcctggcc	ggccagcttg	gccgctgaag	aaaccgagcg	ccgccgtcta	5880
aaaagggtgat	gtgtatttga	gtaaaacagc	ttgcgtcatg	cggtcgtctc	gtatatgatg	5940
cgatgagtaa	ataaacaat	acgcaagggg	aacgcatgaa	ggttatcgct	gtacttaacc	6000
agaaaggcgg	gtcaggcaag	acgaccatcg	caaccatct	agcccgcgcc	ctgcaactcg	6060
ccggggccga	tgttctgtta	gtcgattccg	atccccaggg	cagtgcccg	gattgggccc	6120
ccgtgcggga	agatcaaccg	ctaaccgttg	tcggcatoga	ccgcccagc	attgaccgcg	6180
acgtgaaggc	catcgccgg	cgcgacttcc	tagtgatoga	cggagcggcc	caggcggcgg	6240
acttggtctg	gtccgcgac	aaggcagccg	acttcgtgct	gattccggtg	cagccaagcc	6300
cttacgacat	atgggccc	gccgacctgg	tggagctggt	taagcagcgc	attgaggtca	6360
cggatggaag	gtacaagcg	gcctttgtcg	tgtcgcgggc	gatcaaaggc	acgcgcatcg	6420
gcggtgaggt	tgccgaggcg	ctggccgggt	acgagctgcc	cattcttgag	tcccgtatca	6480
cgcagcgcgt	gagctaccca	ggcactgccg	ccgccggcac	aaccgttctt	gaatcagaac	6540
ccgagggcga	cgtgcccgc	gaggtccagg	cgctggccgc	tgaaattaa	tcaaaactca	6600
tttgagttaa	tgaggtaaag	agaaaatgag	caaaagcaca	aacacgctaa	gtgccggccc	6660
tccgagcgca	cgcagcagca	aggctgcaac	gttggccagc	ctggcagaca	cgccagccat	6720
gaagcgggtc	aactttcagt	tgccggcgga	ggatcacacc	aagctgaaga	tgtacgcggt	6780
acgccaaggc	aagaccatta	ccgagctgct	atctgaatac	atcgcgcagc	taccagagta	6840
aatgagcaaa	tgaataaatg	agtagatgaa	ttttagcggc	taaaggaggc	ggcatggaaa	6900
atcaagaaca	accaggcacc	gacgccgtgg	aatgcccct	gtgtggagga	acgggcccgt	6960
ggccaggcgt	aagcggctgg	gttgtctgcc	ggccctgcaa	tggcactgga	acccccaaagc	7020
ccgaggaatc	ggcgtgagcg	gtcgcaaacc	atccggccc	gtacaaatcg	gocgcccgtc	7080
gggtgatgac	ctggtggaga	agttgaaggc	cgcgcaggcc	gcccagcggc	aacgcatcga	7140
ggcagaagca	cgccccgggtg	aatcgtggca	agcggcccgt	gatcgaatcc	gcaaagaatc	7200
ccggcaaccg	ccggcagccg	gtgcgccgtc	gattaggaag	ccgcccaagg	gcgacgagca	7260
accagatttt	ttcgttccga	tgctctatga	cgtgggcacc	cgcgatagtc	gcagcatcat	7320
ggacgtggcc	gttttccgtc	tgctgaagcg	tgaccgacga	gctggcgagg	tgatccgcta	7380
cgagcttcca	gacgggcacg	tagaggtttc	cgcagggccc	gccggcatgg	ccagtgtgtg	7440
ggattacgac	ctggtactga	tggcggtttc	ccatctaacc	gaatccatga	accgataccg	7500
ggaagggaa	ggagacaagc	ccggccgcgt	gttccgtcca	caggttgccg	acgtactcaa	7560
gttctgccgg	cgagccgatg	gcggaaagca	gaaagacgac	ctggtagaaa	cctgcattcg	7620
gttaaaccac	acgcacgttg	ccatgcagcg	tacgaagaag	gccaagaacg	gccgcctggg	7680
gacggtatcc	gaggggtgaag	ccttgattag	ccgctacaag	atcgtaaaga	gcgaaaaccg	7740
gcggccggag	tacatcgaga	tcgagctagc	tgattggatg	taccgcgaga	tcacagaagg	7800
caagaaccgg	gacgtgctga	cggttcaccc	cgattacttt	ttgatcgatc	ccggcatcgg	7860
ccgttttctc	taccgcctgg	cacgcgcgc	cgcaggcaag	gcagaagcca	gatggttgtt	7920
caagacgatc	tacgaacgca	gtggcagcgc	cggagagttc	aagaagtct	gtttcaccgt	7980
gcgcaagctg	atcgggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	aggcggggca	8040
ggctggcccc	atcctagtca	tgcgctaccg	caacctgatc	gagggcgaag	catccgcccg	8100
ttcctaagt	acggagcaga	tgctagggca	aattgcccta	gcaggggaaa	aaggtcgaaa	8160
aggtctcttt	cctgtggata	gcacgtacat	tgggaacca	aagccgtaca	ttgggaaccg	8220
gaaccgctac	attgggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggtcacaca	tgtaagtgc	8280
tgatataaaa	gagaaaaaag	gcgatttttc	cgctaaaac	tctttaaaac	ttattaaac	8340
tcttaaaacc	cgctggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	aagagctgca	8400
aaaagcgcct	acccttcggg	cgctgcgctc	cctacgcccc	gccgcttcgc	gtcggcctat	8460
cgccggccgct	ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	cagggcgcgg	8520
acaagccgcg	cgctcgccac	tcgaccgccg	gcgccacat	caaggcacc	tgctcgcgc	8580
gtttcggtga	tgacggtgaa	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	8640
gtctgtaagc	ggatgccggg	agcagacaag	ccgctcaggg	cgcgtcagcg	ggtgttggcg	8700
ggtgtcgggg	cgcagccatg	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtat	actggcttaa	8760
ctatgcggca	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcacat	atgcccgtgtg	aaataccgca	8820
cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttctctgc	tactgactc	8880
gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgccggcagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtataacg	8940
gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaa	gccagcaaaa	9000
ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggtctc	gccccctga	9060
cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagag	gactataaag	9120

```

ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct 9180
taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gogctttctc atagctcacg 9240
ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggctgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc 9300
ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 9360
aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta 9420
tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac 9480
agtattttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc 9540
ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt tttgtttgca agcagcagat 9600
tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc 9660
tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg catgatatac ctcccaattt 9720
gtgtagggct tattatgcac gcttaaaaaa aataaaagca gacttgacct gatagtttgg 9780
ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcatcta acgcttgagt taagccgcgc cgcaagcggg 9840
cgtcggcttg aacgaatttc tagctagaca ttatttgccg actaccttgg tgatctcgcc 9900
tttcacgtag tggacaaatt cttccaactg atctgcgcgc gaggccaagc gatcttcttc 9960
ttgtccaaga taagcctgtc tagcttcaag tatgacgggc tgatactggg ccggcaggcg 10020
ctccattgcc cagtcggcag cgacatcctt cggcgcgatt ttgcccggta ctgcgctgta 10080
ccaaatgcgg gacaacgtaa gcaactacat tcgctcatcg ccagcccagt cgggcccggcga 10140
gttccatagc gttaaggttt catttagcgc ctcaaataga tcctgttcag gaaccggatc 10200
aaagagttcc tccgccgctg gacctacca ggcaacgcta tgttctcttg cttttgtcag 10260
caagatagcc agatcaatgt cgatcgtggc tggctcgaag atacctgcaa gaatgtcatt 10320
gcgctgccat tctccaaatt gcagttcgcg cttagctgga taacgccacg gaatgatgtc 10380
gtcgtgcaca acaatggtga cttctacagc gcggagaatc tcgctctctc caggggaagc 10440
cgaagtttcc aaaaggtcgt tgatcaaagc tcgccgcggt gtttcatcaa gccttacggt 10500
caccgtaacc agcaaatcaa taccactgtg tggcttcagg ccgccatcca ctgcccagcc 10560
gtacaaatgt acggccagca acgtcgggtc gagatggcgc tcgatgacgc caactacctc 10620
tgatagttga gtcgatactt cggcgatcac cgcttcccc atgatgttta actttgtttt 10680
agggcgactg ccctgctgcg taacatcgtt gctgctccat aacatcaaac atcgaccac 10740
ggcgtaacgc gcttgctgct tggatgcccg aggcatagac tgtaccccaa aaaaacagtc 10800
ataacaagcc atgaaaaccg ccaactgcg 10828

```

<210> 74

<211> 10828

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: transgenic
expression vector pSUN3NIT_AtRacB_as for
expression of A-thaliana RacB antisense RNA

<400> 74

```

ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaat aaacgctctt ttctcttagg tttaccgcgc aatataatcct gtcaaacact 120
gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcac gcctgcaggc cgactctaga ggatccccca tcaagatctt 240
ggtgatgtag caagagctaa gttgtacttc gatycggttg gacattactc gagaccagat 300
gttttacact tgaccgtaaa tgagcaccgc aagaaaccgg taacattcat ttcgaaggta 360
gagaaagcgg aagatgactc aaacaagtaa tcggttgtga ttcgtcagtt catgtcactc 420
ctatgaagga gtcaagttca aaatgttatg ttgagtttca aacttttatg ctaaactttt 480
tttcttaatt ttcgtaata atggaagaga accaattctc ttgtatctaa agattatcca 540
tctatcatcc aatttgagtg ttcaattctg gatgttgtgt taccctacat tctacaacca 600
tgtagccaat tattatgaat ctggccttga tttcagttgt gttcttttct tttttctttt 660
gcatatttgc atttagaatg ttttaataat aagttactgt atttccacat acattagttc 720
caagaatata catatattaa tttatttttc ttaaaaatgt tttggaatga ctaatattga 780
caacgaaaat agaagctatg ctaaaccatt acgtatatgt gacttcacat gttgttgttt 840
tacattccct atatatatgg atggctgtca caatcagaaa cgtgatcgaa aaaagacaaa 900
cagtgtttgc ataaaaagac tatttcggtt cattgacaat ttgtgtttat ttgtaaagaa 960
aagtggcaaa gtggaatttg agttcctgca agtaagaaag atgaaataaa agacttgagt 1020
gtgtgttttt ttctttttatc tgaaagctgc aatgaaatat tcctaccaag cccgtttgat 1080

```

tattaattgg	ggtttggtt	tcttgatgcg	aactaattgg	ttatataaga	aactatacaa	1140
tccatgtaa	ttcaaaaatt	ttgatttctc	ttgtaggaat	atgatttact	atatgagact	1200
ttcttttcgc	caataatagt	aatccaaag	atatttgacc	ggaccaaaac	acattgatct	1260
atTTTTtagt	ttatttaatc	cagtttctct	gagataattc	attaaggaaa	acttagtatt	1320
aaccatcct	aagattaat	aggagccaaa	ctcacatttc	aaatattaaa	taacataaaa	1380
tggattttaa	aaatctatac	gtcaaatttt	atztatgaca	tttcttattt	aaatttata	1440
ttaatgaaat	acagctaaga	caaaccaaaa	aaaaaatact	ttctaagtgg	tccaaaacat	1500
caattccggt	caatattatt	aggtagaatc	gtacgaccaa	aaaaggtagg	ttaatacгаа	1560
attacaaaca	tatctatata	catagtatat	attattacct	attatgagga	atcaaaatgc	1620
atcaaatatg	gatttaagga	atccataaaa	gaataaatc	tacggaaaaa	aaaaaaagaa	1680
taaattcttt	taagttttta	atTTgtttt	tatttggtag	ttctccattt	tgttttattt	1740
cgTTtggtt	tattgtgtcc	aaatactttg	taaaccaccg	ttgtaattct	taaacggggg	1800
tttcacttct	tttttatatt	cagacataaa	gcacgggctg	gtttaatcaa	tcaatagatt	1860
ttatttttct	tctcaattat	tagtaggTtt	gatgtgaact	ttacaaaaaa	aacaaaaaca	1920
aatcaatgca	gagaaaagaa	accacgtggg	ctagtccac	cttgtttcat	ttccaccaca	1980
ggttcgatct	tcgttaccgt	ctccaatagg	aaaataaacg	tgaccacaaa	aaaaaaacaa	2040
aaaaaaagtc	tatatattgc	ttctctcaag	tctctgagtg	tcatgaacca	aagtaaaaaa	2100
caaagactcg	agtggatccc	cggaattcgc	ccttatcaaa	cacgcccttc	acgttctgca	2160
gttatagtca	cattgttttc	atcaaaaaaa	gaagaatcta	acaccgaaaa	gatgattcat	2220
gagatgtctt	ttattcgttt	acctcttgTg	atTTTgaact	gcactcgatg	taagctggcg	2280
ctccaattag	cttcttcagc	tcctctccct	tccatgcaga	gagggaaaaat	gcttaacggg	2340
ggtaaagctg	ataaaattgc	actgaggaaa	taactgtatt	cttacctgaa	cagtggtaat	2400
agggacagca	ccaggatggg	cgatgaaaaa	ctgtttgtca	tctcgaagat	ctgacaacaa	2460
ccaagggttag	acaatcaaaa	aggccaggat	catgagttga	ctgaagatct	tgcaagtgtc	2520
ttttataaag	gtatacactt	gctatacagt	agctatttca	ttggaggatg	cttaaaggcg	2580
tgtgttatag	gatacggTtg	ctttatcaca	agaagtgcaa	gatacaagaa	gaagcctgtt	2640
gaccaatgat	attctctgaa	aactaccctc	agtttcacct	aacgaataca	tcttgaacat	2700
gtacaagTtt	taaccacaat	caagagaagg	tgaagTttta	tgtccactaa	tgtcatgata	2760
tatattatac	cagagcagct	taataaagtg	aaaaggaaaa	tggcagtgtg	agcatgggaa	2820
tcagacatat	atataaataa	atgcataaac	aaggacaaat	gtgagaggag	gaagtaacct	2880
agTttggTtc	caacaaggac	aattgggaca	ccaggagcat	agtgtctcaa	ctcaggaatc	2940
cactgtaaaa	gaaaagaagc	atcaaaaattt	ggaactctca	attgttaa	agtcgaccag	3000
ttcggacgaa	actgaccttc	ttggaaacat	tctcataact	agccttacta	atgagagaga	3060
aggcaagaat	gaaaacatca	gcaccacggg	aactcaaagg	tcttaatctg	ttatagtctt	3120
cttgccctgc	ataaaccaaa	aacataaattt	cgacctctga	ttcatcacgg	aaagctctct	3180
caccaaggat	tatgaattgg	atcatcattc	atTTTacctgc	agtatcccac	aatccaagat	3240
tcaccgtggc	cccattgaca	accacatttg	cactaaagtt	atcgaaaaaca	gtcggaacat	3300
aatcctgttc	caatggaaat	gtatacaaca	tttttagtat	gtatggatcc	caattcatat	3360
atggcacaat	cagaatcaaa	tgaatcagat	atcaaaaaaa	ggagggagaa	tgattgatga	3420
atanccgtgg	gaaaggtgtt	gctggtataa	gaaatcagca	aacaggTttt	accaacagct	3480
ccatcaccaa	cggtgacgca	ctttatgaac	cttgatgCGc	tcataagggc	gaattaattc	3540
actggccgTc	gttttacaac	gactcagagc	ttgacaggag	gcccgatcta	gtaacataga	3600
tgacaccgCG	cgcgataaatt	tatcctagtt	tgcgcgctat	atTTTgtttt	ctatcgcgta	3660
ttaaatgtat	aattgCGgga	ctcta	ataaacccat	ctcataaata	acgtcatgca	3720
ttacatgtta	attattacat	gcttaacgta	attcaacaga	aattatatga	taatcatcgc	3780
aagaccggca	acaggattca	atcttaagaa	actttattgc	caaatgtttg	aacgatcggg	3840
gatcatccgg	gtctgtggcg	ggaactccac	gaaaatatcc	gaacgcagca	agatctagag	3900
ctTgggtccc	gctcagaaga	actcgtcaag	aaggcgatag	aaggcgatgc	gctgCGaatc	3960
gggagcggcg	ataccgtaaa	gcacgaggaa	gcggtcagcc	cattcgcCGc	caagctcttc	4020
agcaatatca	cgggtagcca	acgctatgtc	ctgatagcgg	tccgccacac	ccagcCGgcc	4080
acagtcgatg	aatccagaaa	agcggccatt	ttccaccatg	atattcggca	agcagggcatc	4140
gccatgggtc	acgacgagat	cctcgcCGtc	gggcatgCGc	gccttgagcc	tggcgaacag	4200
ttcggctggc	gcgagccctt	gatgctcttc	gtccagatca	tctctgatcga	caagaccggc	4260
ttccatccga	gtacgtgctc	gctcgatgCG	atgtttcCGct	tggTggTcga	atgggCaggt	4320
agccggatca	agcgtatgca	gccgCGcat	tgcacagcc	atgatggata	ctttctcggc	4380
aggagcaagg	tgagatgaca	ggagatcctg	ccccggcact	tCGcccaata	gcagccagtc	4440
ccttcccgct	tcagtgacaa	cgtcGagcac	agctcGcGaa	ggaacgcccg	tCGTggccag	4500

ccacgatagc	cgcgctgcct	cgtcctgcag	ttcattcagg	gcaccggaca	ggtcggctctt	4560
gacaaaaaga	accgggcgcc	cctgcgctga	cagccggaac	acggcggcat	cagagcagcc	4620
gattgtctgt	tgtgcccgag	catagccgaa	tagcctctcc	acccaagcgg	ccggagaacc	4680
tgcgtgcaat	ccatcttggt	caatcatgcy	aaacgatcca	gatccgggtgc	agattatctg	4740
gattgagagt	gaatatgaga	ctctaattgg	ataccgaggg	gaatttatgg	aacgtcagtg	4800
gagcattttt	gacaagaaat	atctgctagc	tgatagtgac	cttaggcgac	ttttgaacgc	4860
gcaataatgg	tttctgacgt	atgtgcttag	ctcattaaac	tccagaaacc	cgcggtctgag	4920
tggctccttc	aacgttgcyg	ttctgctcag	tccaaacgta	aaacggcttg	tcccgcgtca	4980
tcggcggggg	tcataacgtg	actcccttaa	ttctccgctc	atgatcagat	tgtcgtttcc	5040
cgccttcagt	ttaaactatc	agtgtttgac	aggatcctgc	ttggtaataa	ttgtcattag	5100
attgttttta	tgcatagatg	cactcgaaat	cagccaattt	tagacaagta	tcaaaccgat	5160
gttaattcag	tacattaaag	acgtccgcaa	tgtgttatta	agttgtctaa	gcgtcaattt	5220
gtttacacca	caatataatc	tgccaccagc	cagccaacag	ctccccgacc	ggcagctcgg	5280
cacaaaatca	ccacgcgtta	ccaccacgcc	ggcggggcgc	atggtgttga	ccgtgttcgc	5340
cggcattgcc	gagttcgagc	gttcccta	catcgaccgc	acccggagcg	ggcgcgaggg	5400
cgccaaggcc	cgagggcgtg	agtttggccc	ccgcctacc	ctcaccggg	cacagatcgc	5460
gcacgcccgc	gagctgatcg	accaggaagg	ccgcaccgtg	aaagaggcgg	ctgcactgct	5520
tggcgtgcat	cgctcgacc	tgtaccgcy	acttgagcgc	agcggaggaag	tgacgcccac	5580
cgaggccagg	cgggcgggtg	ccttccgtga	ggacgcattg	accgaggccg	acgcccctgg	5640
ggccgcccag	aatgaacgcc	aagaggaaca	agcatgaaac	cgcaccagga	cggccaggac	5700
gaaccgtttt	tcattaccga	agagatcgag	gcyggagatga	tcgcyggcgg	gtacgtgttc	5760
gagccgccc	cgcacgtctc	aaccgtgcgg	ctgcatgaaa	tcttggcgg	tttgtctgat	5820
gccaaagctgg	cggcctggcc	ggccagcttg	gccgctgaag	aaaccgagcg	ccgcccgtct	5880
aaaaggatgat	gtgtatttga	gtaaaacagc	ttgcgctcatg	cggtcgctgc	gtatatgatg	5940
cgatgagtaa	ataaacaaat	acgcaagggg	aacgcatgaa	ggttatcgct	gtacttaacc	6000
agaaaggcgg	gtcaggcaag	acgaccatcg	caaccatct	agcccgcgcc	ctgcaactcg	6060
ccggggccga	tgttctgtta	gtcgattccg	atccccaggg	cagtgcccg	gattggggcg	6120
ccgtgcygga	agatcaaccg	ctaaccgttg	tcggcatcga	ccgcccgacg	attgaccgcy	6180
acgtgaaggc	catcgccgg	cgcgacttcg	tagtgatcga	cggagcgcgc	caggcggcgg	6240
acttggctgt	gtccgcyatc	aaggcagccg	acttcgctgt	gattccgggtg	cagccaagcc	6300
cttacgacat	atgggcccacc	gccgacctgg	tggagctggt	taagcagcgc	attgaggtca	6360
cggatggaag	gctacaagcy	gcctttgtcg	tgtcgcgggc	gatcaaaggc	acgcgcatcg	6420
gcggtgaggt	tgccgagggc	ctggccgggt	acgagctgcc	cattcttgag	tcccgtatca	6480
cgcagcgcgt	gagctacca	ggcactgccg	ccgcccgcac	aaccgttctt	gaatcagaac	6540
ccgagggcga	cgctgcccgc	gaggtccagg	cgctggccgc	tgaaattaaa	tcaaaactca	6600
tttgagttaa	tgaggtaaag	agaaaatgag	caaaagcaca	aacacgctaa	gtgccggccg	6660
tccgagcga	cgcagcagca	aggctgcaac	gttggccagc	ctggcagaca	cgccagccat	6720
gaagcgggtc	aactttcagt	tgccggcggg	ggatcacacc	aagctgaaga	tgtacgcggg	6780
acgccaaggc	aagaccatta	ccgagctgct	atctgaatac	atcgcgcagc	taccagagta	6840
aatgagcaaa	tgaataaatg	agtagatgaa	ttttagcggc	taaaggaggc	ggcatggaaa	6900
atcaagaaca	accaggcacc	gacgccgtgg	aatgccccat	gtgtggagga	acgggcyggt	6960
ggccaggcgt	aagcggctgg	gttgtctgcc	ggccctgcaa	tggcactgga	acccccagc	7020
ccgaggaatc	ggcgtgagcy	gtcgcaaac	atccggccc	gtacaaatcg	gcgcygcyct	7080
gggtgatgac	ctggtggaga	agttgaaggc	cgcgcagcc	gcccagcggc	aacgcatcga	7140
ggcagaagca	cgccccggtg	aatcgtggca	agcggccgct	gatcgaatcc	gcaaagaatc	7200
ccggcaaccg	ccggcagccg	gtgcgcccgc	gattaggaag	ccgcccaggg	gcgacgagca	7260
accagatctt	ttcgttccga	tgctctatga	cgtgggcacc	cgcgatagtc	gcagcatcat	7320
ggacgtggcc	gttttccgct	tgtcgaagcy	tgaccgacga	gctggcgagg	tgatccgcta	7380
cgagcttcca	gacgggcacg	tagaggtttc	cgcagggccg	gccggcatgg	ccagtgtgtg	7440
ggattacgac	ctggtactga	tggcggtttc	ccatctaacc	gaatccatga	accgataccg	7500
ggaagggaag	ggagacaagc	ccggccgcyt	gttccgctca	cacgttgcyg	acgtactcaa	7560
gttctgccc	cgagccgatg	gcggaaagca	gaaagacgac	ctggtagaaa	cctgcattcg	7620
gttaaacacc	acgcacgttg	ccatgcagcy	tacgaagaag	gccaagaacg	gccgcctggt	7680
gacggtatcc	gaggggtgaag	ccttgattag	ccgctacaag	atcgtaaaga	gcgaaaccgg	7740
gcggccggag	tacatcgaga	tcgagctagc	tgattggatg	taccgcyaga	tcacagaagg	7800
caagaaccg	gacgtgctga	cggttcacc	cgattacttt	ttgatcagtc	ccggcatcgg	7860
ccgttttctc	taccgcctgg	cacgcccgc	cgcaggcaag	gcagaagcca	gatgggtggt	7920

caagacgatc	tacgaacgca	gtggcagcgc	cggagagttc	aagaagttct	gtttcaccgt	7980
gcgcaagctg	atcggggtcaa	atgacctgcc	ggagtacgat	ttgaaggagg	agggcggggca	8040
ggctggcccg	atcctagtca	tgcgctaccg	caacctgac	gagggcgaag	catccgcccg	8100
ttcctaattgt	acggagcaga	tgctagggca	aattgcccta	gcaggggaaa	aaggtcgaaa	8160
aggtctcttt	cctgtggata	gcacgtacat	tgggaaccca	aagccgtaca	ttgggaaccg	8220
gaaccggtac	attgggaacc	caaagccgta	cattgggaac	cggtcacaca	tgtaagtgac	8280
tgatataaaa	gagaaaaaag	gcgatTTTTc	cgctaaaaac	tctttaaAAC	ttattaaAAC	8340
tctttaaAAC	cgcttggcct	gtgcataact	gtctggccag	cgcacagccg	aagagctgca	8400
aaaagcgcct	acccttcggg	cgctgcgctc	cctacgcccc	gcccgttcgc	gtcggcctat	8460
cgcggccgct	ggccgctcaa	aaatggctgg	cctacggcca	ggcaatctac	cagggcgcgg	8520
acaagccgcg	ccgtcgccac	tcgaccgccg	gcgcccacat	caaggcacc	tgccctcgcg	8580
gtttcgggtga	tgacggtgaa	aacctctgac	acatgcagct	cccggagacg	gtcacagctt	8640
gtctgtaagc	ggatgccggg	agcagacaag	ccgtcaggg	cgctcagcg	ggtgttggcg	8700
ggtgtcgggg	cgcagccatg	accagtcac	gtagcgatag	cggagtgtat	actggcttaa	8760
ctatgcccga	tcagagcaga	ttgtactgag	agtgcaccat	atgctgtgtg	aaataccgca	8820
cagatgcgta	aggagaaaat	accgcatcag	gcgctcttcc	gcttctctgc	tactgactc	8880
gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgccgagcgc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtataacg	8940
gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	9000
ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcttgcct	ggcgtTTTTc	cataggctcc	gccccctga	9060
cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagag	gactataaag	9120
ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	ccctgcccgt	9180
taccggatac	ctgtccgctt	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgcttctc	atagctcacg	9240
ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	9300
ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttatc	cggtaaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	9360
aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagggaggta	9420
tgtaggcggg	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	9480
agtattttgg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	9540
ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggttggttt	ttgtttgca	agcagcagat	9600
tacgcgcaga	aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	9660
tcagtggaac	gaaaactcac	gttaagggat	tttggctcatg	catgatatat	ctcccaattt	9720
gtgtagggct	tattatgcac	gcttaaaaaat	aataaaagca	gacttgacct	gatagtttgg	9780
ctgtgagcaa	ttatgtgctt	agtgcactca	acgcttgagt	taagccgcgc	cgcaagcggg	9840
cgtcggcctt	aacgaatttc	tagctagaca	ttatttgccg	actaccttgg	tgatctcgcc	9900
tttcacgtag	tggacaaatt	cttccaactg	atctgcgcgc	gaggccaagc	gatcttcttc	9960
ttgtccaaga	taagcctgtc	tagcttcaag	tatgacgggc	tgatactggg	ccggcagggc	10020
ctccattgcc	cagtcggcag	cgacatcctt	cgccgcgatt	ttgccggtta	ctgcgctgta	10080
ccaaatgcgg	gacaacgtaa	gcactacatt	tcgctcatcg	ccagcccagt	cgggcggcga	10140
gttccatagc	gttaagggtt	catttagcgc	ctcaaataga	tcctgttcag	gaaccggatc	10200
aaagagttcc	tccgcccgtg	gacctaccaa	ggcaacgcta	tgttctcttg	cttttgtcag	10260
caagatagcc	agatcaatgt	cgatcgtggc	tggctcgaag	atacctgcaa	gaatgtcatt	10320
gcgctgccat	tctccaaatt	gcagttcgcg	cttagctgga	taacgccacg	gaatgatgtc	10380
gtcgtgcaca	acaatgggta	cttctacagc	gcggagaatc	tcgctctctc	caggggaagc	10440
cgaagtttcc	aaaaggtcgt	tgatcaaagc	tcgcccgcgt	gtttcatcaa	gccttacggg	10500
caccgtaacc	agcaaatcaa	tatcactgtg	tggcttcagg	ccgccatcca	ctgoggagcc	10560
gtacaaatgt	acggccagca	acgtcggttc	gagatggcgc	tcgatgacgc	caactacctc	10620
tgatagttga	gtcgataact	cggcgatcac	cgcttcccc	atgatgttta	actttgtttt	10680
agggcgactg	ccctgctgcg	taacatcggt	gctgctccat	aacatcaaac	atcgaccac	10740
ggcgtaacgc	gcttgctgct	tggatgcccg	aggcatagac	tgtaccccaa	aaaaacagtc	10800
ataacaagcc	atgaaaaccg	ccactgcg				10828

<210> 75

<211> 10036

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: transgenic

expression vector pSUN3NIT_HvRacB_s for expression
of barley RacB sense RNA fragment

```

<400> 75
ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaataa acgctctt ttctcttagg tttaccgccc aatataatcct gtcaaacact 120
gatagtttaa actgaaggcg ggaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcat gcctgcaggt cgactctaga ggatcccca tcaagatctt 240
ggtgatgtag caagagctaa gttgtacttc gatycgggtg gacattactc gagaccagat 300
gttttacact tgaccgtaaa tgagcaccgg aagaaaccgg taacattcat ttcgaaggta 360
gagaaagcgg aagatgactc aaacaagtaa tcggttgatga ttcgtcagtt catgtcactc 420
ctatgaagga gtcaagttca aaatgttatg ttgagtttca aacttttatg ctaaactttt 480
tttcttaatt ttcgttaata atggaagaga accaattctc ttgtatctaa agattatcca 540
tctatcatcc aatttgagtg ttcaattctg gatggttggt taccctacat tctacaacca 600
tgtagccaat tattatgaat ctggctttga tttcagttgt gttcttttct ttttttctt 660
gcatatttgc atttagaatg ttttaataat aagttactgt atttccacat acattagttc 720
caagaatata catatattaa tttatttttc ttaaaaatgt tttggaatga ctaatattga 780
caacgaaaat agaagctatg ctaaaccatt acgtatatgt gacttcacat gttgttgttt 840
tacattccct atatatatgg atggctgtca caatcagaaa cgtgatcga aaaagacaaa 900
cagtgtttgc ataaaaagac tatttcgttt cattgacaat ttgtgtttat ttgtaaagaa 960
aagtggcaaa gtggaatttg agttcctgca agtaagaaag atgaaataaa agacttgagt 1020
gtgtgttttt ttcttttatc tgaaagctgc aatgaaatat tcctaccaag cccgtttgat 1080
tattaattgg ggtttggttt tcttgatgcg aactaattgg ttatataaga aactatacaa 1140
tccatgttaa ttcaaaaatt ttgatttctc ttgtaggaat atgatttact atatgagact 1200
ttcttttctc caataatagt aaatccaaag atatttgacc ggaccaaac acattgatct 1260
attttttagt ttatttaatc cagtttctct gagataattc attaaggaaa acttagtatt 1320
aaccatcct aagattaat aggagccaaa ctcacatttc aaatattaaa taacataaaa 1380
tggattttaa aaatctatac gtcaaatttt atttatgaca tttcttattt aaatttatat 1440
ttaatgaaat acagctaaga caaaccaaaa aaaaaatact ttctaagtgg tccaaaacat 1500
caattccgtt caatattatt aggtagaatc gtacgaccaa aaaaggtagg ttaatacga 1560
attacaaca tatctatata catagtatat attattacct attatgagga atcaaatgc 1620
atcaaatatg gatttaagga atccataaaa gaataaatc tacggaaaaa aaaaaagaa 1680
taaattcttt taagttttta atttgtttt tatttggtag ttctccattt tgttttattt 1740
cgtttggtt tattgtgtcc aaatactttg taaccaccg ttgtaattct taaacggggg 1800
tttacttct tttttatatt cagacataaa gcatcggctg gtttaatcaa tcaatagatt 1860
ttatttttct tctcaattat tagtaggtt gatgtgaact ttacaaaaa aacaaaaaca 1920
aatcaatgca gagaaaagaa accacgtggg ctagtcccac cttgtttcat tccaccaca 1980
ggttcgatct tcgttaccgt ctccaatagg aaaataaacg tgaccacaaa aaaaaaaca 2040
aaaaaaagtc tatatattgc ttctctcaag tctctgagtg tcatgaacca aagtaaaaaa 2100
caaagactcg agtggatccc cgggccgcca tggccgcccg atggatccga tgagcgcg 2160
caggttcata aagtgcgtca cggtcgggga cggcgcgctc ggcaagacct gcatgctcat 2220
ctctacacc tccaacacct tccccaccga ctatgttccg acagtgtttg ataactcag 2280
tgccaacggt gtggttgatg gtaatactgt caacctcggc ctctgggaca ctgcaggtca 2340
agaggattac aacagactga gaccactgag ctatcgtgga gctgatgttt ttcttctggc 2400
tttctcactg atcagtaagg ccagctatga gaatgtttcg aagaagtgga tacctgaact 2460
gaagcattat gcacctggtg tgccaattat tctcgtaggg acaaagcttg atcttcgaga 2520
cgacaagcag ttctttgtgg accatcctgg tgctgtccct atcactactg ctcagggaga 2580
ggagctaaga aagcaaatag gcgctccata ctacatcga tgcagctcga agaccaact 2640
aaacgtgaag ggcgtcttcg atgcccgat aaagggttg ctgcagccgc ctaaggcgaa 2700
gaagaagaaa aagggtcaga gggggcgctg ctccattttg tgaaattcac tggccgtcgt 2760
ttacaacga ctcagagctt gacaggaggc ccgatctagt aacatagatg acaccgccc 2820
cgataattta tctagtttg cgcgctatat tttgttttct atcgcgtatt aatgtataa 2880
ttgcccggact ctaatcataa aaacctatct cataaataac gtcattgatt acatgttaat 2940
tattacatgc ttaacgfaat tcaacagaaa ttatatgata atcatcgcaa gaccggcaac 3000
aggattcaat cttagaagaa tttattgcca aatgtttgaa cgatcgggga tcatccgggt 3060
ctgtggcggg aactccacga aaatatccga acgcagcaag atctagagct tgggtcccgc 3120
tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgccaatcgg gagcggcgat 3180
accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccga agctcttcag caatatcacg 3240

```

ggtagccaac	gctatgtcct	gatagcggtc	cgccacaccc	agccggccac	agtcgatgaa	3300
tccagaaaag	cgcccattht	ccaccatgat	attcggcaag	caggcatcgc	catgggtcac	3360
gacgagatcc	tcgccgtcgg	gcatgcgcgc	cttgagcctg	gcgaacagtt	cggtcggcgc	3420
gagcccctga	tgctcttcgt	ccagatcadc	ctgatcgaca	agaccggctt	ccatccgagt	3480
acgtgctcgc	tcgatgcgat	gtttcgcctg	gtggtcgaat	gggcaggtag	ccggatcaag	3540
cgtatgcagc	cgccgcattg	catcagccat	gatggatact	ttctcggcag	gagcaagggtg	3600
agatgacagg	agatcctgcc	ccggcacttc	gcccataagc	agccagtccc	ttcccgttc	3660
agtgacaacg	tcgagcacag	ctgcgcaagg	aacgcccgtc	gtggccagcc	acgatagccg	3720
cgctgcctcg	tcctgcagtt	cattcagggc	accggacagg	tcggtcttga	caaaaagaac	3780
cgggcgcccc	tgccgtgaca	gccggaacac	ggcggcatca	gagcagccga	ttgtctgttg	3840
tgcccagtca	tagccgaata	gcctctccac	ccaagcggcc	ggagaacctg	cgtgcaatcc	3900
atcttgttca	atcatgcaaa	acgatccaga	tccggtgcag	attatthtga	ttgagagtga	3960
atatgagact	ctaattggat	accgagggga	atthtatggaa	cgtcagtggg	gcaththtga	4020
caagaaatat	ttgctagctg	atagtgacct	taggcgactt	ttgaacgcgc	aataatgggt	4080
tctgacgtat	gtgcttagct	cattaaactc	cagaaacctg	cggtcagtg	gctcctcaa	4140
cgthtgcggt	ctgtcagttc	caaacgtaaa	acggtctgct	ccgcgtcadc	ggcgggggtc	4200
ataacgtgac	tccttaatt	ctccgctcadc	gatcagattg	tcgthtccc	ccttcagtht	4260
aaactatcag	tgthtgacag	gatcctgctt	ggtaataatt	gtcattagat	tgththtatg	4320
catagatgca	ctcgaatca	gccaatthta	gacaagtadc	aaacggatgt	taattcagta	4380
cattaaagac	gtccgcaatg	tgthattaag	ttgtctaagc	gtcaathtgt	ttacaccaca	4440
atatactctg	ccaccagcca	gccaacagct	ccccgaccgg	cagctcggca	caaatcacc	4500
acgcgthtacc	accacgccgg	ccggccgcadc	ggtgthgacc	gtgthtcgcc	gcathtccga	4560
gthtcgagcgt	tcctaatca	tcgaccgcac	ccggagcggg	cgcgaggccg	ccaaggcccg	4620
aggcgtgaag	thtggcccc	gcctaccct	caccgccgca	cagatcgcgc	acgcccgca	4680
gctgatcagc	caggaaggcc	gcaccgtgaa	agaggcggct	gcactgcttg	gcgtgcadc	4740
ctcagacctg	taccgcgcac	ttgagcgcag	cgaggaagtg	acgcccaccg	aggccaggcg	4800
gcgcggtgcc	thccgtgagg	acgcattgac	cgaggccgac	gccctggcgg	ccgccgagaa	4860
tgaacgccaa	gaggaacaag	catgaaacctg	caccaggacg	gccaggacga	accgththt	4920
attaccgaag	agatcgaggc	ggagatgatc	gcggccgggt	acgtgthtca	gccgcccgcg	4980
cacgtctcaa	ccgtgcggct	gcatgaaatc	ctggccggth	tgtctgatgc	caagctggcg	5040
gcctggccgg	ccagcttggc	cgctgaagaa	accgagcgc	gccgtctaaa	aaggthgatg	5100
gtaththgagt	aaaacagctt	gcgtcatgcg	gtcgtcgcgt	atatgatgcg	atgagthaat	5160
aaacaaatac	gcaaggggaa	cgcatgaagg	ttatcgcgtg	actthaacag	aaaggcgggt	5220
caggcaagac	gaccatcgca	accatctag	cccgcacct	gcaactcgc	ggggccgatg	5280
thctgttagt	cgathtccgat	ccccagggca	gtgcccgcga	thgggcggcc	gtcggggaag	5340
atcaaccgct	aaccgtthtgc	ggcatcgacc	gcccagcagat	tgaccgcgac	gtgaaggcca	5400
tcggccggcg	cgacttcgta	gtgatcgacg	gagcgcacca	ggcggccgac	thggctgtgt	5460
ccgcgatcaa	ggcagccgac	thctgtgctga	thccggthgca	gccaaagcct	tacgacatat	5520
gggccaccgc	cgacctggtg	gagctggthta	agcagcgcadc	tgaggthcacg	gatggaaggc	5580
tacaagcggc	ctthtgcgtg	tcgcgggcga	tcaaaggcac	gcgcadcggc	ggtgaggttg	5640
ccgaggcgcct	ggccgggtac	gagctgcca	thctthgagtc	ccgtadcacg	cagcgcgtga	5700
gctaccaggg	cactgcgcgc	gccggcacia	ccgthctthga	atcagaacct	gagggcgacg	5760
ctgcccgcga	ggtccaggcg	ctggccgcctg	aaaththaatc	aaaactcath	tgagthaatg	5820
aggthaaagag	aaaatgagca	aaagcaciaa	cagcthaagt	gccggccgctc	cgagcgcacg	5880
cagcagcaag	gctgcaacgt	tggccagcct	ggcagacacg	ccagccatga	agcgggtcaa	5940
ctthtcagtht	ccggcggagg	atcacaccaa	gctgaagatg	tacgcggtac	gccaaaggcaa	6000
gaccathtacc	gagctgctat	ctgaatacat	cgcgcagctha	ccagagthaaa	tgagcaaatg	6060
aataaatgag	tagatgatht	thtagcggcta	aaggaggcgg	catggaaath	caagaaciaac	6120
caggcaccga	cgccgtggaa	tgccccatgt	gtggaggaac	ggcggthtgg	ccaggcgthaa	6180
gcggctgggt	tgtctgcggg	ccctgcaatg	gcactggaac	ccccaaagccc	gaggaatcgg	6240
cgtgagcgggt	cgcaaacct	ccggcccggt	aciaaatcggc	gcggcgcctgg	gtgatgacct	6300
ggtggagaag	thgaaggccg	cgcaggccgc	ccagcggcaa	cgcatcgagg	cagaagcagc	6360
ccccggtgaa	tcgtggcaag	cgcccgctga	tcgaaatccgc	aaagaatccc	ggcaaccgcc	6420
ggcagccggt	gcgcgcgtcga	thtaggaagcc	gcccaggggc	gacgagcaac	cagathththt	6480
cgthtccgatg	ctctatgacg	thgggcacctg	cgatagctgc	agcatcatgg	acgtggccct	6540
thtccgtht	tcgaagcgtg	accgacgagc	thggcaggtg	atccgctacg	agctthcaga	6600
cgggcacgthta	gaggtthtccg	cagggccggc	cgcatggcc	agthgtgthgg	athtaccgacct	6660

ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga atccatgaac cgataccggg aaggggaaggg 6720
 agacaagccc ggcccgctgt tccgtccaca cgttgccggac gtactcaagt tctgccggcg 6780
 agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct ggtagaaacc tgcattcggg taaacaccac 6840
 gcacgttgcc atgcagcgtg cgaagaaggg caagaacggc gcctggtga cggtatccga 6900
 ggggtgaagc ttgattagcc gctacaagat cgtaaagagc gaaaccgggc ggccggagta 6960
 catcgagatc gagctagctg attggatgta ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga 7020
 cgtgctgacg gttcaccocg attacttttt gatcgcgccc ggcacggcc gttttctcta 7080
 ccgcctggca cgcccgcccg caggcaaggg agaagccaga tggttgttca agacgatcta 7140
 cgaacgcagt ggcagcgccg gagagttaa gaagttctgt ttcaccgtgc gcaagctgat 7200
 cgggtcaaat gacctgccgg agtacgattt gaaggaggag gcggggcagg ctggccccgat 7260
 cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga gggcgaagca tccgccggtt cctaattgtac 7320
 ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc aggggaaaaa ggtcgaaaag gtctctttcc 7380
 tgtggatagc acgtacattg ggaacccaaa gccgtacatt gggaaaccgga acccgtacat 7440
 tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg gtcacacatg taagtgactg atataaaaaga 7500
 gaaaaaaggc gatttttccg cctaaaactc tttaaaactt attaaaactc ttaaaacccg 7560
 cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg cacagccgaa gagctgcaaa aagcgcctac 7620
 ccttcggtcg ctgcgctccc tacgccccgc cgcttcgctg cggcctatcg cggccgctgg 7680
 ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg caatctacca gggcgcggac aagccgcgcc 7740
 gtcgccactc gaccgcgggc gccacatca aggcaccctg cctcgcgcgt ttcggtgatg 7800
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg 7860
 atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggcg 7920
 cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg gagtgatac tggcttaact atgcggcatc 7980
 agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 8040
 gagaaaatac cgcatcaggc gctcttccgc ttcctcgcctc actgactcgc tgcgctcggg 8100
 cgttcggtcg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 8160
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 8220
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcaaaa 8280
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 8340
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cccgatacct 8400
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 8460
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 8520
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 8580
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg 8640
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 8700
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 8760
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 8820
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 8880
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgca tgatataatc cccaatttgt gtagggctta 8940
 ttatgcacgc ttaaaaataa taaaagcaga cttgacctga tagtttggtt gtgagcaatt 9000
 atgtgcttag tgcattctaac gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tccgcttgaa 9060
 cgaatttcta gctagacatt atttgccgac taccttgggt atctcgcctt tcacgtagtg 9120
 gacaaattct tccaactgat ctgcgcgca ggccaagcga tcttctctt gtccaagata 9180
 agcctgtcta gcttcaagta tgacgggctg atactgggccc ggcagggcgt ccattgccc 9240
 gtcggcagcg acatccttcg gcgcatctt gccggttact gcgctgtacc aatgcccggg 9300
 caacgtaagc actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt 9360
 taaggtttca tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc 9420
 cgccgctgga cctaccaagg caacgctatg ttctcttgct tttgtcagca agatagccag 9480
 atcaatgtcg atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc 9540
 tccaaattgc agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac 9600
 aatggtgact tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa 9660
 aaggctcgtg atcaaagctc gccgcgttgt tcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag 9720
 caaatcaata tcaactgtgt gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac 9780
 ggccagcaac gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt 9840
 cgatacttcg gcgatcccg cttccccat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc 9900
 ctgctgctga acatcggtg tgetccataa catcaaacat cgaccacgg cgtaaccgcg 9960
 ttgctgcttg gatgcccag gcatagactg taccceaaa aaacagtcat aacaagccat 10020
 gaaaaccgcc actgcg 10036

<210> 76
 <211> 10036
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: transgenic
 expression vector pSUN3NIT_HvRacB_as for
 expression of barley RacB anti sense RNA fragment

<400> 76
 ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga 60
 ttattctaataa aaacgctctt ttctcttagg tttaccggcc aatataatcct gtcaaact 120
 gatagtttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
 tgattacgcc aagcttgcac gcctgcaggc cgactctaga ggatccccca tcaagatctt 240
 ggtgatgtag caagagctaa gttgtacttc gatycgggtg gacattactc gagaccagat 300
 gttttactact tgaccgtaaa tgagcaccgc aagaaaccgg taacattcat ttcgaaggta 360
 gagaaagcgg aagatgactc aaacaagtaa tcggttgatga ttcgctcagtt catgtcactc 420
 ctatgaagga gtcaagttca aaatgttatg ttgagtttca aacttttatg ctaaactttt 480
 tttcttaatt ttcgttaata atggaagaga accaattctc ttgtatctaa agattatcca 540
 tctatcatcc aatttgagtg ttcaattctg gatgttggtg taccctacat tctacaacca 600
 tgtagccaat tattatgaat ctggctttga tttcagttgt gttcttttct ttttttctt 660
 gcataattgc atttagaatg ttaataaatt aagttactgt atttccacat acattagttc 720
 caagaatata catatattaa tttatttttc ttaaaaatgt tttggaatga ctaaatattga 780
 caacgaaaat agaagctatg ctaaaccatt acgtatatgt gacttcacat gttgttggtt 840
 tacattccct atatatatgg atggctgtca caatcagaaa cgtgatcgaa aaaagacaaa 900
 cagtgtttgc ataaaaagac ttttctgttt cattgacaat ttgtgtttat ttgtaaagaa 960
 aagtggcaaa gtggaatttg agttcctgca agtaagaaag atgaaataaa agacttgagt 1020
 gtgtgttttt ttcttttatc tgaaagctgc aatgaaatat tcctaccaag cccgtttgat 1080
 tattaattgg ggtttgggtt tcttgatgag aactaattgg ttatataaga aactatacaa 1140
 tccatgttaa ttcaaaaatt ttgatttctc ttgtaggaat atgatttact atatgagact 1200
 ttcttttctc caataatagt aaatccaaag atatttgacc ggaccaaaac acattgatct 1260
 attttttagt ttatttaatc cagtttctct gagataattc attaaggaaa acttagtatt 1320
 aaccatcct aagattaat aggagccaaa ctcacatttc aaatattaaa taacataaaa 1380
 tggatttaaa aaatctatac gtcaaatttt atttatgaca tttcttattt aaatttatat 1440
 ttaatgaaat acagctaaga caaaccaaaa aaaaaaact ttctaagtgg tccaaaacat 1500
 caattccgtt caatattatt aggtagaatc gtacgaccaa aaaaggtagg ttaatacga 1560
 attacaaaca tatctatata catagtatat attattacct attatgagga atcaaatgc 1620
 atcaaatatg gatttaagga atccataaaa gaataaattc tacggaaaaa aaaaaaagaa 1680
 taaattcttt taagttttta atttgttttt tatttggtag ttctccattt tgttttattt 1740
 cgtttggtt tattgtgtcc aaatactttg taaccaccgc ttgtaattct taaacggggt 1800
 tttcacttct tttttatatt cagacataaa gcatcggctg gtttaatcaa tcaatagatt 1860
 ttatttttct tctcaattat tagtagggtt gatgtgaact ttacaaaaaa aacaaaaaca 1920
 aatcaatgca gagaaaagaa accacgtggg ctagtccac cttgtttcat tccaccaca 1980
 ggttcgatct tcgttaccgt ctccaatagg aaaataaacg tgaccacaaa aaaaaaaca 2040
 aaaaaaagtc tatatattgc ttctctcaag tctctgagtg tcatgaacca aagtaaaaaa 2100
 caaagactcg agtggatccc cggtcacaaa atgggacag cccccctctg cacctttttc 2160
 ttcttcttct ccttagggcg ctgcagcaca acctttatcg ccgcatcgaa gacgcccttc 2220
 acgttttagt gggctcttga gctgcattcg atgtagtatg gagegcctat ttgctttctt 2280
 agtcctctc cctgagcagt agtgataggg acagcaccag gatgggtccac aaagaactgc 2340
 ttgtcgtctc gaagatcaag ctttgtccct acgagaataa ttggcacacc aggtgcataa 2400
 tgcttcagtt caggtatcca cttcttgcga acattctcat agctggcctt actgatcagt 2460
 gagaaagcca gaagaaaac atcagctcca cgatagctca gtggtctcag tctgtttaa 2520
 tcctcttgac ctgcagtgtc ccagaggccg aggttgacag tattaccatc aaccacaacg 2580
 ttggcactga agttatcaaa cactgtcggg acatagtcgg tggggaagggt gttggagggtg 2640
 taggagatga gcatgcaggt cttgccgacg gcgccgtccc cgaccgtgac gcactttatg 2700
 aacctggacg cgctcatcgg atccatcccg cggccatggc ggcaattcac tggccgtcgt 2760
 tttacaacga ctcagagctt gacaggaggc ccatctagt aacatagatg acaccgcgcg 2820

cgataattta tcctagtttg cgcgctatat tttgttttct atcgcgtatt aaatgtataa 2880
 ttgcccggact ctaatcataa aaacccatct cataaataac gtcatgcatt acatgttaat 2940
 tattacatgc ttaacgtaat tcaacagaaa ttatatgata atcatcgcaa gaccggcaac 3000
 aggattcaat chtaagaaac tttattgcca aatgtttgaa cgatcgggga tcatccgggt 3060
 ctgtggcggg aactccacga aaatatccga acgcagcaag atctagagct tgggtcccgc 3120
 tcagaagaac tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat 3180
 accgtaaagc acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccgca agctcttcag caatatcacg 3240
 ggtagccaac gctatgtcct gatagcgggtc cgccacacc agccggccac agtcgatgaa 3300
 tccagaaaag cggccatttt ccaccatgat attcggcaag caggcatcgc catgggtcac 3360
 gacgagatcc tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggctggcgc 3420
 gagcccctga tgctcttcgt ccagatcadc ctgatcgaca agaccggctt ccatccgagt 3480
 acgtgctcgc tcgatgcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccggatcaag 3540
 cgtatgcagc cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaagggtg 3600
 agatgacagg agatcctgcc ccggcacttc gcccaatagc agccagtccc tcccgcctc 3660
 agtgacaacg tcgagcacag ctgcgcaagg aacgcccgtc gtggccagcc acgatagccg 3720
 cgctgcctcg tccctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac 3780
 cgggcgcccc tcgctgaca gccggaacac ggcggcatca gagcagccga ttgtctgttg 3840
 tgcccagtca tagccgaata gcctctccac ccaagcggcc ggagaacctg cgtgcaatcc 3900
 atcttgttca atcatgcgaa acgatccaga tccgggtgcag attatttggga ttgagagtga 3960
 atatgagact ctaattggat accgagggga atttatggaa cgtcagtgga gcatttttga 4020
 caagaaatat ttgctagctg atagtgaacct taggcgactt ttgaacgcgc aataatgggt 4080
 tctgacgtat gtgcttagct cattaaactc cagaaacctg cggctgagtg gctccttcaa 4140
 cgttgccggtt ctgtcagttc caaacgtaaa acggcttgtc ccgcgtcadc ggcgggggtc 4200
 ataacgtgac tcccttaatt ctccgctcat gatcagattg tcgtttcccg ccttcagttt 4260
 aaactatcag tgtttgacag gatcctgctt ggtaataatt gtcattagat tgtttttatg 4320
 catagatgca ctcgaaatca gccaatttta gacaagtadc aaacggatgt taattcagta 4380
 cattaagac gtccgcaatg tgttattaag ttgtctaagc gtcaatttgt ttacaccaca 4440
 atatatcctg ccaccagcca gccaacagct ccccgaccgg cagctcggca caaaatcacc 4500
 acgcgttacc accacgcggg ccggccgcac ggtggtgacc gtgttcgccc gcattgccga 4560
 gttcagagct tccctaatca tcgaccgcac ccggagcggg cgcgaggccc ccaaggcccg 4620
 aggcgtgaag tttggcccc gcctaccct caccocggca cagatcgcgc acgcccgcga 4680
 gctgatcgac caggaaggcc gcaccgtgaa agaggcggct gcaactgctg gcgtgcatcg 4740
 ctgaccctg taccgcgcac ttgagcgcag cgaggaagtg acgcccaccg aggccaggcg 4800
 gcgcggtgcc ttccgtgagg acgcattgac cgaggccgac gccctggcgg ccgcccagaa 4860
 tgaacgcaa gaggaacaag catgaaacct caccaggacg gccaggacga accgtttttc 4920
 attaccgaag agatcgaggc ggagatgatc gcggccgggt acgtgttcga gcccccgcg 4980
 cagctctcaa ccgtgcggct gcatgaaatc ctggccgggt tgtctgatgc caagctggcg 5040
 gctggccggg ccagcttggc cgtgaaagaa accgagcgc gccgtctaaa aaggtgatgt 5100
 gtatttgagt aaaacagctt gcgtcatgcg gtcgctgcgt atatgatgcg atgagtaaat 5160
 aaacaatac gcaaggggaa cgcgatgaagg ttatcgcgtg acttaaccag aaaggcgggt 5220
 caggcaagac gaccatcgca acccatctag cccgcgcct gcaactcgc ggggccgatg 5280
 ttctgttagt cgattccgat ccccagggca gtgcccgcga ttgggcccgc gtgcccgaag 5340
 atcaaccgct aaccgttgtc ggcacgcacc gcccgacgat tgaccgcgac gtgaaggcca 5400
 tcggccggcg cgacttcgta gtgatcgacg gagcgccca ggcggcggac ttggctgtgt 5460
 ccgcatcaa ggcagccgac ttcgtgctga ttccgggtga gccaaagcct tacgacatat 5520
 gggccaccgc cgacctggtg gagctgggta agcagcgcac tgaggtcacg gatggaaggc 5580
 tacaagcggc ctttgcctg tcgcccggcg tcaaaggcac gcgcatcggc ggtgaggttg 5640
 ccgagggcgt ggcgggttac gagctgccc gccggcacia ccgttcttga atcagaacc gcagcgcgtg 5700
 gctaccagc cactgccgcc gccggcacia ccgttcttga atcagaacc gcagcgcgtg 5760
 ctgcccgcga ggtccaggcg ctggccgctg aaattaatc aaaactcatt tgagttaatg 5820
 aggtaagag aaaatgagca aaagcaciaa cacgctaagt gccggccgct cgagcgcacg 5880
 cagcagcaag gctgcaacgt tggccagcct ggcagacacg ccagccatga agcgggtcaa 5940
 ctttcagttg ccggcggagg atcacaccaa gctgaagatg tacgcccgtac gccaaggcaa 6000
 gaccattacc gagctgctat ctgaatacat cgcgcagcta ccagagtaaa tgagcaaatg 6060
 aataaatgag tagatgaatt ttagcggcta aaggaggcgg catggaaaat caagaacaac 6120
 caggcaccga cgccgtggaa tgcccctatg gtggaggaa cggcgggttg ccaggcgtaa 6180
 gcggctgggt tgtctgcgg ccctgcaatg gcaactgaa ccccaagccc gaggaatcgg 6240

cgtgagcggg cgcaaaccat ccggccccgg acaaatcggc ggggogctgg gtgatgacct 6300
 ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc ccagcggcaa cgcacgcagg cagaagcacg 6360
 ccccggtgaa tcgtggcaag cggccgctga tcgaatccgc aaagaatccc ggcaaccgcc 6420
 ggcagccggg gcgccgtcga ttaggaagcc gcccaaggcc gacgagcaac cagatttttt 6480
 cgttccgatg ctctatgacg tgggcacccg cgatagtcgc agcatcatgg acgtggccgt 6540
 tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc tggcgagggt atccgctacg agcttccaga 6600
 cgggcacgta gaggtttccg cagggccggc cggcatggcc agtgtgtggg attacgacct 6660
 ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga atccatgaac cgataaccggg aagggagggg 6720
 agacaagccc ggccgcgtgt tccgtccaca cgttgccggac gtactcaagt tctgccggcg 6780
 agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct ggtagaaacc tgcattcggg taaacaccac 6840
 gcacgttgcc atgcagcgtg cgaagaaggc caagaacggc cgcctgggta cggtatccga 6900
 ggggtgaagc ttgattagcc gctacaagat cgtaaagagc gaaaccgggc ggccggagta 6960
 catcgagatc gagctagctg attggatgta ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga 7020
 cgtgctgacg gttcaccocg attacttttt gatcgcaccc ggcatcggcc gttttctcta 7080
 ccgcctggca cgccgcgccg caggcaaggc agaagccaga tggttgttca agacgatcta 7140
 cgaacgcagt ggcagcgccg gagagttcaa gaagtctgtt ttcaccgtgc gcaagctgat 7200
 cgggtcaaat gacctgccgg agtacgattt gaaggaggag gcggggcagg ctggcccgat 7260
 cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga gggcgaagca tccgccgggt cctaatgtac 7320
 ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc aggggaaaaa ggtcgaaaag gtctctttcc 7380
 tgtggatagc acgtacattg ggaacccaaa gccgtacatt ggggaaccgga acccgtacat 7440
 tgggaacca aagccgtaca ttgggaaccg gtcacacatg taagtgactg atataaaga 7500
 gaaaaaaggc gatttttccg cctaaaactc tttaaaactt attaaaactc ttaaaacccg 7560
 cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg cacagccgaa gagctgcaaa aagcgcctac 7620
 ccttcggctg ctgcctccc tacgccccgc cgcttcgcgt cggcctatcg cggccgctgg 7680
 ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg caatctacca gggcgcggac aagccgcgcc 7740
 gtcgccactc gaccgccggc gccacatca aggcaccctg cctcgcgcgt ttcgggtgatg 7800
 acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg 7860
 atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgteggggcg 7920
 cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg gagtgatatac tggcttaact atgcggcatc 7980
 agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcgggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag 8040
 gagaaaatac cgcatcaggc gctcttccgc ttctctcgtc actgactcgc tgcgctcggg 8100
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 8160
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 8220
 taaaaaggcc gcgttgetgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcaaaa 8280
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt 8340
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta cgggatacct 8400
 gtcgcgcctt ctcccttggg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 8460
 cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 8520
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc aaccgggtaa gacacgactt 8580
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg 8640
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tattttggat 8700
 ctgcgctctg ctgaagccag ttacctcggg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 8760
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 8820
 aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 8880
 aaactcacgt taagggattt tggctatgca tgatatact cccaatttgt gtagggctta 8940
 ttatgcacgc ttaaaaataa taaaagcaga cttgacctga tagtttggct gtgagcaatt 9000
 atgtgcttag tgcactaac gcttgagtta agccgcgccg cgaagcggcg tgggctgaa 9060
 cgaatttcta gctagacatt atttgccgac taccttgggt atctcgcctt tcacgtagt 9120
 gacaaattct tccaactgat ctgcgcgcga ggccaagcga tcttcttctt gtccaagata 9180
 agcctgtcta gcttcaagta tgacgggctg atactgggcc ggcaggcgtc ccattgccca 9240
 gtcggcagcg acatccttcg gcgcgatttt gccggttact gcgctgtacc aatgcggga 9300
 caacgtaagc actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcgagt tccatagcgt 9360
 taaggtttca tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc 9420
 cgccgctgga cctaccaagg caacgctatg ttctcttget tttgtcagca agatagccag 9480
 atcaatgtcg atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccattc 9540
 tccaaattgc agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac 9600
 aatgggtgact tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttccaa 9660

```
aaggtagctg atcaaagctc gccgagcttg ttcataaagc cttacgggtca ccgtaaccag 9720
caaatcaata tcactgtgtg gcttcaggcc gccatccact gcggagccgt acaaatgtac 9780
ggccagcaac gtcggttcga gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt 9840
cgatacttcg gcgatcaccg cttccccat gatgtttaac tttgttttag ggcgactgcc 9900
ctgctgcgta acatcgttgc tgctccataa catcaaacat cgaccacgg cgtaacgcgc 9960
ttgctgcttg gatgcccag gcatagactg taccceaaaa aacagtcac aacaagccat 10020
gaaaaccgcc actgcg 10036
```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/09719

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 15815 A (PIONEER HI BRED INT) 23 March 2000 (2000-03-23) cited in the application the whole document	11,12, 15-18, 20-31
X	--- DATABASE EMBL 'Online! 2 August 2000 (2000-08-02) MI Z ET AL.: "Oryza sativa small GTP-binding protein RACBP (RACB) mRNA" Database accession no. AF250327 XP002226365 abstract	11,12, 15-18, 20-31
	--- -/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 January 2003

Date of mailing of the international search report

21/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/09719

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KAWASAKI ET AL: "The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, September 1999 (1999-09), pages 10922-10926, XP002131367 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1-31
A	<p>ONO EIICHIRO ET AL: "Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 2, 16 January 2001 (2001-01-16), pages 759-764, XP002226363 January 16, 2001 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1-31
P,X	<p>SCHULTHEISS HOLGER ET AL: "A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 128, no. 4, April 2002 (2002-04), pages 1447-1454, XP002226364 April, 2002 ISSN: 0032-0889 the whole document</p>	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/09719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0015815	A	AU 6037199 A	03-04-2000
		WO 0015815 A1	23-03-2000

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00				
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK				
B. RECHERCHIERTE GEBIETE				
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N				
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen				
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, EMBL				
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN				
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.		
X	WO 00 15815 A (PIONEER HI BRED INT) 23. März 2000 (2000-03-23) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	11,12, 15-18, 20-31		
X	DATABASE EMBL 'Online! 2. August 2000 (2000-08-02) MI Z ET AL.: "Oryza sativa small GTP-binding protein RACBP (RACB) mRNA" Database accession no. AF250327 XP002226365 Zusammenfassung --- -/--	11,12, 15-18, 20-31		
<table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:50%"><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen</td> <td style="width:50%"><input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie			
<table border="0" style="width:100%"> <tr> <td style="width:50%"> ^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist </td> <td style="width:50%"> *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist </td> </tr> </table>			^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist	*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist			
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts		
9. Januar 2003		21/01/2003		
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>KAWASAKI ET AL: "The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 96, September 1999 (1999-09), Seiten 10922-10926, XP002131367 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	1-31
A	<p>ONO EIICHIRO ET AL: "Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 98, Nr. 2, 16. Januar 2001 (2001-01-16), Seiten 759-764, XP002226363 January 16, 2001 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	1-31
P,X	<p>SCHULTHEISS HOLGER ET AL: "A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley." PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 128, Nr. 4, April 2002 (2002-04), Seiten 1447-1454, XP002226364 April, 2002 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument</p>	1-31

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/09719

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0015815 A	23-03-2000	AU 6037199 A WO 0015815 A1	03-04-2000 23-03-2000
