

(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
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/014364 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/82**, (74) **Anwalt: NEUEFEIND, Regina**; Maiwald Patentanwalts
A01H 5/00 GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08725 (81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 2002 (05.08.2002) CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
(25) Einreichungssprache: Deutsch MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (30) Angaben zur Priorität: 101 38 091.7 3. August 2001 (03.08.2001) DE (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).
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): IPK - INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK UND KULTURPFLANZENFORSCHUNG** [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE). **UNIVERSITÄT ZÜRICH** [CH/CH]; Rämistrasse 71, CH-8006 Zürich (CH).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): BAUER, Petra** [DE/DE]; Planstrasse 22, 06458 Hedersleben (DE). **GANAL, Martin** [DE/DE]; Reuthestrasse 9, 06507 Rieder (DE). **KELLER, Beat** [CH/CH]; Scheuchzerstrasse 24, CH-8006 Zürich (CH). **LING, Hong-Qing** [CN/DE]; Uhlandstrasse 188, 78224 Singen (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:** METHOD FOR INFLUENCING THE ACCEPTANCE OF MINERALS IN TRANSGENIC PLANTS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR BEEINFLUSSUNG DER MINERALSTOFFAUFNAHME IN TRANSGENEN PFLANZEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for influencing the acceptance of minerals and especially the acceptance of iron in transgenic plants. The invention also relates to DNA-sequences coding for FER-proteins, especially the FER-protein in tomatoes. The invention further relates to transgenic plants and plant cells which contain a nucleic acid molecule comprising an inventive DNA-sequence and exhibiting an altered acceptance of minerals, especially acceptance of iron, in comparison with wild plants or cells. The invention also relates to harvest crops and multiplication material of transgenic plants.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung der Mineralstoffaufnahme und insbesondere der Eisenaufnahme in transgenen Pflanzen. Des Weiteren betrifft die Erfindung DNA-Sequenzen, die für FER-Proteine, insbesondere für das FER-Protein aus Tomate, kodieren. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und Pflanzenzellen, die eine erfindungsgemässe DNA-Sequenz umfassendes Nukleinsäuremolekül enthalten und aufgrund dessen im Vergleich zu Wildtyppflanzen bzw. -zellen eine veränderte Mineralstoffaufnahme, insbesondere Eisenaufnahme, aufweisen, sowie Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial der transgenen Pflanzen.



WO 03/014364 A1

Verfahren zur Beeinflussung der Mineralstoffaufnahme in transgenen Pflanzen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beeinflussung der Mineralstoffaufnahme
5 und insbesondere der Eisenaufnahme in transgenen Pflanzen. Des Weiteren betrifft
die Erfindung DNA-Sequenzen, die für FER-Proteine, insbesondere für das FER-
Protein aus Tomate, kodieren. Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen und
Pflanzenzellen, die ein eine erfindungsgemäße DNA-Sequenz umfassendes
Nukleinsäuremolekül enthalten und aufgrund dessen im Vergleich zu
10 Wildtyppflanzen bzw. -zellen eine veränderte Mineralstoffaufnahme, insbesondere
Eisenaufnahme, aufweisen, sowie Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial der
transgenen Pflanzen.

Eisen ist als Komponente vieler wichtiger Enzyme und Proteine ein notwendiges
15 Nährelement für alle Organismen. Die effiziente Eisenaufnahme der Pflanzen aus
dem Boden ist ein komplexer und streng regulierter Prozess, der bei
Eisenmangelstress induziert wird. Zwei aktive Eisenaufnahmemechanismen werden
in höheren Pflanzen unterschieden: Strategie I (bei höheren Pflanzen mit Ausnahme
der Gramineen) und Strategie II (Gramineen). Neben zahlreichen physiologischen
20 und morphologischen Veränderungen ist der zentrale Kern der Strategie I die
Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) an der Wurzeloberfläche (Briat and Lobreaux (1997)
Trans. Plant Sci. 2:187-193). Dieses reduzierte Eisen wird von der Pflanze aufge-
nommen. Zu diesem Zweck aktivieren Strategie I-Pflanzen die Eisenchelatreduktase
in Wurzeln, welche durch eine Farbreaktion in vielen Pflanzen nachgewiesen wurde,
25 und Eisentransporter. Zu einem bedeutenden Teil werden diese Reaktionen auf
transkriptioneller Ebene bei Eisenmangel in der Wurzel angeschaltet, wie Studien im
Modellsystem *Arabidopsis thaliana* ergeben haben. In *Arabidopsis* ist eine Induktion
bei Eisenmangel für das Gen der FeIII-Chelatreduktase, *fro2* (Robinson et al. (1999)
Nature 397:694-697), und das Gen für einen Transporter von zweiwertigen
30 Metallionen, *irt1* (Koshunova et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40:37-44) beschrieben.
Die Gene für NRAMP-Proteine mit Transportkapazitäten für Eisen, wie
ATNRAMP3 und ATNRAMP4, werden in *Arabidopsis thaliana*-Wurzeln bei
Eisenmangel verstärkt exprimiert (Thomine et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

97:4991-4996), während andererseits die Expression des Gens von ATNRAMP1, das für ein Protein mit geringeren Eisentransportkapazitäten als ATNRAMP3 und ATNRAMP4 kodiert, nicht von Eisenmangel beeinflusst wird (Curie et al. (2000) Biochem. J. 347:749-755). Ein wichtiger Punkt aber ist, dass die bei Eisenmangel induzierten Transportmechanismen nicht für Eisen spezifisch sind, sondern auch von anderen zweiwertigen Metallionen verstärkt genutzt werden, beispielsweise Zink, Mangan, Cadmium (Nelson (1999) EMBO J., 18:4361-4371; Thomine (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4991-4996; Koshunova et al. (1999) Plant Mol. Biol. 40:37-44). Der zentrale Kern der Strategie II ist die erhöhte Produktion und Sekretion von Phytosiderophoren und die anschließende Aufnahme von Komplexen der Phytosiderophoren mit zweiwertigem Eisen über induzierte Transportmechanismen (Mori (1999) Curr. Opin. Plant Biol. 2:250-253).

Da eine positive Beeinflussung der Mineralstoffaufnahme zu einer verstärkten Vitalität der Pflanzen, einer höheren Biomasseproduktion und somit zu besseren Erträgen führt, sind neue und effiziente Ansätze zur Beeinflussung des Mineralstoffhaushalts für die Landwirtschaft von großem Interesse. Bisher wurde in Pflanzen die Mineralstoffaufnahme beeinflusst, indem Mineralstoffe zum Nährmedium, zum Boden oder auch direkt zu den Pflanzen gegeben wurden (Düngung). Zur Behebung von Eisenmangel wurden Pflanzen beispielsweise mit einer Lösung behandelt oder besprüht, die Eisen-Chelatkomplexe enthält. Gentechnologische Ansätze haben bislang nicht zum gewünschten Erfolg geführt bzw. sind bisher nicht beschrieben worden.

Die bisher zur Behebung von Mineralstoffmangel oder zur Beeinflussung des Mineralstoffhaushalts herangezogenen Ansätze über Düngung sind sehr teuer, aufwendig und u.U. schädlich für die Umwelt.

Es ist jetzt überraschenderweise gelungen, erstmals eine für ein FER-Protein kodierende DNA-Sequenz bereitzustellen. Die in dieser Anmeldung offenbarte

DNA-Sequenz eignet sich für eine positive Beeinflussung des Mineralstoffhaushalts und der Anreicherung und Speicherung von Mineralstoffen in transgenen Pflanzen.

Die für FER-Proteine kodierenden *fer*-Gene kontrollieren in Wurzeln die Eisen-
5 aufnahme und die Reaktionen des Eisenmangelstress. Beim FER-Protein handelt es sich um einen DNA-bindenden Regulator, der in der Wurzel von Strategie I-Pflanzen die Eisenaufnahme auf transkriptioneller Ebene kontrolliert.

Zum Beispiel erfolgt dies durch die Induktion von Genen für Transporter von Eisen
10 und anderen Metallionen, wie *nramp* oder auch *irt*, oder auch von Genen, die für die Eisenreduktase kodieren.

FER-Protein bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch, dass das Protein von einem Gen kodiert wird, nämlich dem *fer*-Gen, welches am *fer*-Locus in der
15 Tomatenlinie T3238fer (siehe Ling et al. (1996) Mol. Gen. Genet. 252:87-92) mutiert ist. Diese Mutation führt zu dem von Ling et al. (1996, vide supra) beschriebenen *fer*-Phänotyp, der sich dadurch äußert, dass die Mutante im Unterschied zum Wildtyp nicht in der Lage ist, die Antworten von Strategie I-Pflanzen auf Eisenmangel anzuschalten, d.h. die Pflanzen sind z.B. nicht in der Lage, durch eine Erhöhung der
20 Fe^{3+} -Reduktase-Aktivität auf den Eisenmangelstress reagieren.

Weiter bedeutet FER-Protein bzw. *fer*-Gen im Sinne der Erfindung auch, dass der *fer*-Phänotyp (wie z.B. von Ling et al. (1996, vide supra) für die Tomatenlinie T3238fer beschrieben) durch Transformation von Pflanzen, die diesen Phänotyp
25 zeigen, mit dem *fer*-Gen gemäß der vorliegenden Erfindung, also einer funktionalen Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder 2, komplementiert werden können. Anders gesagt, ein *fer*-Gen im Sinne der vorliegenden Erfindung ist eine DNA-Sequenz, die, wenn sie auf Pflanzen mit *fer*-Phänotyp übertragen und dort exprimiert wird, den *fer*-Wildtyp wiederherstellt, also den *fer*-Phänotyp funktionell komplementiert. Die
30 komplementierten Pflanzen können wie der Wildtyp die für Strategie I-Pflanzen

typischen Eisenmangelstress-Reaktionen zeigen und daher z.B. im Unterschied zu der fer-Mutante auf Fe^{3+} im Boden bzw. im Wachstumsmedium überleben.

Die gezielte Kontrolle der fer-Expression in transgenen Pflanzen bietet vielfältige
5 und aussichtsreiche Möglichkeiten für die Beeinflussung des pflanzlichen Mineralstoffwechsels. Durch die Bereitstellung des fer-Gens für die Übertragung auf Pflanzen besteht nun die Möglichkeit, die Aktivität des FER-Proteins zu beeinflussen und damit positive Effekte auf den Mineralstoffwechsel und auf die Anreicherung und Speicherung von Mineralstoffen hervorzurufen. Die Beeinflussung der Aktivität
10 des FER-Proteins erfolgt z.B. durch eine veränderte Expression des fer-Gens in den transgenen Pflanzen.

Hierdurch ist es möglich, im Unterschied zum Stand der Technik, den Mineralstoffhaushalt vorwiegend intern in der Pflanze zu beeinflussen, ohne dass
15 eine wesentliche äußere Zugabe von Mineralstoffen notwendig ist. Die interne Beeinflussung erfolgt durch Veränderung des FER-Proteingehalts in transgenen Pflanzen.

Die veränderte Aktivierung von FER in transgenen Pflanzen hat verschiedene
20 positive Effekte. Zum einen können hierdurch eine verstärkte Vitalität der Pflanzen, eine höhere Biomasseproduktion und somit letztlich bessere Erträge erreicht werden. Kultursorten wie z.B. Getreide, Kartoffel können somit besser auf Mineralstoffmangelböden angebaut werden, so dass die teure und umweltschädliche
Düngung mit Mineralstoffen entfällt.

25 Zum anderen können dank der Bereitstellung des fer-Gens Pflanzen mit erhöhter fer-Expression erzeugt werden, die aufgrund einer verstärkten Mineralstoffaufnahme eine bessere Konkurrenz um Mineralstoffe aufweisen und dadurch gegenüber Schädlingen und Unkrautpflanzen bevorteilt werden, so dass diese Pflanzen
30 resistenter gegenüber Schädlingen und Unkrautpflanzen sind als Wildtyppflanzen

ohne erhöhte fer-Expression. Dadurch würde die teure und umweltschädliche Schädlings- und Unkrautbekämpfung entfallen oder könnte zumindest verringert werden.

- 5 Darüber hinaus kann durch eine veränderte gewebespezifische Expression von fer-Genen erreicht werden, dass die Pflanzen Mineralstoffe in bestimmten Pflanzenteilen wie beispielsweise Blättern, Wurzeln, Knollen, Früchten oder Samen anreichern und dadurch für die menschliche Ernährung wertvoller werden.
- 10 Schließlich liefert die vorliegende Erfindung die Möglichkeit, Pflanzen zu erzeugen, die aufgrund ihrer veränderten fer-Expression dem Boden Schwermetallionen entziehen können und dadurch zur Sanierung von Schwermetall-belasteten Böden eingesetzt werden können (Phytoremediation), weil in der Regel Schwermetalle wie Cadmium ähnliche oder gleiche Aufnahmemechanismen benutzen wie Eisen.
- 15 Es ist jetzt erstmals gelungen, ein fer-Gen der Tomate zu isolieren und zu charakterisieren. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen eröffnen eine grundlegende neue Möglichkeit, den pflanzlichen Mineralstoffwechsel zu beeinflussen. Sie können mittels geeigneter Vektoren in das Genom von Pflanzen
- 20 übertragen werden, wodurch transgene Pflanzen mit veränderter Synthese von FER-Protein erzeugt werden. Diese veränderten FER-Proteinmengen haben Auswirkung auf die Regulation von fer-Zielgenen, wie beispielsweise Genen für Metalltransporter und Eisenreduktasen, und führen zu einer veränderten Effizienz der Mineralstoffaufnahme aus dem Boden, insbesondere von Eisen, Zink, Mangan,
- 25 Kupfer, aber auch von Schwermetallionen wie beispielsweise Cadmium und/oder zu einer veränderten Verteilung und Speicherung dieser Mineralstoffe in den verschiedenen Pflanzenorganen und Zellkompartimenten.

- Grundsätzlich sind die neuen DNA-Sequenzen für einen Transfer in beliebige
- 30 Pflanzen geeignet. Bevorzugt ist jedoch der Einsatz des fer-Gens aus dikotylen

Pflanzen für die gleichen oder für weitere dikotyle Pflanzen, z.B. Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe etc. Der Einsatz von aus monokotylen Pflanzen erhaltenen fer-DNA-Sequenzen ist demzufolge für andere monokotyle Pflanzen bevorzugt, z.B. der Einsatz des fer-Gens aus Gerste in Geste, Reis oder anderen Getreidearten.

5

Die Übertragung zusätzlicher fer-Genkopien in das Genom von Pflanzen sowie die Organ- und Ontogenese-spezifische Expression des fer-Gens führen durch veränderte FER-Produktion in der transgenen Pflanze zu einer veränderten Expression der potentiellen Zielgene, wie Gene für Eisenreduktase und Mineralstofftransporter.

10 Dadurch werden Mineralstoffe in einer veränderten Weise in Zielorgane transportiert, in denen fer in veränderter Weise exprimiert wird.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt somit in der Bereitstellung von DNA-Sequenzen, die für FER-Regulatorproteine kodieren, sowie in der Bereitstellung von
15 transgenen Pflanzen, die einen im Vergleich zu ihrer Wildtypeform veränderten Gehalt an FER-Regulatorprotein und aufgrund dessen einen veränderten Mineralstoffhaushalt, insbesondere eine veränderte Eisenaufnahme aufweisen.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, Verfahren zur Veränderung der
20 Mineralaufnahme, insbesondere der Eisenaufnahme in transgenen Pflanzen bereitzustellen. Weitere Aufgaben ergeben sich aus dem oben gesagten bzw. der nachfolgenden Beschreibung. Die vorstehend genannten und weitere Aufgaben der Erfindung werden durch die in den unabhängigen Patentansprüchen definierten Gegenstände gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen werden in den abhängigen
25 Patentansprüchen dargestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird erstmals eine DNA-Sequenz offenbart, die ein FER-Protein kodiert. Vorzugsweise stammt die Sequenz aus *Lycopersicon esculentum*. Eine bevorzugte, für ein FER-Protein aus Tomate kodierende DNA-
30 Sequenz ist in SEQ ID No. 1 und 2 gezeigt, wobei SEQ ID No. 1 das fer-Gen zeigt

und SEQ ID No. 2 die aus der *fer* mRNA abgeleitete cDNA-Sequenz angibt. SEQ ID No. 3 zeigt die Aminosäuresequenz des FER-Proteins aus Tomate.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff „*fer*-Gen“ oder „für ein
5 FER-Protein kodierende DNA-Sequenz“ für eine Nukleinsäuresequenz verwendet,
die für ein aktives DNA-bindendes Regulatorprotein kodiert, wobei das
Regulatorprotein in der Wurzel von Strategie I-Pflanzen die Eisenaufnahme auf
transkriptioneller Ebene kontrolliert und wobei die kodierenden Bereiche der
Nukleinsäuresequenz mit der kodierenden Sequenz in SEQ ID No. 1 bzw. 2 eine
10 Sequenzidentitätsgrad von mindestens 45%, 50%, 55%, 60%, vorzugsweise von
mindestens 70%, 75%, 80%, 85%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und am
meisten bevorzugt von mindestens 92%, 94%, 96%, 98% aufweist.

Durch Bereitstellung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen kann die
15 Eisenaufnahme in transgenen Pflanzen positiv beeinflusst werden, wobei dies
besonders bevorzugt durch Überexpression des *fer*-Gens in den transgenen Pflanzen
bzw. -zellen erfolgt.

Die Beobachtung, dass der Mineralstoffhaushalt durch die Übertragung und
20 Expression exogener *fer*-DNA-Sequenzen positiv beeinflusst werden kann, lässt sich
in idealer Weise für die Erzeugung von Pflanzen einsetzen, die aufgrund eines
gegenüber Wildtyppflanzen verbesserten Mineralstoffhaushalts vitaler, ertragreicher
und widerstandfähiger sind.

25 Grundvoraussetzung für die Erzeugung solcher Nutzpflanzen ist die Verfügbarkeit
geeigneter Transformationssysteme. Hier wurde während der letzten zwei Jahrzehnte
ein breites Spektrum an Transformationsmethoden entwickelt und etabliert. Diese
Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter
Verwendung *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als
30 Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer

isolierter DNA in Protoplasten, die Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten. Diese Transformationstechniken sind dem Fachmann bekannt oder sie können in Übersichtsartikeln bzw. entsprechenden Nachschlagewerken gefunden werden.

Neben der Verwendung der hier erstmals offenbarten fer-DNA-Sequenzen kann der Fachmann weitere für FER-Proteine kodierende DNA-Sequenzen aus anderen Organismen als Tomate mittels herkömmlicher molekularbiologischer Techniken selbst auffinden und im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzen. So kann der Fachmann beispielsweise geeignete Hybridisierungs- und/oder genomischen Banken des jeweils gewünschten Organismus, also z.B. Kartoffel oder Getreide, aus dem ein neues fer-Gen isoliert werden soll, einsetzen. Hierbei kann der Fachmann auf geläufige Hybridisierungs-, Klonierungs- und Sequenzierungsmethoden zurückgreifen, die in jedem bio- oder gentechnologischen Labor wohl bekannt und etabliert sind (siehe z.B. auch Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York). Der Fachmann kann natürlich auch anhand der erfindungsgemäßen Sequenzen geeignete Oligonuklotide-Primer für PCR-Amplifikation von fer-Sequenzen synthetisieren und einsetzen. Selbstverständlich besteht auch die Möglichkeit, die gesamte, unten als SEQ ID NO:1 bzw. SEQ ID No. 2 angegebene DNA-Sequenz als Hybridisierungs- und/oder Klonierungs- und/oder Sequenzierungssonde in herkömmlichen Hybridisierungstechniken einzusetzen.

Im Allgemeinen kann der Fachmann durch Vergleich der fer-Genesequenz oder FER-Aminosäuresequenz mit Sequenzen aus verschiedenen Sequenzdatenbanken (genomische Sequenzen, BAC-Sequenzen, EST-Sequenzen, cDNA-Sequenzen) verschiedener Organismen (z. B. aus diversen Genomprojekten) Gene mit hoher Ähnlichkeit zu fer identifizieren. Diese Gene können dann mit herkömmlichen

Methoden der PCR und Genklonierung bearbeitet werden. Um fer-ähnliche Gene aus Organismen zu identifizieren, die sich nicht in Datenbanken befinden, können aus der fer-Sequenz Oligonukleotide zur PCR oder RT-PCR abgeleitet werden. Zum Design solcher Oligonukleotide eignen sich beispielsweise Regionen, die zwischen dem fer-Gen aus Tomate und dem zu diesem Gen ähnlichen Gen in Arabidopsis
5 weitestgehend identisch sind (siehe Figur 3).

In den erfindungsgemäßen rekombinanten Nukleinsäuremolekülen, die eine für ein FER-Protein kodierende DNA-Sequenz enthalten, kann die kodierende
10 Nukleinsäuresequenz wie im nativen Gen, also in 5'-3'-Richtung in operativer Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotors vorliegen. Auf diese Weise kann eine Überexpression der kodierenden Sequenz in den transgenen Pflanzen erreicht werden, und somit eine Erhöhung der FER-Aktivität. Eine erhöhte Aktivität kann auch mit Teilsequenzen der gesamten cDNA erreicht werden, wenn die
15 Teilfragmente die notwendigen Eigenschaften zur Regulation aufweisen.

Auf der anderen Seite kann auch eine Downregulierung der endogenen FER-Aktivität erstrebenswert sein, z. B. kann es nützlich sein, in bestimmten Zellen die Mineralstoffaufnahme und den Mineralstofftransport auszuschalten, um diese
20 Vorgänge an einer anderen geeigneten Stelle besser kontrollieren zu können. Dazu müsste man die fer-Aktivität in den Zellen ausschalten, wo sie unerwünscht ist, z. B. durch den antisense-Ansatz, das Phänomen der Co-Suppression oder Doppelhybrid-RNA-Bildung. In sämtlichen Fällen muss nicht zwingend die gesamte natürlicherweise für ein FER-Protein kodierende Nukleinsäuresequenz übertragen
25 und transkribiert werden, es können vielmehr auch Fragmente der kodierenden Region ausreichen, soweit diese Fragmente die Erzielung der gewünschten Effekte, d.h. Co-Suppression einerseits bzw. Antisense-Inhibierung andererseits gewährleisten. Der Fachmann kann z.B. geeignete Deletionskonstrukte herstellen und durch Übertragung auf transgene Pflanzenzellen prüfen, ob ein bestimmtes
30 Fragment der kodierenden Region den erfindungsgemäßen Effekt, nämlich die

Inhibierung der endogenen FER-Aktivität hat oder nicht. Wie im Rahmen dieser Anmeldung verwendet, schließt die Formulierung „DNA-Sequenz, die für ein FER-Protein kodiert“ somit auch solche DNA-Sequenzen und Fragmente ein, die zwar nicht für ein aktives Protein kodieren, deren Anwesenheit und Transkription in
5 Sense- oder Antisense-Orientierung aber eine Co-Suppression respektive Antisense-Inhibierung in transgenen Pflanzenzellen bewirkt. Man kann solche Fragmente im Zusammenhang mit der Erfindung auch als „Antisense- oder Suppressions-aktive“ FER-DNA-Fragmente bezeichnen. Auch der vollständige genomische Klon eines FER-Proteins oder Teile davon können übertragen werden, um die gewünschte
10 Inhibierung des endogenen FER zu erreichen.

Eine weitere Möglichkeit, die Inhibierung der endogenen FER-Aktivität zu erreichen, besteht in dem als RNA-Interferenz bekannten Verfahren, bei dem über das gezielte Ausschalten von mRNA-Molekülen die Bildung eines bestimmten
15 Proteins, im vorliegenden Fall also des FER-Proteins, unterbunden wird (Elbashir et al. (2001) Nature 411, 494 – 498; Waterhouse et al. (2001) Nature 411, 834 – 842).

Auch bei der RNA-Interferenz führt die von außen zugeführte spezifische RNA zu einer Zerstörung der entsprechenden Ziel-mRNA und damit zum Fehlen des
20 entsprechenden Proteins. Die Methode eliminiert somit nicht das Gen, sondern nur sein funktionelles Produkt (mRNA und Protein). Es handelt sich somit um ein der anti-sense-Methode ähnliches Verfahren, wobei man bei der anti-sense-Methode eine RNA-Sequenz verwendet, die komplementär zur mRNA ist, während bei der RNA-Interferenz die anti-sense-RNA in Form einer Doppelstrang-RNA zugegeben wird.
25 Gegenwärtig wird angenommen, dass die RNA-Sequenzen mit Proteinen in der Zelle einen Komplex bilden, der spezifisch die vorgegebene Ziel-RNA erkennt und spaltet. Durch die Synthese von bestimmten RNA-Doppelstrangkettens kann somit festgelegt werden, welche Ziel-mRNA in der Zelle zerstört werden soll.

Im Falle der RNA-Interferenz-Methode kann der Literatur entnommen werden, welche Fragmentlängen sich für die Inhibierung des FER-Proteins eignen. Häufig sind kurze, etwa 21 Basenpaare lange Doppelstrang-RNA-Moleküle vorteilhaft (Elbashir et al. (2001) vide supra). Auch hier ist der Fachmann in der Lage, geeignete
5 Fragmente auszuwählen und auf ihre Eignung im RNA-Interferenz-Verfahren zu testen.

In jedem Fall ist der Begriff „antisense“ dahingehend zu verstehen, dass die für ein FER-Protein kodierende Sequenz bzw. ein „antisense-aktives“ Fragment davon in
10 antisense-Orientierung, also „verkehrt“ herum in 3'→5'-Richtung, in operativer Verknüpfung mit einer in Pflanzenzellen aktiven Promotorregion vorliegt und transkribiert wird. Die RNA, die bei der Transkription eines derartigen Antisense-Gens entsteht, ist komplementär zur RNA des endogenen Gens und kann die Synthese des FER-Proteinprodukts verhindern, indem es zur Hybridisierung
15 zwischen der nativen und der Antisense-RNA kommt.

Im Falle des alternativ einsetzbaren Co-Suppressionskonstrukts liegt die für ein FER-Protein kodierende Sequenz bzw. ein „Co-Suppressions-aktives“ Fragment davon in sense-Orientierung (also in 5'→3'-Richtung) in operativer Verknüpfung mit einer in
20 Pflanzenzellen aktiven Promotorregion vor. Bei dem Phänomen der Co-Suppression wird das endogene Gen durch zusätzlich eingeführte, identische (Teil)Kopien dieses Gens inaktiviert. Diese Inaktivierung ist vermutlich auf einen RNA-abhängigen Mechanismus zurückzuführen, an dem die RNA-dirigierte RNA-Polymerase beteiligt ist.

25

Im Falle der Doppelhybrid-RNA liegt die für ein FER-Protein kodierende Sequenz sowohl in sense (5'→3') – als auch antisense (3'→5') – Orientierung direkt oder durch ein Intron oder andere Sequenz operativ verknüpft vor.

Weiter bedarf es zur Ausführung der erfindungsgemäßen Verfahren lediglich geeigneter regulatorischer Sequenzen, die die Transkription einer operativ verknüpften fer-DNA-Sequenz in der transformierten Pflanze bzw. Pflanzenzelle steuern. Auch hier kann der Fachmann geeignete Sequenzen problemlos dem Stand
5 der Technik entnehmen oder selbst besonders geeignete Promotorsequenzen isolieren. Für diverse Pflanzen geeignete Promotoren lassen sich der Literatur entnehmen. Außerdem können neue Promotoren mittels aktueller Genomprojekte identifiziert werden. Z. B. können transgene Pflanzenlinien nach neuen Promotoraktivitäten gescreent werden, welche promotorlose GUS-Konstrukte
10 integriert haben (Springer (2000) plant Cell 12:1007-1020). Explosionsanalysen von zahlreichen oder der Gesamtheit aller EST-Sequenzen (RNA-Profiling, Affymetrix) können Rückschlüsse auf geeignete Promotoren zulassen. Dadurch können Promotoren identifiziert werden, die organspezifisch (z. B. Wurzel, Samen, Blüten, Blatt etc.), gewebespezifisch (z. B. Gleitgefäße, Cortex, Epidermis)
15 entwicklungsspezifisch oder auch induzierbar sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform steht die für das FER-Protein kodierende DNA-Sequenz unter der Kontrolle des 35S-Promotors.

20 Obwohl eine gewebespezifische Expression bevorzugt wird, kommt für die Expression des erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in pflanzlichen Zellen jede Art von regulatorischer Sequenzen in Frage, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hier ist jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor eingeschlossen. Dabei kann der Promotor so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt
25 oder nur in spezifischem Geweben zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung und/oder zu einem durch äußere Einflüsse, biotische oder abiotische Stimuli bestimmten Zeitpunkt (induzierte Genexpression). In bezug auf die zu transformierende Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Bei Verwendung eines konstitutiven Promotors kann eine zell- bzw. gewebespezifische
30 Expression auch dadurch erreicht werden, dass die Genexpression in den Zellen bzw.

Gewebe, in denen sie nicht erwünscht ist, gehemmt wird, beispielsweise durch Ausprägung von Antikörpern, die das Genprodukt binden und somit seine Aktivität unterbinden, oder durch geeignete Inhibitoren.

- 5 Konstitutive oder gewebe- bzw. entwicklungsspezifische oder induzierbare Gene bzw. Promotoren kann der Fachmann dem Stand der Technik, insbesondere den einschlägigen wissenschaftlichen Journalen und Datenbanken entnehmen. Darüber hinaus ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger
- 10 molekularbiologischer Methoden regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren, wobei hier als Methoden beispielhaft zu nennen sind für die Identifizierung von Genen mit interessanten Promotoren transgene Pflanzenlinien mit Reporter-Gen-Konstrukten (siehe oben), RNA-Profilings, Affymetrix, in der Literatur beschriebene Gene bzw. Promotoren, subtraktives Screening von Banken nach spezifisch
- 15 exprimierten cDNA, und für die Klonierung der Promotoren. Die Klonierung über PCR-Produkte, Genom-Walking, die Isolierung von genomischen Klonen, Cosmiden, BACs, Lambda, inverse PCR o. ä. zum Erhalt von Insertionspunkten bei transgenen Linien, Klonierung: Hybridisierung mit Sonden.
- 20 Ferner sind optional Transkriptions- bzw. Terminationssequenzen vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines PolyA-Tails an das Transkript dienen können, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben und beliebig austauschbar.
- 25 Schließlich erfolgt die Herstellung chimärer Genkonstrukte, in denen fer-kodierende DNA-Sequenzen unter Kontrolle von regulatorischen Sequenzen stehen, die eine Expression in Pflanzenzellen gewährleisten, mittels konventioneller Klonierungsmethoden (siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989), supra). Die

vorliegende Erfindung betrifft somit ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend:

- 5 a) regulatorische Sequenzen eines in Pflanzengewebe, insbesondere in Wurzeln, aktiven Promotors;
- b) operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein FER-Protein kodiert; und
- c) ggf. operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in
- 10 Pflanzenzellen dienen können.

Die DNA-Sequenz, die ein FER-Protein kodiert, kann aus natürlichen Quellen isoliert oder nach bekannten Verfahren synthetisiert werden. Vorzugsweise stammt die erfindungsgemäße DNA-Sequenz aus *Lycopersicon esculentum*.

15 Mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe beispielsweise Sambrook et al. (1989) supra), ist es möglich, gewünschte Konstrukte für die Transformation von Pflanzen vorzubereiten bzw. herzustellen. Die für die gentechnologische Manipulation in prokaryontischen Zellen üblicherweise

20 eingesetzten Klonierungs-, Mutagenisierungs-, Sequenzanalyse-, Restriktionsanalyse- und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden sind dem Durchschnittsfachmann wohl bekannt. So können nicht nur geeignete chimäre Genkonstrukte mit der gewünschten Fusion von Promotor und fer-DNA-Sequenz hergestellt werden, vielmehr kann der Fachmann mittels Routinetechniken, falls

25 erwünscht, verschiedenartige Mutationen oder Deletionen in die FER-kodierende DNA-Sequenz einführen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die DNA-Sequenz, die ein aktives FER-Protein kodiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus:

- a) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 angegebene kodierende Nukleotidsequenz oder Fragmente davon umfassen, wobei die Länge der Fragmente ausreicht, um ein Protein mit FER-Protein-Aktivität zu kodieren;
- 5 b) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID No. 2 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren, wobei die Länge der Fragmente ausreicht, um FER-Protein-Aktivität zu besitzen;
- 10 c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die zu einer Nukleotidsequenz von a) oder b) degeneriert ist oder mit einem komplementären Strang der Nukleotidsequenz von a) oder b) hybridisiert, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen, wobei die Länge dieser Teile ausreicht, um ein Protein mit FER-Protein-Aktivität zu kodieren;
- 15 d) DNA-Sequenzen, die zu der in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 angegebenen Nukleotidsequenz eine Sequenzidentität von mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 92, 94, 96, 98% aufweist;
- 20 e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen, wobei die Länge des Fragments ausreicht, um ein Protein mit FER-Protein-Aktivität zu kodieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Zusammenhang dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (1989, vide
25 supra) beschrieben sind.

Erfindungsgemäß wird eine Hybridisierung in vitro immer unter Bedingungen durchgeführt werden, die stringent genug sind, um eine spezifische Hybridisierung zu gewährleisten. Solche stringenten Hybridisierungsbedingungen sind dem
30 Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (Sambrook et al.,

2001, Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Allgemein bedeutet "spezifisch hybridisieren", dass ein Molekül unter stringen-
- 5 Bedingungen präferenziell an eine bestimmte Nukleotidsequenz bindet, wenn diese Sequenz in einem komplexen Gemisch von (z.B. Gesamt-) DNA oder RNA vorliegt. Der Begriff „stringente Bedingungen“ steht allgemein für Bedingungen, unter denen eine Nukleinsäuresequenz präferenziell an ihre Zielsequenz hybridisieren wird, und zu einem deutlich geringeren Ausmaß oder überhaupt nicht an andere Sequenzen.
- 10 Stringente Bedingungen sind z.T. Sequenz-abhängig und werden unter verschiedenen Umständen unterschiedlich sein. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Im Allgemeinen werden stringente Bedingungen so ausgewählt, dass die Temperatur etwa 5 °C unter dem thermischen Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und
- 15 einem definierten pH liegt. Die T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke, pH und Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der zu der Zielsequenz komplementären Moleküle zu der Zielsequenz im Gleichgewichtszustand hybridisieren. Typischerweise sind stringente Bedingungen solche, bei denen die Salzkonzentration mindestens ungefähr 0,01 bis 1,0 M Natriumionen-Konzentration
- 20 (oder ein anderes Salz) bei einem pH zwischen 7,0 und 8,3 beträgt und die Temperature mindestens ungefähr 30 °C für kurze Moleküle (also z.B. 10-50 Nukleotide) beträgt. Zusätzlich können stringente Bedingungen, wie oben bereits erwähnt, durch Zugabe destabilisierender Agenzien, wie beispielsweise Formamid, erreicht werden.
- 25
- Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der oben beschriebenen DNA-Sequenzen, die ein FER-Protein kodieren. Der Ausdruck "Derivat" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Sequenzen sich von den oben beschriebenen DNA-Sequenzen an einer oder mehre-
- 30 ren Positionen unterscheiden, aber einen hohen Grad an Ähnlichkeit zu diesen

Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen DNA-Sequenzen können dabei beispielsweise durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

- 5 Ähnlichkeit bzw. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 45%, 50%, 55%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, 64%, 68%, vorzugsweise eine Identität von mindestens 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, besonders bevorzugt von mindestens 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, noch mehr bevorzugt von mindestens 90%, 92%, 94% und am meisten bevorzugt von mindestens 96% und
10 mindestens 98%.

- Dabei weisen die durch diese DNA-Sequenzen kodierten Proteine eine Sequenzidentität zu der in SEQ ID No. 2 bzw. 3 angegebenen Aminosäuresequenz von mindestens 45%, 50%, 55%, insbesondere eine Identität von mindestens 60%, 64%,
15 66%, 68%, vorzugsweise eine Identität von mindestens 70%, 74%, 76%, 78%, 80%, besonders bevorzugt von mindestens 82%, 86%, 90%, 92%, 94% und am meistens bevorzugt von mindestens 96%, 98% auf.

- Homologiegrade bzw. Sequenzidentitäten werden üblicherweise über verschiedene
20 Alignment-Programme, wie z. B. CLUSTAL festgestellt. Allgemein stehen dem Fachmann zur Bestimmung der Sequenzidentität/-ähnlichkeit geeignete Algorithmen zur Verfügung, z.B. auch das Programm, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (z.B. der Link „Standard nucleotide-nucleotide BLAST [blastn]“) zugänglich ist.

- 25 Bei den DNA-Sequenzen, die ähnlich zu den oben beschriebenen Sequenzen sind und Derivate dieser Sequenzen darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Sequenzen, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise
30 auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen

- 18 -

Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden.

5 Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stammt die beschriebene, für eine FER-Protein kodierende DNA-Sequenz aus *Lycopersicon esculentum* (wie in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 angegeben).

Die Erfindung betrifft weiterhin Vektoren und Mikroorganismen, die erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthalten und deren Verwendung die
15 Herstellung von Pflanzenzellen und Pflanzen ermöglicht, deren Mineralstoffhaushalt, insbesondere deren Eisenaufnahme gegenüber Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. -Pflanzen verändert ist. Dabei handelt es sich bei den Vektoren insbesondere um Plasmide, Cosmide, Viren, Bakteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren. Bei den Mikroorganismen handelt es sich in erster Linie um Bakterien,
20 Viren, Pilze, Hefen und Algen.

Des Weiteren wird bei der vorliegenden Erfindung ein rekombinantes FER-Protein *Lycopersicon esculentum*, insbesondere ein rekombinantes Protein mit der in SEQ ID No. 2 und No. 3 angegebenen Aminosäuresequenz bereitgestellt.

25

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einem gegenüber Wildtyp-Pflanzen bzw. -Pflanzenzellen veränderte Mineralstoffhaushalt, insbesondere veränderte Eisenaufnahme, umfassend die folgenden Schritte:

30

- a) Herstellung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls, das folgende Sequenzen umfasst:
- regulatorische Sequenzen eines in Pflanzen aktiven Promotors;
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die ein FER-Protein kodiert; und
 - optional operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale in Pflanzenzellen dienen können;
- b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf pflanzliche Zellen; und
- c) gegebenenfalls die Regeneration intakter Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.

Die Erfindung betrifft ferner Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, die ein FER-Protein kodieren, enthalten. Die Erfindung betrifft ebenfalls Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial transgener Pflanzen sowie die transgenen Pflanzen selbst, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten. Transgene Pflanzen der vorliegenden Erfindung weisen aufgrund der Einführung einer FER-kodierenden DNA-Sequenz eine gegenüber Wildtyppflanzen veränderte Eisenaufnahme auf.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen bzw. deren Zellen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird dann für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert, und das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysenmethode zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im

Allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden.

5

Wie bereits erwähnt, stehen für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung, wobei der Fachmann die jeweils geeignete Methode ohne Schwierigkeiten ermitteln kann. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von

10 *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmedium, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Einbringung von DNA mittels biolistischer Methoden sowie weitere Möglichkeiten, die bereits seit mehreren Jahren gut etabliert sind und zum üblichen Repertoire des

15 Fachmanns in der pflanzlichen Molekularbiologie bzw. Pflanzenbiotechnologie gehören.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt

20 für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide, wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens empfehlenswert. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt, und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen.

25

Je nach Einführungsmethode der gewünschten Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muss mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der im Ti- bzw. Ri-

30 Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen

verbunden werden. Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *fer*-Region. Intermediäre Vektoren können allerdings nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren dagegen können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid enthalten, welches eine *fer*-Sequenz innerhalb der T-DNA trägt, welche in die Pflanzenzelle übertragen wird. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in allseits bekannten Übersichtsartikeln und Handbüchern zur Pflanzentransformation beschrieben worden. Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker,

der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonylharnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter

5 Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten. Hierzu sind auch alternative Marker geeignet, wie nutritive Marker, Screeningmarker (wie GFP, green fluorescent protein). Selbstverständlich kann auch vollkommen auf Selektionsmarker verzichtet werden, was allerdings mit einem ziemlich hohen Screeningbedarf einhergeht. Falls markerfreie transgene Pflanzen erwünscht sind,

10 stehen dem Fachmann auch Strategien zur Verfügung, die eine nachträgliche Entfernung des Markergens erlauben, z.B. Cotransformation, Sequenz-spezifische Rekombinasen.

Die Regeneration der transgenen Pflanzen aus transgenen Pflanzenzellen erfolgt nach

15 üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen können dann mittels üblicher Verfahren, einschließlich molekularbiologischer Methoden, wie PCR, Blot-Analysen, auf Anwesenheit der eingeführten Nukleinsäure, die ein FER-Protein kodiert bzw. auf Anwesenheit des Genprodukts, also des FER-Proteins untersucht werden.

20 Bei der transgenen Pflanze bzw. den transgenen Pflanzenzellen kann es sich um jede beliebige monokotyle oder dikotyle Pflanze bzw. Pflanzenzelle handeln, in der der Mineralstoffhaushalt, insbesondere die Eisenaufnahme verändert, vorzugsweise verbessert werden soll. Vorzugsweise handelt es sich um Nutzpflanzen bzw. Zellen

25 von Nutzpflanzen. Besonders bevorzugt handelt es sich um Solanaceen wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Paprika, aber auch andere dikotyle (z. B. Zuckerrübe) bzw. monokotyle Pflanzen (z. B. Reis, Mais, Weizen). Prinzipiell ist jede Nutzpflanze für die Umsetzung der Erfindung erstrebenswert, die für Ernährungszwecke unmittelbar oder mittelbar geeignet ist.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial und Ernteprodukte der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge usw.

- 5 Die spezifische Expression des FER-Proteins in den erfindungsgemäßen Pflanzen bzw. in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen kann mit Hilfe herkömmlicher molekularbiologischer und biochemischer Methoden nachgewiesen und verfolgt werden. Dem Fachmann sind diese Techniken bekannt und er ist problemlos in der Lage, eine geeignete Nachweismethode zu wählen, beispielsweise eine Northern-
- 10 Blot-Analyse zum Nachweis FER-spezifischer RNA bzw. zur Bestimmung der Höhe der Akkumulation von FER-spezifischer RNA oder eine Southern-Blot-Analyse zum Nachweis von für FER kodierende DNA-Sequenzen.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Veränderung der

- 15 Mineralstoffaufnahme, insbesondere der Eisenaufnahme in Pflanzen, umfassend die folgenden Schritte:

- a) die Übertragung eines rekombinanten Nukleinsäuremoleküls oder Vektors, der eine DNA-Sequenz enthält, die für ein FER-Protein kodiert, auf
- 20 Pflanzenzellen;
- b) die Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.

- Die vorliegende Erfindung wird in den nachfolgenden Beispielen, die nur der Veranschaulichung der Erfindung dienen und keiner Weise als Einschränkung zu
- 25 verstehen sind, erläutert.

Beispiele

Die Tomatenlinie T3238fer, die aus der Bor-ineffizienten Tomatenlinie T3238 als Mutante stammt, ist nicht in der Lage, unter Eisenmangelbedingungen die für Strategie I Pflanzen-typischen Eisenmangelstressreaktionen zu aktivieren (Brown et al. (1971) *Physiol. Plant.* 25:48-53; Brown et al. (1974) *Physiol. Plant.* 31:221-224). Die mutierten Pflanzen zeigen bei Eisenmangel weder erhöhte Reduktaseaktivität noch andere physiologische oder morphologische Veränderungen, die für die effiziente Aufnahme von Eisen bei Eisenmangel angeschaltet werden. Da die fer-Mutation zahlreiche Auswirkungen hat, agiert fer vermutlich zentral auf transkriptioneller Ebene. Bei Wachstum in Erde sterben fer-Pflanzen mit fer-Mutation noch während der vegetativen Phase ab. Pflanzen mit fer-Mutation können partiell oder vollständig gerettet werden, indem sie in Erde ständig mit Eisen in Form von Eisenhydroxyethylendiamintriessigsäure (Fe-HEDTA) gedüngt oder auf MS-Medium angezogen werden. Bei der fer-Mutante handelt es sich um eine rezessive Mutante, bei der ein einziges Gen betroffen ist, das auf Chromosom 6 der Tomate 0,33 cM von TG590 und 2,0 cM von TG118 entfernt kartiert wurde (Ling et al. (1996) *Mol. Gen. Genet.* 252:87-92).

20 Marker-gestützte Isolierung des fer-Gens

Zur Isolierung des fer-Gens wurde die Marker-gestützte Genklonierungstechnik eingesetzt (Chromosome Walk). Diese Technik wurde in der Tomate bereits mehrfach erfolgreich angewandt. Im Falle der Klonierung von fer erfolgte die Methode analog derjenigen von chloronerva, das vor zwei Jahren erfolgreich abgeschlossen wurde und in Ling et al. (*PNAS Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) 96:7098-7103) mit allen Referenzen beschrieben ist. Die Techniken zum Arbeiten mit YAC, BAC und Cosmid Klonen sind Birren et al. (Green et al., Eds, *Genome Analysis, A laboratory Manual*, CSHL Press, USA, 1997) entnommen.

Der Beginn der Genkartierung und des Chromosome Walking bei *fer* wurde in Ling et al. (1996) Mol. Gen. Gent. 252: 87-92) beschrieben. In dieser Publikation wurde die Kartierung von *fer* auf Chromosom 6 zwischen den beiden Markern TG590 und TG118 beschrieben.

Für die Marker-gestützte Genklonierungstechnik wurde die in Ling et al. (1996) supra beschriebene Kartierungspopulation von 1244 F2-Pflanzen auf 1815 F2-Pflanzen der Kreuzung *L. esculentum* T3238*fer* x *L. pennellii* ausgeweitet. 6 rekombinante Pflanzen wurden zwischen TG590 und *fer* gefunden, sowie 35 rekombinante Pflanzen zwischen *fer* und TG118. Der in Ling et al. (1996) supra begonnene Chromosome Walk wurde fortgesetzt wie in Abb. 1 dargestellt. Zunächst wurden ausgehend von den in Ling et al. (1996) supra beschriebenem YAC-Ende 149AR zwei weitere YAC-Klone isoliert und deren Ende kartiert (267L und 328N1). Mit 267L und 328N1 gelang die Isolierung des YAC 337, der die gesamte *fer* Region umspannt und auf beiden Seiten des *fer* Gens nach je zwei Rekombinationsereignissen endet. Mit dem Ende Y337D konnten BAC Klone identifiziert werden, von denen zwei näher charakterisiert wurden. Die BAC-Klone wurden durch Filterhybridisierung identifiziert. Filter und BAC-Klone wurden von Research Genetics, Inc, USA bezogen. Das Ende von BAC 53M23 kosegrierte mit *fer*. Ausgehend von 53M23 und 337D wurde ein Kosmidkontig wie in Ling et al. (1999) supra beschrieben erstellt. Zwei BAC-Klone, BAC 56B23 und BAC 53M23 wurden mit Hilfe der Shot-Gun-Methode vollständig sequenziert. Dazu wurde die gescherte und in 1kb fraktionierte BAC-DNA mittels des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen, kloniert und sequenziert. Mit Hilfe der Kosmidenden sowie entsprechenden Sequenzanalyseprogrammen wurde die Sequenz der *fer*-Region vollständig zusammengestellt. An verschiedenen Stellen der Sequenz wurden Sonden zum Kartieren abgeleitet, so dass das *fer*-Gen schliesslich auf einem Bereich von 18kb lokalisiert werden konnte. Dieser 18kb grosse Bereich enthält zwei offene Leserahmen, von denen einer für eine Transposase kodiert und als *fer*-Gen daher

nicht in Frage kommt. Der zweite offene Leserahmen kodiert für ein 34kD-Protein und ist das fer-Gen.

5 Molekulare Analyse des fer-Gens in T3238FER-Wildtyp- und T3238fer-Mutantenlinie

Das fer-Gen kosegregiert mit der fer-Mutation und weist einen RFLP-Polymorphismus zwischen der Mutantenlinie T3238fer und der Mutterlinie T3238FER auf. Während die Mutterlinie T3238FER in einer RFLP-Analyse ein EcoRV-Fragment von 4,8kb aufweist, wie es sich auch aus der Sequenzanalyse ergibt, weist die mutante Linie T3238fer zwei Fragmente von 4,5kb und 4,0kb auf (siehe Figur 2). Dieser Polymorphismus weist auf eine Insertion oder ein Rearrangement hin, welche die fer-Region in der Mutante betreffen.

15

Beschreibung der fer-DNA und FER-Aminosäuresequenzen

Ein Vergleich der Sequenz des fer-Gens mit Sequenzen aus der Gendatenbank zeigte, dass das fer-Gen für ein Protein mit konservierter basischer Helix-Loop-Helix-DNA-Bindedomäne kodiert. Die höchste Sequenzähnlichkeit weist das fer-Gen mit einem Gen aus *Arabidopsis thaliana* auf, das auf Chromosom II lokalisiert ist (DNA-Accession No. AC005851 kodierende Sequenz von 72093 bis 73201bp, Gen=At2g28160, hier im folgenden *Atfer* genannt, Protein-Accession No. AAC984501.1). Für das Arabidopsis-Gen wurde bisher keine Funktionsanalyse beschrieben. Es kann somit nicht gesagt werden, ob die Sequenzen zwischen fer und Atfer lediglich ähnlich sind oder ob die Gene tatsächlich homolog sind, d. h. die Funktionen homolog sind.

Außerhalb der konservierten Helix-Loop-Helix-Domäne bestehen zwischen *fer* und *Atfer* Sequenzähnlichkeiten im N-terminalen als auch C-terminalen Bereich, sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene (siehe Figur 3a). Im Gegensatz dazu weisen andere Helix-Loop-Helixproteine keine Sequenzähnlichkeiten außerhalb des konservierten Motifs auf. Ein Vergleich von cDNA und genomischer Sequenz zeigt, dass das *fer*-Gen über drei Introns verfügt. Die Positionen der ersten beiden Introns sind in *fer* und *Atfer* konserviert (siehe Figur 3b), was möglicherweise eine enge Verwandtschaft von *fer* und *Atfer* bedeutet.

10

Expressionsanalysen des *fer*-Gens

Northern-Blot-Analysen gesamter RNA von Wurzeln, Blättern und Stengel zeigen, dass das *fer*-Gen nur in Wurzelgeweben exprimiert wird (Figur 4a). Mit Hilfe von reverser Transkription-PCR konnten keine bzw. nur sehr geringe Mengen an Transkripten in Kotyledonen, Blättern oder Blüten nachgewiesen werden (siehe Figur 4b). Die Expression des *fer*-Gens in der Wurzel ist abhängig von der Zugabe von dreiwertigem Eisen. In Hoagland-Lösung (Scholz et al. (1987) Bioch. Physiol. Plant. (1987) 63:99-104) mit 100 µM Fe-HEDTA angezogene Pflanzen wiesen eine starke Expression von *fer* in Wurzeln auf (4a). Bei Wildtyp- und *fer*-Pflanzen, die bis zum Alter von drei Wochen in Hoagland-Lösung mit 10 µM Fe-NaEDTA, danach jedoch in Hoagland-Lösung mit je 0,1 µM, 10 µM und 50 µM Fe-NaEDTA angezogen wurden, erfolgte die Expression des *fer*-Gens in den Wurzeln konstitutiv (Figur 4b). Hingegen waren keine Transkripte durch Northern-Blot-Analyse in Wurzeln von Wildtyp-Pflanzen nachweisbar, die in Hoagland-Lösung mit 100 µM Fe-HEDTA angezogen wurden.

Expression von Zielgenen in *fer*-Mutanten

30

Eine Analyse der Expression von Transportergenen im Beispiel

- "Expressionsanalysen des fer-Gens" beschriebenen Wildtyp-fer-Pflanzen, die in Hoagland-Lösung mit je 0,1 μM , 10 μM und 50 μM Fe-NaEDTA angezogen wurden, ergab, dass nramp-Gene in den Wurzeln von fer-Pflanzen nicht exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu werden diese nramp-Gene in Wildtyp-Wurzeln konstitutiv exprimiert.

- FER reguliert nramp-Gene entweder direkt durch Bindung an nramp-Promotoren oder indirekt nach Anschalten einer Signalkaskade. FER ist somit ein direkter oder indirekter Regulator von nramp-Genen in der Wurzel.

Erzeugung transgener Pflanzen mit Expression des fer-Gens aus Tomate

- Die kodierende Sequenz des fer-Gens wurde hinter den 35S-Promotor in einen Pflanzentransformationsvektor (pBINAR, Höfgen et al. (1990) Plant Science 66:221-230) kloniert und in mutante fer-Tomatenpflanzen überführt. Transformation und Regeneration von fer Pflanzen stellten in vitro kein Problem dar, weil der fer Phänotyp in vitro auf MS Medium gerettet wird.

- Bei Überführung in Erde wurde beobachtet, dass nicht-transgene Kontrollpflanzen schon bald Blattchlorosen und Nekrosen entwickelten, während die mit dem 35S-fer Konstrukt transformierten Pflanzen gerettet wurden. Das fer-Gen kann somit zur Behebung von Mineralstoffchlorosen eingesetzt werden. Die Transformation und Regeneration wurde nach üblichen Protokollen durchgeführt.

Beschreibung der Figuren

- Figur 1 erläutert die Marker-gestützte Isolierung des fer-Gens.

(oben) Dargestellt ist die Abdeckung der fer-Region mit YAC- und BAC-Klonen. Kartierte Enden von genomischen BAC- und YAC-Klonen sind eingezeichnet sowie deren Abstand von fer-Gen anhand der Anzahl der Rekombinationsereignisse.

- 5 (mitte) Vergrößerte Ansicht der fer-Region mit eingezeichneten Kosmiden.
(unten) Darstellung von offenen Leserahmen der 18 kb fer-Region.

Fig. 2 zeigt das Ergebnis einer Southern-Blot-Hybridisierung des fer-Gens in Tfer und verschiedenen Wildtyplinien

- 10 Genomische DNA von der Mutantenlinie T3238fer, den Wildtyplinien T3238FER, Moneymaker, LA483 und TA56 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnitten und in einer Southern-Blot-Analyse mit der fer-cDNA als Sonde hybridisiert.

- 15 Fig. 3a zeigt den Vergleich der cDNA-Sequenzen aus Tomate und *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 3b zeigt einen Vergleich der FER-Aminosäuresequenzen aus Tomate und *Arabidopsis thaliana*.

- Die kodierenden Sequenzen von Lefer (Le steht für *Lycopersicon esculentum*) und
20 Atfer (At steht für *Arabidopsis thaliana*) beginnt mit dem ATG-Startkodon und endend mit dem TAA-Stopkodon wurden mit Hilfe des Clustal Programms des DNASTAR Inc. (Meg Align 4.0) – Sequenzanalysepakets verglichen. Identische Basenpositionen wurden schwarz unterlegt. Die Aminosäuresequenzen FER (Tomate) und ATFER wurden mit Hilfe des Clustal Programms verglichen.
25 Identische Aminosäurepositionen sind schwarz unterlegt.

Fig. 4 zeigt Expressionsanalysen des fer-Gens

- a) Northern-Blot-Analyse:
fer Transkripte wurden auf Gesamt RNA von Wurzeln, Blättern und Stengeln von
30 Wildtyppflanzen (Mm, Moneymaker) und fer-Pflanze (Tfer) in einer Northern-Blot-

- 30 -

Analyse mit radioaktiv markierter *fer* cDNA nachgewiesen. Die Pflanzen wurden jeweils in Hoagland-Lösung mit 100 μ M Fe-NaEDTA oder Fe-HEDTA angezogen.

b) Reverse Transkription-PCR-Analyse:

mRNA wurde revers mit oligodT-Primern in cDNA transkribiert. Mit spezifischen

- 5 Oligonukleotidprimern wurden DNA-Fragmente von *fer* und als Positivkontrolle vom Elongationsfaktorgen *ef-1 α* amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und durch Southern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen. Für die Expressionsanalyse in verschiedenen Geweben wurde RNA von zwei Wochen alten Keimlingen isoliert

- 10 (r = Wurzel, rt = Wurzelspitzen, hy = Hypokotyl, cot = Kotyledonen, 1= erste Blatt). Zwei Wochen alte Pflanzen wurden in Hoagland-Lösung mit entweder 0,1, 10 oder 50 μ M Fe-EDTA überführt. Wurzelproben zur RNA-Präparation wurden vor Beginn des Experiments (0) nach sechs Stunden (6h), acht Stunden (8H), zwei, vier und acht Tagen (2-8d) entnommen.

15

Fig. 5 zeigt die Expression von *nramp*-Genen in Wildtyp- und *fer*-Pflanzen. Die reverse Transkription-PCR-Analyse wurde wie im Zusammenhang mit Fig. 4b durchgeführt, jedoch mit *nramp*-spezifischen Oligonukleotiden.

20

P A T E N T A N S P R Ü C H E

- 5 1. DNA-Sequenz, die für ein FER-Protein kodiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- a) DNA-Sequenzen, die die in SEQ ID No. 1 oder SEQ ID No. 2 angegebene kodierende Nukleotidsequenz oder Teile davon umfassen,
- b) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz umfassen, die die in SEQ ID No. 2
10 oder SEQ ID No. 3 angegebene Aminosäuresequenz oder Fragmente davon kodieren;
- c) DNA-Sequenzen, die eine Nukleotidsequenz, die zu einer Nukleotidsequenz von a) oder b) degeneriert ist, oder Teile dieser Nukleotidsequenz umfassen;
- d) DNA-Sequenzen, die zu der in SEQ ID No. 1 bzw. SEQ ID No. 2 angegebenen
15 Nukleotidsequenz eine Sequenzidentität von mindestens 45%, 50%, 55%, vorzugsweise mindestens 60%, 70%, 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 92, 94, 96, 98% aufweist;
- e) DNA-Sequenzen, die ein Derivat, Analog oder Fragment einer Nukleotidsequenz von a), b), c) oder d) darstellen.
- 20
2. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, die aus Tomate stammt.
3. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend die folgenden Elemente:
- 25 - regulatorische Sequenzen eines in Pflanzenzellen aktiven Promotors,
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2,
 - ggf. operativ daran gebunden regulatorische Sequenzen, die in der Pflanzenzelle als Transkriptions-, Terminations- und/oder Polyadenylierungssignale dienen können.

- 32 -

4. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei die DNA-Sequenz in sense- und/oder antisense-Orientierung vorliegen kann.
5. Rekombinantes FER-Protein, das durch eine DNA-Sequenz nach
5 Anspruch 1 oder 2 kodiert wird oder das eine Aminosäuresequenz aufweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) Aminosäuresequenz wie in SEQ ID No. 2 oder 3 angegeben oder Fragmente davon, und
- b) Aminosäuresequenz, die zu der in SEQ ID No. 2 oder 3 angegebenen
10 Aminosäuresequenz eine Sequenzidentität von mindestens 45%, 50%, 55%, vorzugsweise mindestens 60%, 70%, 80%, besonders bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 92, 94, 96, 98% aufweist.
6. Rekombinantes FER-Protein nach Anspruch 5, das aus Tomate stammt.
15
7. Verfahren zur Veränderung des Mineralstoffhaushalts, insbesondere zur Veränderung der Mineralstoffaufnahme und zur Veränderung der Eisenaufnahme in transgenen Pflanzen, umfassend die folgenden Schritte:
- a) Herstellung eines rekombinantes Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 3 oder 4,
20 b) Übertragung des Nukleinsäuremoleküls aus a) auf transgene Pflanzen bzw. Pflanzenzellen; und
- c) ggf. Regeneration von Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.
8. Pflanzenzelle, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 1 oder 2
25 oder ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 3 oder 4, oder hergestellt nach Anspruch 7.
9. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 8, die einen gegenüber Wildtypzellen erhöhten FER-Protein-Gehalt aufweist.

- 33 -

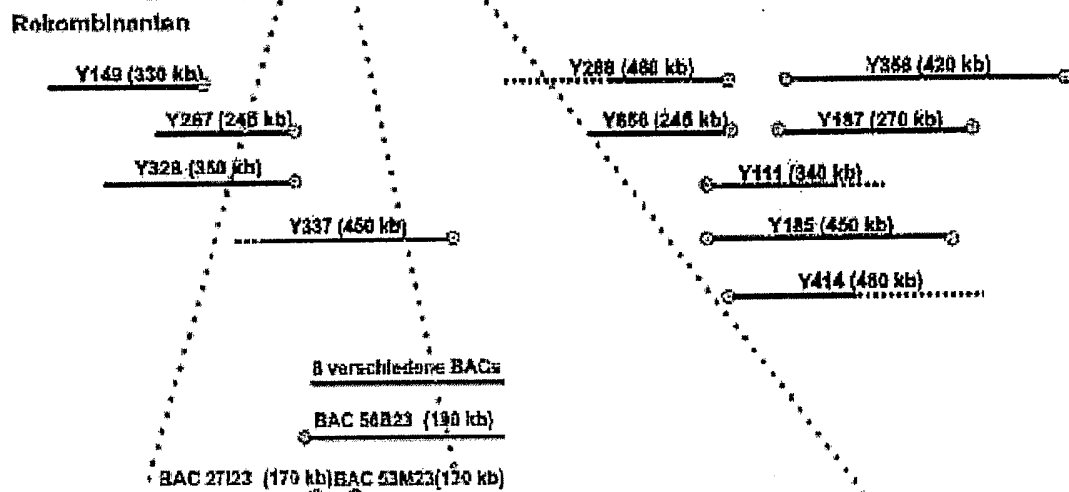
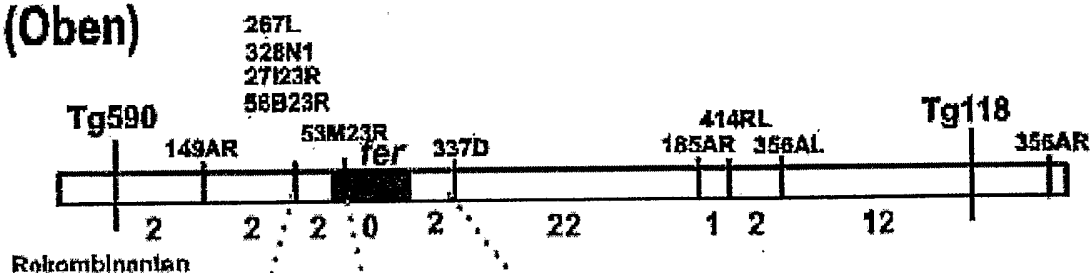
10. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 8 oder 9, die eine gegenüber Wildtypzellen erhöhte Mineralstoffaufnahme, insbesondere Eisenaufnahme, aufweist.

- 5 11. Transgene Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 8 bis 10 oder hergestellt nach einem Verfahren nach Anspruch 7, sowie Teile dieser Pflanzen, transgene Ernteprodukte und transgenes Vermehrungsmaterial dieser Pflanzen, wie Protoplasten, Pflanzenzellen, Kalli, Samen, Knollen, Stecklinge, sowie die transgenen Nachkommen dieser Pflanzen.

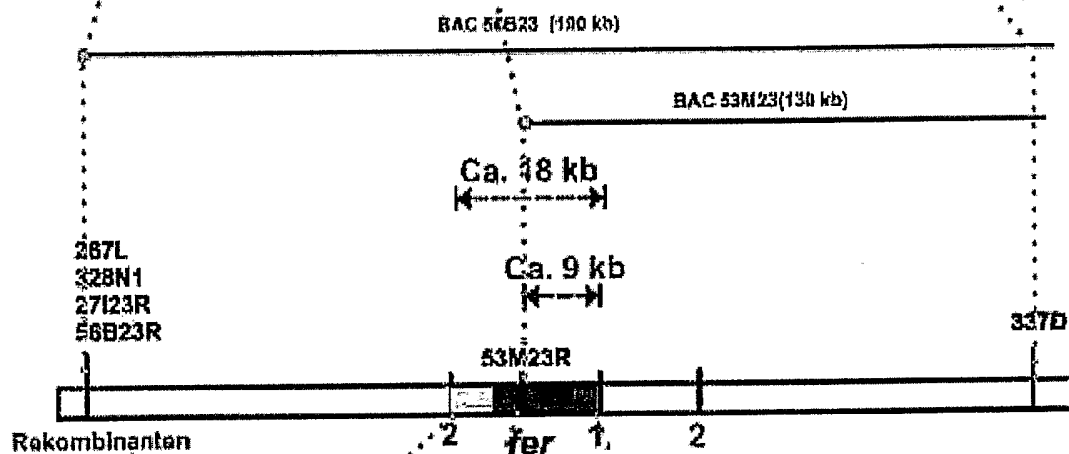
10

Fig. 1

(Oben)



(Mitte)



(Unten)

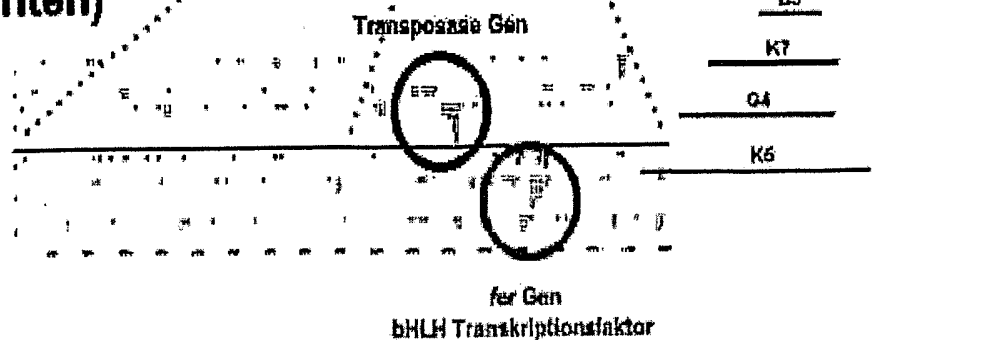
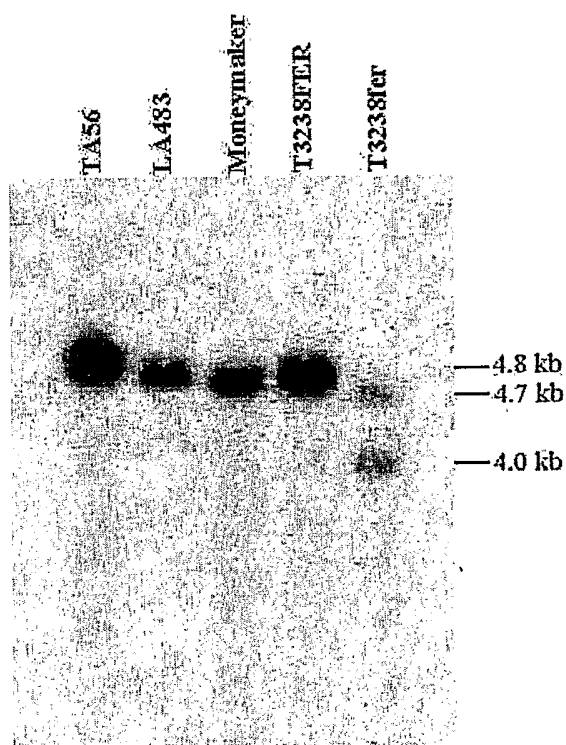


Fig. 2



3/8

Fig. 3a

1 ATGGAAAGG - - - AA - GAGTCAACGCTCTGTCTC Atfer
 20 ATGGAGAGGTGGTAAATGCATCAATGGGAAAAATA Lefer

 27 A - AACATAAACGATCTCGAAGCTTCACCAATTTT Atfer
 51 ATAATGTTAATGATAATTGGGCTTATTAATTTT Lefer

 57 CTTGGTCTGATCCA AACCTTTCGATCAGTTTCATA Atfer
 82 CTTGGATGAGGATAAATTTTGAACAATAATTCATTT Lefer

 88 AACCTCATATAAGAGGG - - AGATCATCAAAACCAT Atfer
 113 GAGCTTATTAGGGGTGAAACCTGCTGATCC - - Lefer

 117 TGACGA AAAACCCAGTTCTTGATTTTCGATCTTT Atfer
 142 TATTGT AAAATTTTGTGCCCAAAACATAATGATTTGT Lefer

 148 GGTCCATTACAAAACAAGCCCCGTGTTTTCATAG Atfer
 173 GAAC - AT - ATGACA - GGTGTGTTTTCCTGCAG Lefer

 179 ACGAGAA CCAAGTTTCATCCCAACACCTGTGTCGA Atfer
 201 CCAATGCCCCAAATTTTGAAGCCCAATAT - TATCG - Lefer

 210 TGACCTCTTTCGACGGAATTTGCCCTGACTTAGAGAC Atfer
 230 - - - - - TCGATGGATT - - - - - TCATA TGA Lefer

 241 TCCAACGTTTGCTGAATCATTTCCGTAGCTTTCG Atfer
 247 TACAACAATTGCTCAGATCCCTATT - TC GCTAT - Lefer

 272 ACGGTGATAGTGTTTAGAGCCGGTGGTGAAGA Atfer
 276 ATAACTGCGAAATCA - AGCTG - - GATAATAA Lefer

 303 AGATGAAGAAGGATTAACAACGACGGTGTATGAT Atfer
 304 TGATGATGAAGACGATGATGAAATCTTCTGGGC Lefer

 334 TCTTCA GCCCACTACTACGAATAATGATGGGA Atfer
 335 ACAACG GCTTACCACCA - A AATGACTCCCAACA Lefer

 365 CC CGTAAAG - ACGAA GACTGATCGGTC TAGGA Atfer
 365 AGCAAAAGGCAACGAGGACTGACCGGTC CAGAA Lefer

 395 CTTTGATCTCTTGAGAGGAAGAAGAAAGGAGAGGGCG Atfer
 396 CTTTGATTTCGGGAGCGCAAAAGGAGAGGGAAG Lefer

 426 TATGAAGGATTAAGCTTTTATGCAATTGA GATCT Atfer
 427 AATGAAGGAATAAGCTTTTACGCTTTGCGATCTC Lefer

 457 CTT GTTCCCAATATTTACTAAGATGGATAAAG Atfer
 458 TTAGTTCCTAATATTCACAAAGATGGATAAAG Lefer

488 C A T C C A T T G T T G G A G A T G C A G T G T T G T A T G T Atfer
 489 C C T C C A T C A T T G G A G A T G C A A T A T T A T A C G T Lefer

 519 T C A A G A A C T T C A G T C A C A A G C G A A G A A A C T C Atfer
 520 A C A A G G A C T A C A A A C C A A A G C A A A G A A A C T T Lefer

 550 A A A T C C G A T A T C G C G G G T C T T G A A G C T T C T T Atfer
 551 A A A G T T G A A A T A G C A G A G T T T G A G - - - T C A T Lefer

 581 T A A A C T C T A C T G G A G G G T A C C A A G A A C A T G C Atfer
 579 C A A G - - - - - T G G A A T A T T T C A A A - - - - - Lefer

 612 T C C T G A T G C T C A A A A G A C T C A A C C T T T T C G C Atfer
 597 - - - - - A T G C A - A A G A A A A T G A A - - - T T T C A C Lefer

 643 G G T A T C A A T C C T C C T G C T T C C A A A A A A A T C A Atfer
 619 A - - A C C T A T T A T C C A G C A A T C A A G A G G A T A A Lefer

 674 T T C A G A T G G A T G T T A T A C A A G T G G A G G A G A A A Atfer
 648 C A A A G A T G G A C A T T A A T C A A G T A G A A G A A A A Lefer

 705 A G G G T T T T A T G T G A G A T T G G T G T G T A A C A A A Atfer
 679 A G G A T T T T A C G T G A G A T T A A T T T G C A A C A A A Lefer

 736 G G A G A A G G T G T T G C T C C A T C T C T T T A C A A G T Atfer
 710 G G G C G A C A C A T T G C A G C T T C T C T T T T C A A A G Lefer

 767 C T T T G G A G T C T C T T A C A A G T T T C C A A G T G C A Atfer
 741 C T C T T G A G T C T C T C A A T G G A T T C A A T G T T C A Lefer

 798 G A A C T C T A A C C T A A G C T C T C C T T C T C C G G A C Atfer
 772 A A C T T C C A A C T T G G - - - C T A C T T C T A C C A A T Lefer

 829 A C A T A C C T C T T A A C A T A T A C C T T A G A T G T A A Atfer
 800 G A T T A C A T T T T C A C C T T C A C T C T T T A T G T G A Lefer

 860 A T C A A C - T T G T G C C C T T T T A C T T T G T T T T G T Atfer
 831 G A G A A T G T C A T G A G G T G G A C A T A A A C T T T G G Lefer

 890 T - - T C C G A G T A T A C C G T T T A C T T A C C G A G T T Atfer
 862 C A A T T T G A A G C T A T - G G A T A G C T A G T G C T T T Lefer

 919 T T C T T G T - - G T G G T G G A A A C A G G G G A C A T G C Atfer
 892 T C T T A A T C A A G G G T T T G A C T T C G A G A C A T - C Lefer

 948 T T C G A A C A G A G C T T A A A Atfer
 922 T C C G T - - - T G G T C T A A A Lefer

Fig. 3b

```

1  M E G R V N A L - - S N I N D L E L H N F L V D P N F D Q F I N L I R G D H Q T A t F E R
1  M E S G N A S M E N N V N D I G L I N F L D E D N F E Q F I E L I R G E - - L e F E R

39  I D E N P V L D F - - D L G P L Q N S P C F I D E N - Q F I P T P V D D L F D E A t F E R
38  - T A D P I V N F C P N Y D C E H M T G C F S A A N A Q F E P - - - I L S S L e F E R

76  L P D L D S N V A E S F R S F D G D S V R A G G E E D E D Y N D G D D S S A T A t F E R
72  M D F Y D T T L P D P I S L Y N C E - I K L D N N D D E D D - D E S S G T T A T L e F E R

116 T T N N D G T R K T K T D R S R T L I S E R R R R G R M K D K L Y A L R S L V P A t F E R
110 T K M T P T S K G T R T D R S R T L I S E R K R R G R M K E K L Y A L R S L V P L e F E R

156 N I T K M D K A S I V G D A V L Y V Q E L Q S Q A K K L K S D L A G L E A S L N A t F E R
150 N I T K M D K A S I I G D A I L Y V Q G L Q T K A K K L K V E L A E F E S S - L e F E R

196 S T G G Y Q E H A P D A Q K T Q P F R G I N N B P A S K K I I Q M D V I Q V E E K A t F E R
187 - S G I F Q N - - - A K K M N F T T Y Y P - A I K R I T K M D I N Q V E E K L e F E R

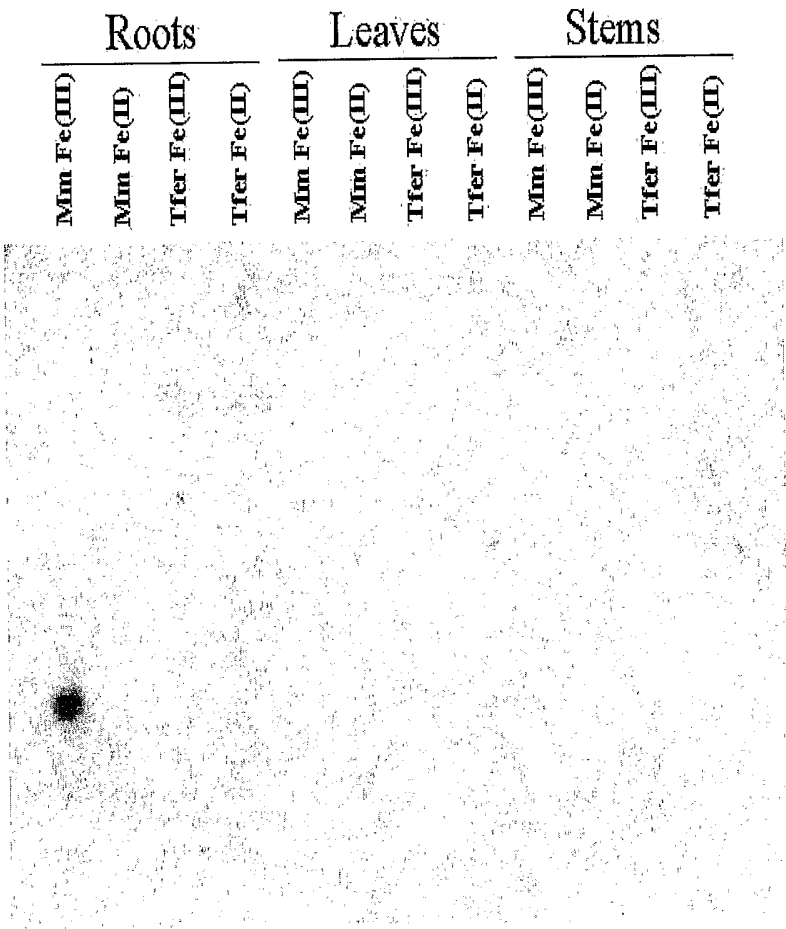
236 G F Y V R L V C N K G E G V A P S L Y K S L E S L T S F Q V Q N S N L S S P S P A t F E R
221 G F Y V R L I C N K G R H I A A S L F K A L E S L N G F N V Q T S N L A T S T N L e F E R

276 D T Y L L T Y T L D V N - - Q L V P F Y F V - - - L F P S I P F T Y R V F L C G A t F E R
261 D - Y I F T T L Y V R E C H E V D I N F G N L K L W I A S A F L N Q G E - - L e F E R

311 G N R G H A S N R A A t F E R
297 - D F E T S P L V . L e F E R

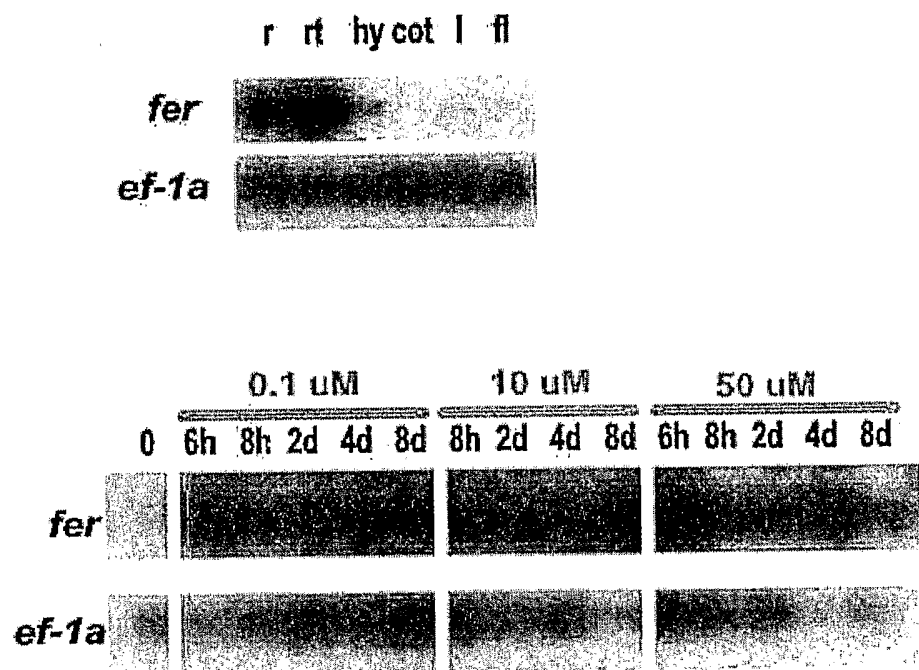
```

Fig. 4a



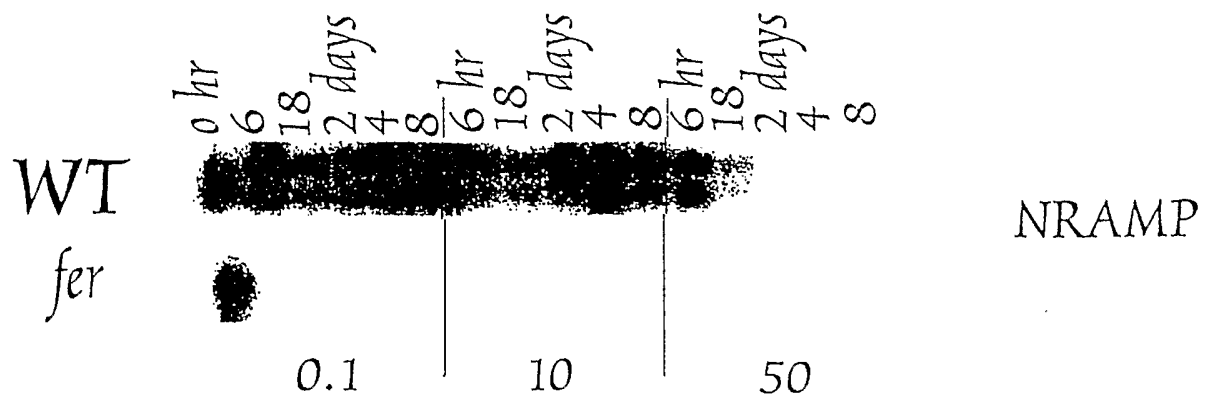
7/8

Fig. 4b



8/8

Fig. 5



SEQUENZPROTOKOLL

<110> IPK-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanze

<120> Verfahren zur Beeinflussung der Mineralstoffaufnahme in transgenen Pflanzen

<130> I 7359

<140>

<141>

<150> DE 101 38 091.7

<151> 2001-08-03

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1789

<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

<400> 1

```
caaaataaaaa aaaaaatgga gagtggtaat gcatcaatgg aaaataataa tggtaatgat 60
attgggctta ttaatttctt ggatgaggat aattttgaac aattcattga gcttattagg 120
ggtgaaactg ctgacacctat tgtaaatttt tgcccaaact atgattgtga acatataaca 180
ggttgttttt cgcagccaa tgcccaattt gagccaatat tatcgctgat ggatttctat 240
gataacaacat tgccagatcc tatttcgcta tataactgcg aaatcaagct ggataataat 300
gatgatgaag acgatgatga atcttctggc acaacggcta ccaccaaaat gactccaaca 360
agcaaaggca cgaggactga ccggtccaga actttgattt cggagcgcaa aaggagagga 420
agaatgaagg aaaagcttta cgcttgcgta tccttagttc ctaatatcac aaaggatatgt 480
atgtacatgc ggattcagga ttgaaagggt gtgggtgctt aaaaaaaatt ttaaaaaaaa 540
gaaatgctac tggcgagatt gaacgcttgc caagtgttc gcgcgcctct tattgcagag 600
gtttaaacca actcacctac agctactttt gttatatgag tgctcattta aattataata 660
acatatatat catattttat atatatatat taaaaatttt cgaaaatcaa tggatgctcg 720
agtaccgcgc ttctggctta ctgggtccgc ccctgtatat gtatgtatgt agtttcaaat 780
attgataaga ccttcaccc tcaatcaatt tcatgatgat tttttgtttg attggcagat 840
ggataaagcc tccatcattg gagatgcaat attatacgta caaggactac aaaccaaagc 900
aaagaaactt aaagttgaaa tagcagagtt tgagtcacatca agtggaatat ttcaaaatgc 960
aaagaaaatg aatttcacaa cctattatcc agcaatcaag aggataacaa aggtttgttt 1020
agtttttact aaaaacttgt taattactta ttttaccaaa taaaacataa ataaatggta 1080
tatattgcag atggacatta atcaagtaga agaaaaagga ttttacgtga gattaatttg 1140
caacaaaggg cgacacattg cagcttctct tttcaaagct cttgagtctc tcaatggatt 1200
caatgttcaa acttccaact tggctacttc taccaatgat tacattttca ccttcactct 1260
ttatgtaggt taccaaactt acattattct tgcaattatt tagtttcaac tttccacctc 1320
atatatttaa catctcaaaa ttaaaaaagt atatattttg atacatttta gtctaaacta 1380
caatattcaa aaatgtttct ttattttctt aaattcaata tgtcaaagtc aaaataagat 1440
aaataaattg aatgaagaaa gtaattatca attcatttgc acctattttt gtttattgga 1500
aatctatgta tagtgatcct ttttgttgtt gtttttttgt gtggaaatgg atatgcaggt 1560
gagagaatgt catgaggtgg acataaactt tggcaatttg aagctatgga tagctagtgc 1620
ttttcttaat caagggtttg acttcgagac atctccgttg gtctaataatc atgttattat 1680
tgtaactttc taaaatactg aactatattt aatttgtatt atcatttagt actcattatc 1740
caaactaaac gggactttta cttaatgaag gaacacttgt tttgattttt 1789
```

<210> 2

<211> 1088

<212> DNA

<213> *Lycopersicon esculentum*

<220>

<221> CDS

<222> (41) .. (931)

<400> 2

```

ggggaaaaaat aaaaaaaaaa tggagagtgg taatgcatca atg gaa aat aat aat 55
                                         Met Glu Asn Asn Asn
                                         1           5

ggt aat gat att ggg ctt att aat ttc ttg gat gag gat aat ttt gaa 103
Val Asn Asp Ile Gly Leu Ile Asn Phe Leu Asp Glu Asp Asn Phe Glu
              10              15              20

caa ttc att gag ctt att agg ggt gaa act gct gat cct att gta aat 151
Gln Phe Ile Glu Leu Ile Arg Gly Glu Thr Ala Asp Pro Ile Val Asn
              25              30              35

ttt tgc cca aac tat gat tgt gaa cat atg aca ggt tgt ttt tcc gca 199
Phe Cys Pro Asn Tyr Asp Cys Glu His Met Thr Gly Cys Phe Ser Ala
              40              45              50

gcc aat gcc caa ttt gag cca ata tta tcg tcg atg gat ttc tat gat 247
Ala Asn Ala Ala Gln Phe Glu Pro Ile Leu Ser Ser Met Asp Phe Tyr Asp
              55              60              65

aca aca ttg cca gat cct att tcg cta tat aac tgc gaa atc aag ctg 295
Thr Thr Leu Pro Asp Pro Ile Ser Leu Tyr Asn Cys Glu Ile Lys Leu
              70              75              80              85

gat aat aat gat gat gaa gac gat gat gaa tct tct ggc aca acg gct 343
Asp Asn Asn Asp Asp Glu Asp Asp Asp Glu Ser Ser Gly Thr Thr Ala
              90              95              100

acc acc aaa atg act cca aca agc aaa ggc acg agg act gac cgg tcc 391
Thr Thr Lys Met Thr Pro Thr Ser Lys Gly Thr Arg Thr Asp Arg Ser
              105              110              115

aga act ttg att tcg gag cgc aaa agg aga gga aga atg aag gaa aag 439
Arg Thr Leu Ile Ser Glu Arg Lys Arg Arg Gly Arg Met Lys Glu Lys
              120              125              130

ctt tac gct ttg cga tcc tta gtt cct aat atc aca aag atg gat aaa 487
Leu Tyr Ala Leu Arg Ser Leu Val Pro Asn Ile Thr Lys Met Asp Lys
              135              140              145

gcc tcc atc att gga gat gca ata tta tac gta caa gga cta caa acc 535
Ala Ser Ile Ile Gly Asp Ala Ile Leu Tyr Val Gln Gly Leu Gln Thr
              150              155              160              165

aaa gca aag aaa ctt aaa gtt gaa ata gca gag ttt gag tca tca agt 583
Lys Ala Lys Lys Leu Lys Val Glu Ile Ala Glu Phe Glu Ser Ser Ser
              170              175              180

gga ata ttt caa aat gca aag aaa atg aat ttc aca acc tat tat cca 631
Gly Ile Phe Gln Asn Ala Lys Lys Met Asn Phe Thr Thr Tyr Tyr Pro
              185              190              195

gca atc aag agg ata aca aag atg gac att aat caa gta gaa gaa aaa 679
Ala Ile Lys Arg Ile Thr Lys Met Asp Ile Asn Gln Val Glu Glu Lys
              200              205              210

gga ttt tac gtg aga tta att tgc aac aaa ggg cga cac att gca gct 727
Gly Phe Tyr Val Arg Leu Ile Cys Asn Lys Gly Arg His Ile Ala Ala
              215              220              225

```

```

tct ctt ttc aaa gct ctt gag tct ctc aat gga ttc aat gtt caa act 775
Ser Leu Phe Lys Ala Leu Glu Ser Leu Asn Gly Phe Asn Val Gln Thr
230                235                240                245

tcc aac ttg gct act tct acc aat gat tac att ttc acc ttc act ctt 823
Ser Asn Leu Ala Thr Ser Thr Asn Asp Tyr Ile Phe Thr Phe Thr Leu
                250                255                260

tat gtg aga gaa tgt cat gag gtg gac ata aac ttt ggc aat ttg aag 871
Tyr Val Arg Glu Cys His Glu Val Asp Ile Asn Phe Gly Asn Leu Lys
                265                270                275

cta tgg ata gct agt gct ttt ctt aat caa ggg ttt gac ttc gag aca 919
Leu Trp Ile Ala Ser Ala Phe Leu Asn Gln Gly Phe Asp Phe Glu Thr
                280                285                290

tct ccg ttg gtc taatatcatg ttattattgt aactttctaa aatactgaac 971
Ser Pro Leu Val
                295

tatatttaaat ttgtattatc atttagtaca ttatccaaac taaacgggac ttttacttaa 1031

tgaagagaaa acttggttttg atttttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1088

<210> 3
<211> 297
<212> PRT
<213> Lycopersicon esculentum

<400> 3
Met Glu Asn Asn Asn Val Asn Asp Ile Gly Leu Ile Asn Phe Leu Asp
 1                5                10                15

Glu Asp Asn Phe Glu Gln Phe Ile Glu Leu Ile Arg Gly Glu Thr Ala
                20                25                30

Asp Pro Ile Val Asn Phe Cys Pro Asn Tyr Asp Cys Glu His Met Thr
                35                40                45

Gly Cys Phe Ser Ala Ala Asn Ala Gln Phe Glu Pro Ile Leu Ser Ser
                50                55                60

Met Asp Phe Tyr Asp Thr Thr Leu Pro Asp Pro Ile Ser Leu Tyr Asn
                65                70                75                80

Cys Glu Ile Lys Leu Asp Asn Asn Asp Asp Glu Asp Asp Asp Glu Ser
                85                90                95

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Thr Lys Met Thr Pro Thr Ser Lys Gly Thr
                100                105                110

Arg Thr Asp Arg Ser Arg Thr Leu Ile Ser Glu Arg Lys Arg Arg Gly
                115                120                125

Arg Met Lys Glu Lys Leu Tyr Ala Leu Arg Ser Leu Val Pro Asn Ile
                130                135                140

Thr Lys Met Asp Lys Ala Ser Ile Ile Gly Asp Ala Ile Leu Tyr Val
                145                150                155                160

Gln Gly Leu Gln Thr Lys Ala Lys Lys Leu Lys Val Glu Ile Ala Glu

```

Phe	Glu	Ser	Ser	Gly	Ile	Phe	Gln	Asn	Ala	Lys	Lys	Met	Asn	Phe		
180						185						190				
Thr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Ile	Lys	Arg	Ile	Thr	Lys	Met	Asp	Ile	Asn	
195						200						205				
Gln	Val	Glu	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Val	Arg	Leu	Ile	Cys	Asn	Lys	Gly	
210						215						220				
Arg	His	Ile	Ala	Ala	Ser	Leu	Phe	Lys	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Asn	Gly	
225						230						235				
Phe	Asn	Val	Gln	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Thr	Ser	Thr	Asn	Asp	Tyr	Ile	
			245						250						255	
Phe	Thr	Phe	Thr	Leu	Tyr	Val	Arg	Glu	Cys	His	Glu	Val	Asp	Ile	Asn	
			260						265						270	
Phe	Gly	Asn	Leu	Lys	Leu	Trp	Ile	Ala	Ser	Ala	Phe	Leu	Asn	Gln	Gly	
275						280						285				
Phe	Asp	Phe	Glu	Thr	Ser	Pro	Leu	Val								
290						295										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern I Application No

PCT/EP 02/08725

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/82 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 A01H

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, WPI Data, PAJ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LING H.-Q. AND GANAL M.W.: "Towards map-based cloning of two genes involved in iron acquisition and metabolism in tomato" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, vol. 23, no. 11&12, - 2000 pages 1953-1967, XP009001692 the whole document	1-11
X	LING ET AL: "Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 252, 1996, pages 87-92, XP002127297 ISSN: 0026-8925 cited in the application Fig. 1 the whole document	1-11

☒ 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

2 December 2002

Date of mailing of the international search report

20/12/2002

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

Stolz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern II Application No

PCT/EP 02/08725

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. BF098042 XP002223160 100% identity with Seq ID 2 in 583 nt overlap (40-622:1-583) abstract ----	1,2,8
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AI896470 XP002223161 78% identity with seq ID 1 in 150 nt overlap (562-710:3-152) abstract ----	1,2,8
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AI896121 XP002223162 66% identity with Seq ID 1 in 222 nt overlap (1278-1491:373-585) abstract ----	1,2,8
X	DATABASE GSN 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AAA15016 XP002223163 58% identity with Seq ID 2 in 328 nt overlap (768-1088:878-1190) abstract ----	1,2,8
X	DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. Q9ZUV8 XP002223164 48% identity with Seq ID 3 in 283 aa overlap (4-265:9-288) abstract ----	5,6
X	DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AAB33105 XP002223165 50% identity with seq ID 3 in 58 aa overlap (117-174:40-97) abstract -----	5,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern les Aktenzeichen

PCT/EP 02/08725

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01H

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, WPI Data, PAJ, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LING H.-Q. AND GANAL M.W.: "Towards map-based cloning of two genes involved in iron acquisition and metabolism in tomato" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, Bd. 23, Nr. 11&12, - 2000 Seiten 1953-1967, XP009001692 das ganze Dokument	1-11
X	LING ET AL: "Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, Bd. 252, 1996, Seiten 87-92, XP002127297 ISSN: 0026-8925 in der Anmeldung erwähnt Fig. 1 das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* 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

2. Dezember 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

20/12/2002

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

Stolz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern()ales Aktenzeichen

PCT/EP 02/08725

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. BF098042 XP002223160 100% identity with Seq ID 2 in 583 nt overlap (40-622:1-583) Zusammenfassung ---	1,2,8
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AI896470 XP002223161 78% identity with seq ID 1 in 150 nt overlap (562-710:3-152) Zusammenfassung ---	1,2,8
X	DATABASE EM-EST 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AI896121 XP002223162 66% identity with Seq ID 1 in 222 nt overlap (1278-1491:373-585) Zusammenfassung ---	1,2,8
X	DATABASE GSN 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AAA15016 XP002223163 58% identity with Seq ID 2 in 328 nt overlap (768-1088:878-1190) Zusammenfassung ---	1,2,8
X	DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. Q9ZUV8 XP002223164 48% identity with Seq ID 3 in 283 aa overlap (4-265:9-288) Zusammenfassung ---	5,6
X	DATABASE SWALL 'Online! retrieved from EMBL Database accession no. AAB33105 XP002223165 50% identity with seq ID 3 in 58 aa overlap (117-174:40-97) Zusammenfassung -----	5,6