

(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
9. Februar 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/012985 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/82 (2006.01)

(74) **Anwalt:** NEUEFEIND, Regina; Maiwald Patentanwalts
GmbH, Elisenhof, Elisenstrasse 3, 80335 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/007688

(81) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2005 (14.07.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 036 456.7 28. Juli 2004 (28.07.2004) DE

(71) **Anmelder** (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; BPS-A30, 67056 Ludwigshafen (DE).

(84) **Bestimmungsstaaten** (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder und**

(72) **Erfinder** (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT [DE/DE]; Zur Förderung der Wissenschaften e.V., Hofgartenstrasse 2, 80539 München (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder** (*nur für US*): PANSTRUGA, Ralph [DE/DE]; Jahnplatz 1, 52066 Aachen (DE). MIKLIS, Marco [DE/DE]; Braubachstrasse 15, 50829 Köln (DE). SCHULZE-LEFERT, Paul [DE/DE]; Earl-von-Linne-Weg 10, 50829 Köln (DE). FRANK, Markus [DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE).

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*

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 PRODUCTION OF TRANSGENIC PLANTS WITH INCREASED PATHOGENIC RESISTANCE BY ALTERING THE CONTENT AND/OR ACTIVITY OF ACTIN-DEPOLYMERISING FACTORS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON TRANSGENEN PFLANZEN MIT ERHÖHTER PATHOGENRESISTENZ DURCH VERÄNDERUNG DES GEHALTS UND/ODER DER AKTIVITÄT VON ACTIN-DEPOLYMERISIERENDEN FAKTOREN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for production of transgenic plants and/or plant cells with increased pathogenic resistance, whereby the transgenic plants or plant cells have an altered content or an altered activity of at least one actin-depolymerising factor (ADF) with relation to the wild type. The invention also relates to the use of nucleic acids, coding for at least one ADF, for the production of transgenic plants or plant cells with increased pathogenic resistance and, furthermore, nucleic acid sequences coding for an ADF.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz, wobei die transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einen im Vergleich zum Wildtyp veränderten Gehalt und/oder eine veränderte Aktivität von mindestens einem Actin depolymerisierenden Faktor (ADF) aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Nukleinsäuren, die für mindestens einen ADF kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die für einen ADF kodieren.

WO 2006/012985 A2

Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter
Pathogenresistenz durch Veränderung des Gehalts und/oder
der Aktivität von Actin-depolymerisierenden Faktoren

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz, wobei die transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen einen im Vergleich zum Wildtyp
10 veränderten Gehalt und/oder eine veränderte Aktivität an mindestens einem Actin-depolymerisierenden Faktor (ADF) aufweisen. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Nukleinsäuren, die für mindestens einen ADF kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz. Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung
15 Nukleinsäuresequenzen, die für einen ADF kodieren.

Pflanzenkrankheiten, die durch verschiedene Pathogene wie z.B. Viren, Bakterien und Pilze verursacht werden, können zu erheblichen Ausbeuteverlusten beim Anbau von Kulturpflanzen führen. Heutzutage werden zur Kontrolle von Pilzerkrankungen
20 Fungizide bei der landwirtschaftlichen Herstellung intensiv benutzt. Trotz solcher Kontrollmöglichkeiten geht ein beträchtlicher Anteil der möglichen Ausbeute infolge von Erkrankungen verloren. Um zum einen diese Ausbeuteverluste und zum anderen die Verwendung von Fungiziden im Allgemeinen zu reduzieren, gibt es seit längerem Bestrebungen, Kulturpflanzen mit einer natürlichen Resistenz gegen
25 wichtige pilzliche Pathogene im Rahmen eines integrierten Pflanzenschutzes zu verwenden. Neben den klassischen Züchtungsverfahren zur Herstellung von Pflanzen mit einer natürlichen Resistenz spielen in den letzten Jahren verstärkt gentechnologische Ansätze eine große Rolle, bei denen z.B. durch Einführen externer Resistenzgene oder durch die Manipulation der endogenen Genexpression in
30 den Pflanzen gezielt Resistenzen in wichtige Kulturpflanzen eingeführt werden sollen.

- 2 -

Bei den natürlicherweise auftretenden Resistenzen können verschiedene Resistenzmechanismen unterschieden werden. Die so genannte vorgeformte "Nicht-Wirt"-Resistenz beschreibt die Beobachtung, dass eine ganze Pflanzenart gegenüber einem spezifischen Erreger resistent ist. Dieses bisher nicht verstandene Phänomen beruht
5 wahrscheinlich auf strukturellen oder chemischen Eigenschaften der Pflanzenart. Dabei kann es sich z.B. um die Dicke des Kutikels, das Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen oder die begrenzte Verfügbarkeit von Nährstoffen handeln.

10 Aktive Resistenzmechanismen umfassen dagegen solche Reaktionen und Mechanismen, die in der Wirtspflanze durch das angreifende Pathogen ausgelöst werden. In der Regel ist letzterer Resistenzmechanismus wichtiger, auch wenn betont werden muss, dass eine klare Trennung zwischen den aktiven Resistenzmechanismen und der vorgeformten Resistenz nicht immer möglich ist (Heitefuss, R. (2001),
15 Naturwissenschaften, 88, 273-283).

Außerdem müssen Unterschiede hinsichtlich der Wirt-Pathogen-Interaktion berücksichtigt werden. Zum Beispiel benötigen obligat biotrophe Pathogene lebendes Wirtsgewebe. Daher kann der schnelle Zelltod im Wirt, wie er durch die so genannte
20 hypersensitive Reaktion (HR) ausgelöst wird, eine wichtige Komponente in der Resistenz gegen biotrophe Pathogene sein. Im Gegensatz dazu bewirken peritrophe Pathogene einen Zelltod im Wirt, der für eine weitere Entwicklung des Pathogens auf dem zerstörten Gewebe notwendig ist.

25 Es muss betont werden, dass Pflanzen gegen die große Mehrheit potentieller Pathogene resistent sind, d.h. eine bestimmte Pflanzenart kann nur durch eine begrenzte Anzahl an Pathogenen erfolgreich angegriffen werden. Das Scheitern eines erfolgreichen Angriffs durch ein Nicht-Pathogen ist die Folge der oben erwähnten "Nicht-Wirt"-Resistenz.

30

Die Voraussetzung für einen erfolgreichen Angriff einer Pflanzenart durch ein Pathogen ist in der so genannten Basiskompatibilität zu sehen, die sich wahrscheinlich infolge einer Koevolution von Pflanzenwirt und den möglichen Pathogenen entwickelt hat. Ein Angriff wird nur erfolgreich sein, wenn das Pathogen
5 über Faktoren verfügt, die es erlauben, die Basisresistenz der Pflanzenart zu überwinden.

Entsprechend werden bestimmte Pflanzenarten bzw. verschiedene Kultivare einer Art gegenüber einem bestimmten Pathogen abhängig von ihrem Genotyp resistent
10 oder empfänglich sein. Die unterschiedlichen Resistenzmechanismen, die für die Resistenz oder Empfänglichkeit einer Pflanzenart bzw. deren Kultivaren gegenüber bestimmten Pathogenen verantwortlich sind, sollen beispielhaft für den Mehltauerreger (*Blumeria graminis*), der mehrere unterschiedliche Gräserarten befällt, dargestellt werden.

15 Der Mehлтаupilz als Art umfasst mehrere *formae speciales* abhängig davon, ob der jeweilige Mehлтаupilz z.B. Weizen oder Gerste befällt. Im Falle des Befalls von Gerste handelt es sich um *Blumeria graminis f. sp. hordei*, während es sich beim Befall von Weizen um *Blumeria graminis f. sp. tritici* handelt. Darüber hinaus
20 können innerhalb der verschiedenen *formae speciales* unterschiedliche Rassen oder Pathotypen identifiziert werden, denen gegenüber unterschiedliche Kultivare der Wirtsarten eine unterschiedliche Resistenz aufweisen.

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Resistenzmechanismen der Gerste
25 gegenüber Mehltauerregern dargestellt, da dieses Wirts-Pathogen-System am besten untersucht ist. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können jedoch auch auf andere Mehltau-Wirt-Systeme wie z.B. den oben erwähnten Befall von Weizen durch Mehltauerreger übertragen werden. Andere Pflanzenarten, die durch Mehltauerreger befallen werden, umfassen z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* (Gerste),
30 *Triticum aestivum* und *T. durum* (Weizen), *Secale cereale* (Roggen), *Avena sativa*

- 4 -

(Hafer), *Lycopersicon spp.* (Tomate), *Vitis spp.* (Wein), *Cucumis spp.* (Gurke),
Cucurbita spp. (Kürbis), *Pisum spp.* (Erbsen), *Prunus spp.* (Pflirsich), *Solanum
tuberosum* (Kartoffel), *Rosa spp.* (Rose), *Fragaria ananassa* (Erdbeere),
Rhododendron spp. (Azalee), *Malus domestica* (Apfel) und *Nicotiana tabacum*
5 (Tabak).

Blumeria graminis f. sp. hordei befällt ausschließlich die Epidermiszellschicht von
Gerstebältern. Der Pilz dringt in die Pflanzenzelle mechanisch und enzymatisch
durch die Zellwand mittels eines Penetrationspflocks ein, bei dem es sich um
10 Konidien, d.h. asexuell gebildete Sporen handelt. Der erfolgreiche Befall von
Gerstenblättern ist erreicht, wenn sich das Haustorium, bei dem es sich um das
pilzliche Ernährungsorgan handelt, gebildet hat.

Man kann zwei verschiedene genetische Mechanismen unterscheiden, die Gerste
15 gegenüber Mehltau Resistenz verleihen. Der erste Mechanismus basiert auf dem so
genannten "Gen für Gen"-Konzept. Bei diesem Mechanismus wird die Resistenz
dadurch erreicht, dass ein dominant agierendes Resistenzgen die Pflanzen nur
gegenüber solchen Pilzisolaten resistent macht, die das entsprechende Avirulenzgen
tragen. In den meisten Fällen ist diese so genannte Rassen-spezifische Resistenz, bei
20 der ein Gerstekultivar nur gegenüber ausgewählten Mehltausisolaten resistent ist,
durch die hypersensitive Reaktion (HR) gekennzeichnet, d.h. die Wirtszellen der
Infektionsstelle sterben ab (Heitefuss, R., *vide supra*).

Im Gegensatz hierzu verleiht der zweite Mechanismus eine Breitbandresistenz gegen
25 alle bekannten Isolate einer formae specialis des Mehltaupilzes und wird durch die
Abwesenheit des so genannten *Mlo*-Wildtypgens gekennzeichnet. Bei *Mlo* handelt es
sich um einen vermutlich negativen Regulator der Pathogenverteidigung (Devoto, A.
et al (1999), J. Biol. Chem., 274, 34993 – 35004). Die Funktion dieses Mechanismus
hängt auch von mindestens zwei weiteren Genen, *Ror1* und *Ror2* ab
30 (Freialdenhoven, A. et al. (1996), Plant Cell, 8, 5 – 14). Die Resistenz bzw.

- 5 -

Inkompatibilität, wie sie durch rezessive *mlo*-Resistenzallele vermittelt wird, ist im Allgemeinen nicht durch das Auftreten einer HR gekennzeichnet. Vielmehr ist der einzige sichtbare zelluläre Effekt, der während der Verteidigung der Pflanze gegen den angreifenden Pilz sichtbar wird, die Bildung einer subzellulären

5 Zellwandapposition, die als Papille bezeichnet wird und sich direkt unterhalb des pilzlichen Penetrationspflocks, dem so genannten Appresorium, bildet. Bei dieser Art der Rasse-unspezifischen Resistenz, die durch rezessive *mlo*-Allele vermittelt wird, werden die Penetrationsversuche des Pilzes auf der Stufe der Papillenbildung inhibiert, d.h. es kommt nicht zur Ausbildung eines Haustoriums, was für die

10 Etablierung eines effizienten Befalls essentiell ist.

Die Pathogen-induzierte Papillenbildung wird auch bei anderen *Gramineae*-Arten beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Rasse-unspezifische Resistenz, wie sie für das Gerste-Mehltau-System bekannt ist, auch bei anderen Pflanzenarten auftaucht.

15 Dafür spricht auch, dass *Mlo*-Proteine bei anderen Arten wie z.B. *Arabidopsis thaliana* oder *Oryza sativa* auftreten.

Da bei der Rasse-unspezifischen Resistenz ein Gerstekultivar gegenüber verschiedensten Mehltausisolaten resistent ist bzw. mehrere Gerstekultivare

20 gegenüber verschiedensten Mehltausisolaten vom *Blumeria graminis f. sp. hordei* resistent sind (und dies, wegen der funktionellen Äquivalenz der *Mlo*-Proteine in den verschiedenen Pflanzenarten, in denen diese auftreten, auch wahrscheinlich für diese Pflanzen gilt), haben diese Pflanzen gegenüber Pflanzen, die nur eine Rasse-spezifische Resistenz besitzen, erhebliche Vorteile und sind von besonderem

25 Interesse. Es besteht daher ein Bedarf an weiteren Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die eine solche Rasse-unspezifische Resistenz gegenüber pilzlichen Erregern wie z.B. Mehltau zeigen.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, transgene Pflanzen bzw.

30 Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber

- 6 -

verschiedenen pflanzlichen Pathogenen aufweisen. Es ist weiterhin eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer Rasse-unspezifischen Resistenz gegenüber verschiedenen pilzlichen Pathogenen wie z.B. Mehltau zur Verfügung zu stellen. Es ist ebenfalls eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, transgene Gerstepflanzen bzw. Gerstepflanzenzellen zur Verfügung zu stellen, die eine Rasse-unspezifische Sequenz gegenüber pilzlichen Pathogenen, wie z.B. dem Mehltau-Erreger aufweisen. Darüber hinaus ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung der oben genannten transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten (Rasse-unspezifischen) Resistenz gegenüber pflanzlichen Pathogenen, wie z.B. Mehltau, ermöglichen.

Zur Lösung dieser und weiterer Aufgaben, wie sie sich aus der Beschreibung ergeben, dienen die Merkmale der unabhängigen Ansprüche.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind durch die Merkmale der Unteransprüche definiert.

Die genannten Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden im Wesentlichen dadurch gelöst, dass ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz zur Verfügung gestellt wird, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens einem Actin-depolymerisierenden Faktor (ADF) gegenüber dem entsprechenden Wildtyp verändert ist.

Wie oben dargestellt wurde, wird die Rasse-unspezifische Resistenz bei Gerste und anderen *Gramineae*n durch rezessive *mlo*-Allele vermittelt. Es sind daher seit längerem Anstrengungen unternommen worden, andere Gene zu identifizieren, die mit dem *Mlo*-Gen interagieren. Durch einen Mutagenese-Screen konnten dabei mit *Ror1* und *Ror2* weitere Gene identifiziert werden, die mit dem *Mlo*-Gen genetisch

- 7 -

interagieren (Freialdenhoven et al, *vide supra*). Ein generelles Problem bei der Identifizierung weiterer Gene, die mit dem *Mlo*-Gen interagieren und damit ebenfalls durch entsprechende Manipulation zur Herstellung einer Rasse-unspezifischen Resistenz verwendet werden könnten, besteht darin, dass, abhängig von dem
5 Screeningverfahren, mit dem modifizierte Infektionstypen nachgewiesen werden, und angesichts der genomischen Redundanz der Gerste die verwendeten Mutagenese-Screeningverfahren nicht immer sensitiv genug sind, um weitere Gene des durch *mlo*-vermittelten Resistenzmechanismus zu identifizieren.

10 In der vorliegenden Erfindung ist es durch einen neuen Screeningansatz, bei dem durch RNA-Interferenz (RNAi) epidermal exprimierte Gene gesilencet werden, erstmals gelungen, neben den bereits erwähnten *Ror1* und *Ror2* ein weiteres Gen zu identifizieren, das genetisch mit *Mlo* interagiert. Dabei handelt es sich um den Actin-depolymerisierenden Faktor 3 (ADF3) aus Gerste, dessen Aminosäuresequenz mit
15 der SEQ ID No. 1 angegeben ist.

Überraschenderweise konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls gezeigt werden, dass die Überexpression oder Repression dieses Actin-depolymerisierenden Faktors eine Rasse-unspezifische Breitbandresistenz der Gerste
20 gegen Mehltau vermittelt.

Die transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen aus Gerste, bei denen der Gehalt und/oder die Aktivität von ADF3 im Vergleich zum Wildtyp verändert ist, weisen somit eine erhöhte Rasse-unspezifische Resistenz gegenüber dem Mehltauerreger
25 auf.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass durch Veränderung des Gehalts und/oder der Aktivität von ADFs im Vergleich zum Wildtyp transgene Pflanzen bzw. Pflanzenzellen verschiedener Pflanzenarten hergestellt werden können, die sich
30 durch eine erhöhte Resistenz gegenüber pflanzlichen Pathogenen und insbesondere

pilzlichen Pathogenen wie Mehltau auszeichnen. Dies sollte insbesondere dann gelten, wenn die pflanzlichen Pathogene zur Etablierung einer effizienten Infektion eine funktionell relevante Interaktion mit dem Actin-Cytoskelett eingehen müssen (siehe unten).

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für den ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodiert. Ebenso Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die für funktionell äquivalente Teile des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren, die für Mutanten des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren oder Nukleinsäuremoleküle, die zu den vorgenannten Nukleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Proteine oder Proteinfragmente, die durch die vorhergehend genannten Nukleinsäuremoleküle kodiert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit im Vergleich zum Wildtyp erhöhter Pathogenresistenz und einem veränderten Gehalt und/oder einer veränderten Aktivität von mindestens einem ADF.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen die Expression von mindestens einem ADF durch Übertragung der oben genannten Nukleinsäuresequenzen oder solcher Nukleinsäuresequenzen, die zu ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 homolog sind, auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen bewirkt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens einem endogenen ADF hoch- oder herunter-reguliert wird.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen die Aktivität von mindestens einem endogenen ADF durch Übertragung von Nucleinsäuremolekülen, die für nicht-funktionelle Homologe bzw. Teile davon des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren, erniedrigt wird.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen Antikörper, die für ADFs spezifisch sind und möglicherweise deren Funktion hemmen, in der Zelle exprimiert werden.

15

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen der posttranslationale Modifikationsstatus von mindestens einem überexprimierten und/oder endogenen ADF verändert wird.

20

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, bei denen die Expression von mindestens einem ADF durch Verfahren wie z.B. antisense-Verfahren, post-transcriptional gene silencing (PTGS), virus-induced gene silencing (VIGS), RNA interference (RNAi), Ribonuklease P-Konstrukte, Hammerhead-Ribozym-Konstrukte oder homologe Rekombination gesilencet wird.

25

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls transgene Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz, die über einen im Vergleich zum Wildtyp

30

- 10 -

veränderten Gehalt und/oder eine veränderte Aktivität von mindestens einem ADF verfügen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls transgene Pflanzen bzw.
5 Pflanzenzellen, die nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden und über im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Pathogenresistenzen verfügen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Nucleinsäuren, die für funktionelle oder nicht-funktionelle ADFs bzw. Teile davon
10 aus verschiedenen Organismen kodieren, zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz.

Die Verwendung der in der Erfindung beschriebenen Nucleinsäuresequenzen für die beschriebenen Verfahren bzw. zur Herstellung der genannten transgenen Pflanzen
15 und Pflanzenzellen ist ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

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

Unter dem Begriff "erhöhte Pathogenresistenz" wird erfindungsgemäß verstanden,
25 dass die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch pflanzliche Pathogene weniger stark und/oder weniger häufig befallen werden. Der Begriff "erhöhte Pathogenresistenz" beinhaltet dabei auch eine so genannte transiente Pathogenresistenz, d.h. dass die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen nur für einen bestimmten Zeitraum eine gegenüber dem
30 entsprechenden Wildtyp erhöhte Pathogenresistenz aufweisen.

Die reduzierte Häufigkeit bzw. das reduzierte Ausmaß des Pathogenbefalls bei den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen wird dabei im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp bestimmt. Erfindungsgemäß bevorzugt ist

5 eine Erhöhung der Resistenz in dem Sinne, dass ein Befall der Pflanze mit dem Pathogen um mindestens 5%, bevorzugt mindestens 20%, ebenfalls bevorzugt um mindestens 50%, 60% oder 70%, besonders bevorzugt um mindestens 80%, 90% oder 100%, ebenfalls besonders bevorzugt um den Faktor 5, insbesondere bevorzugt um mindestens den Faktor 10, ebenfalls insbesondere bevorzugt um mindestens den

10 Faktor 50, noch bevorzugter um mindestens den Faktor 100 und am meisten bevorzugt um mindestens den Faktor 1000 seltener bzw. weniger stark im Vergleich zum Wildtyp ist.

Unter dem Begriff "pflanzliche Pathogene" werden erfindungsgemäß solche

15 Pflanzenpathogene verstanden, die zur Etablierung einer effizienten Infektion mit dem pflanzlichen Actin-Cytoskelett interagieren müssen. Bevorzugt umfasst der Begriff "pflanzliche Pathogene" pilzliche Erreger.

Pilzpathogene oder pilz-ähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen

20 vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

25

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

Erkrankung	Pathogen
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>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium</i> spp.
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago</i> spp.
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthracnose leaf blight Anthracnose stalk rot	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
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>)
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
Black kernel rot	<i>Lasioidiplodia theobromae</i> =

- 13 -

	<i>Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
Curvularia leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> , = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallescens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus pallescens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
Diplodia ear rot and stalk rot	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodia leaf macrospora</i>
Brown stripe downy mildew	<i>Sclerophthora rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
Crazy top downy mildew	<i>Sclerophthora macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>

- 14 -

Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
Java downy mildew	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
Philippine downy mildew	<i>Peronosclerospora philippinensis</i> = <i>Sclerospora philippinensis</i>
Sorghum downy mildew	<i>Peronosclerospora sorghi</i> = <i>Sclerospora sorghi</i>

Spontaneum downy mildew	Peronosclerospora spontanea = Sclerospora spontanea
Sugarcane downy mildew	Peronosclerospora sacchari = Sclerospora sacchari
Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	Nigrospora oryzae (teleomorph: Khuskia oryzae)
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
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
Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	Fusarium moniliforme (teleomorph: Gibberella fujikuroi)

Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
Gray ear rot	<i>Botryosphaeria zeae</i> = <i>Physalospora zeae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zeae</i>)
Gray leaf spot (<i>Cercospora</i> leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zeae-maydis</i>
Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
Hormodendrum ear rot (<i>Cladosporium</i> rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>
Leaf spots, minor	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta maydis</i> , <i>A. tritici</i> , <i>A. zeicola</i> , <i>Bipolaris victoriae</i> = <i>Helminthosporium victoriae</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus victoriae</i>), <i>C. sativus</i> (anamorph: <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H. sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i>), <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Exserohilum prolatum</i> = <i>Drechslera prolata</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria prolata</i>) <i>Graphium penicillioides</i> , <i>Leptosphaeria maydis</i> , <i>Leptothyrium zeae</i> , <i>Ophiosphaerella herpotricha</i> , (anamorph:

	Scolecosporella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zeae, S. zeicola, S. zeina
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
Phaeocystroma stalk rot and root rot	Phaeocystroma ambiguum, = Phaeocystosporella zeae
Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
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
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)	<i>Epicoccum nigrum</i>
Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	<i>Rhizoctonia zeae</i> (teleomorph: <i>Waitea circinata</i>)
Rhizoctonia root rot and stalk rot	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia zeae</i>
Root rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cercospora sorghi</i> , <i>Dictochaeta 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. pallidroseum</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. drechleri</i> , <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> , <i>Rhizopus arrhizus</i>
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. zeae</i> = <i>Angiopsora zeae</i>
Sclerotium ear rot (southern blight)	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (teleomorph: <i>Athelia rolfsii</i>)
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.</i>

	moniliforme, <i>Gibberella zeae</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. zeae</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Selenophoma leaf spot	<i>Selenophoma</i> sp.
Sheath rot	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Shuck rot	<i>Myrothecium gramineum</i>
Silage mold	<i>Monascus purpureus</i> , <i>M. ruber</i>
Smut, common	<i>Ustilago zeae</i> = <i>U. maydis</i>
Smut, false	<i>Ustilaginoidea virens</i>
Smut, head	<i>Sphacelotheca reiliana</i> = <i>Sporisorium holcisorghi</i>
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>
Stalk rots, minor	<i>Cercospora sorghi</i> , <i>Fusarium episphaeria</i> , <i>F. merismoides</i> , <i>F. oxysporum</i> Schlechtend, <i>F. poae</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. solani</i> (teleomorph: <i>Nectria haematococca</i>), <i>F. tricinctum</i> , <i>Mariannaea elegans</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Rhopoglyphus zeae</i> , <i>Spicaria</i> sp.
Storage rots	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp. and other fungi
Tar spot	<i>Phyllachora maydis</i>
Trichoderma ear rot and root rot	<i>Trichoderma viride</i> = <i>T. lignorum</i> teleomorph: <i>Hypocrea</i> sp.
White ear rot, root and stalk rot	<i>Stenocarpella maydis</i> = <i>Diplodia zeae</i>
Yellow leaf blight	<i>Ascochyta ischaemi</i> , <i>Phyllosticta maydis</i>

	(teleomorph: <i>Mycosphaerella zeae-maydis</i>)
Zonate leaf spot	<i>Gloeocercospora sorghi</i>

Besonders bevorzugt sind

- 5 - Plasmodiophoromycota wie *Plasmodiophora brassicae* (Kohlhernie, clubroot of crucifers), *Spongospora subterranea* (powdery scab of potato tubers), *Polymyxa graminis* (root disease of cereals and grasses),
- 10 - 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*), *Pseudoperonospora 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).
- 15
- 20 - 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* (Erbsenmehltau), *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
- 25

- 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).
- 5
- 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* (Wurzeltöter 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),
 - 10 *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).
 - 15
 - 20 - Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit 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
 - 25 an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate,
 - 30

Hopfen etc.).

- Ebenfalls bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*;
- 5 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 *Septoria tritici*
- 10 (Spelzenbräune an Weizen), *Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), *Phoma lingam* (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkei an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

- Beispielhaft, jedoch nicht einschränkend, für bakterielle Pathogene seien die in
- 15 Tabelle 2 aufgeführten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 2: Bakterielle Erkrankungen

Erkrankung	Pathogen
Bacterial leaf blight and stalk rot	<i>Pseudomonas avenae</i> subsp. <i>avenae</i>
Bacterial leaf spot	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>
Bacterial stalk rot	<i>Enterobacter dissolvens</i> = <i>Erwinia dissolvens</i>
Schwarzbeinigkei („Bacterial stalk and top rot“)	<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> , <i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>zeae</i>
Bacterial stripe	<i>Pseudomonas andropogonis</i>
Chocolate spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>

Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> = <i>Corynebacterium michiganense</i> pv. <i>andnebraskense</i>
Holcus spot	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>
Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
Seed rot-seedling blight	<i>Bacillus subtilis</i>
Stewart's disease (bacterial wilt)	<i>Pantoea stewartii</i> = <i>Erwinia stewartii</i>
Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	<i>Spiroplasma kunkelii</i>

Besonders bevorzugt sind die erfindungsgemäß hergestellten transgenen Pflanzen resistent gegen nachfolgende pathogene Bakterien:

- 5 *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),
- 10 *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

Der Begriff "virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein

- 15 wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaic Virus, Ringspot-Virus,

Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

Beispielhaft, jedoch nicht einschränkend, für virale Pathogene seien die in Tabelle 3 aufgeführten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten

5 Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 3: Virale Erkrankungen

Krankheit	Pathogen
American wheat striate (wheat striate mosaic)	American wheat striate mosaic virus (AWSMV)
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)
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)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
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
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)
Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
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)
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)
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)
Maize streak	Maize streak virus (MSV)
Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
Maize stunting	Maize stunting virus
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
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
Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
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)

Auch gegen tierische Schädlinge wie Insekten und Nematoden können die erfindungsgemäßen Pflanzen und Pflanzenzellen resistent sein. Beispielhaft, jedoch nicht einschränkend, seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder
5 Milben zu nennen.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Pflanzen resistent gegen gegen Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera,
10 Trichoptera, etc. Besonders bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera and Lepidoptera, wie beispielsweise der Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica barberi* ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecimpunctata*

(“southern corn rootworm”), *Diabrotica virgifera* (“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”),
 5 *Horistonotus uhlerii* (“sand wireworm”), *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”), *Colaspis brunnea* (“grape colaspis”), *Stenolophus lecontei*
 10 (“seedcorn beetle”) und *Clivinia impressifrons* (“lender seedcorn beetle”).

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*).

15

Beispielhaft, jedoch nicht einschränkend, für Nematodenschädlinge seien die in
 Tabelle 4 aufgeführten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten
 Erkrankungen zu nennen.

20

Tabelle 4: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus spp.</i> , <i>D. heterocephalus</i>
Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>
Haferzystenälchen ("Cyst")	<i>Heterodera avenae</i> , <i>H. zea</i> , <i>Punctodera</i>

	chalcoensis
Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
False root-knot	Nacobbus dorsalis
Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zae
Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
Ring	Criconemella spp., C. ornata
Wurzelgallenälchen („Root-knot“)	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
Spiral	Helicotylenchus spp.
Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
Stunt	Tylenchorhynchus dubius

- Ganz besonders bevorzugt sind die erfindungsgemäß hergestellten transgenen Pflanzen resistent gegen *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii*
- 5 (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,

Zuckerrübe, Luzerne).

Bei einzelnen landwirtschaftlich besonders bedeutenden Sorten sind die erfindungsgemäßen Pflanzen bevorzugt gegen die folgenden Pathogene resistent:

5

Bei Gerste gegen die Pilz-, bakteriellen und viralen Pathogene *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV), und die pathogenen 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).

15 Bei der Sojabohne gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen Pathogene *Phytophthora megasperma* f.sp. *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* (20 *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, *Phakopsora pachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium* (25 *ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines*, *Fusarium solani* und die pathogenen Insekten / Nematoden *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatilis* (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*
 5 (seedcorn maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestanii* (strawberry spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

Bei Canola gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen Pathogene *Albugo candida*,
 10 *Alternaria brassicae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

Bei Alfalfa gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen Pathogene *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregulare*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrochila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*,
 15
 20 *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

Bei Weizen gegen die Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*,
 25 *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*,
 30 *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 Striate
 5 Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia*
indica, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomannes*, *Pythium gramicola*, *Pythium*
aphanidermatum, High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis*
f.sp. tritici (Wheat stem rust), *Blumeria (Erysiphe) graminis f.sp. tritici* (Wheat
 Powdery Mildew) und die pathogenen Insekten / Nematoden *Pseudaletia unipunctata*
 (army worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus lignosellus*
 10 (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western cutworm); *Elasmopalpus*
Zignosellus (lesser cornstalk borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera*
punctata (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn
 rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum* (greenbug); *Macrosiphum*
avenae (English grain aphid); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper);
 15 *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Melanoplus 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).

20

Bei der Sonnenblume gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen Pathogene
Plasmophora halstedii, *Sclerotinia sclerotiorum*, Aster Yellows, *Septoria helianthi*,
Phomopsis helianthi, *Alternaria helianthi*, *Alternaria zinniae*, *Botrytis cinerea*,
Phoma macdonaldii, *Macrophomina phaseolina*, *Erysiphe cichoracearum*, *Rhizopus*
 25 *oryzae*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Puccinia helianthi*, *Verticillium*
dahliae, *Erwinia carotovorum p.v. Carotovora*, *Cephalosporium acremonium*,
Phytophthora cryptogea, *Albugo tragopogonis* und die pathogenen Insekten /
 Nematoden *Suleima helianthana* (sunflower bud moth); *Homoeosoma electellum*
 (sunflower moth); *zygogramma exclamationis* (sunflower beetle); *Bothyrus gibbosus*

(carrot beetle); *Neolasioptera murtfeldtiana* (sunflower seed midge).

- Bei Mais gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen Pathogene *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Erwinia stewartii*, *Fusarium moniliforme*, *Gibberella zeae*
- 5 (*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*
- 10 *pedicellatum*, *Physoderma maydis*, *Phyllosticta maydis*, *Kabatiella maydis*, *Cercospora sorghi*, *Ustilago maydis*, *Puccinia sorghi*, *Puccinia polysora*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium oxalicum*, *Nigrospora oryzae*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia inaequalis*, *Curvularia pallescens*, *Clavibacter michiganese* subsp. *nebraskense*, *Trichoderma viride*, Maize Dwarf
- 15 Mosaic Virus A & B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus, *Claviceps sorghi*, *Pseudonomas avenae*, *Erwinia chrysanthemi* p.v. *Zea*, *Erwinia corotovora*, *Cornstunt spiropasma*, *Diplodia macrospora*, *Sclerophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinesis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zeae*,
- 20 *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 und die pathogenen Insekten / Nematoden *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm);
- 25 *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*
- 30 (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).

Bei Sorghum gegen die Pilz-, bakteriellen oder viralen 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*, Sugarcane 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* und die pathogenen Insekten / Nematoden *Chilo partellus* (sorghum borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *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*

- 34 -

cinnabarinus (carmine spider mite); Tetranychus urticae (two spotted spider mite).

Bei Baumwolle gegen die pathogenen Insekten / Nematoden: *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Spodoptera exigua*
 5 (beet armyworm); *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm); *Anthonomus grandis grandis* (boll weevil); *Aphis gossypii* (cotton aphid); *Pseudatomoscelis seriatus* (cotton fleahopper); *Trialeurodes abutilonea* (bandedwinged whitefly); *Lygus lineolaris* (tarnished plant bug); *Melanoplus femurrubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Thrips tabaci* (onion thrips);
 10 *Frankliniella fusca* (tobacco thrips); *Tetranychus cinnabarinus* (carmine spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

Bei Reis gegen die pathogenen Insekten / Nematoden *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Helicoverpa zea* (corn
 15 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);

Bei Raps gegen die pathogenen Insekten / Nematoden *Brevicoryne brassicae*
 20 (cabbage aphid); *Phyllotreta cruciferae* (Flea beetle); *Mamestra conjugurata* (Bertha armyworm); *Plutella xylostella* (Diamond-back moth); *Delia* ssp. (Root maggots).

Insbesondere bevorzugt umfasst der Begriff "pflanzliches Pathogen" Pathogene der Gruppe *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *tritici*, *avenae*, *secalis*, *lycopersici*, *vitis*,
 25 *cucumis*, *cucurbitae*, *pisi*, *pruni*, *solani*, *rosae*, *fragariae*, *rhododendri*, *mali* und *nicotianae*.

Unter "Actin-depolymerisierender Faktor 3 (ADF3) aus Gerste" wird ein Protein mit der SEQ ID No. 1 erfindungsgemäß verstanden.

- 35 -

Unter "Actin-depolymerisierenden Faktoren (ADFs)" werden erfindungsgemäß solche Proteine verstanden, deren Sequenz eine signifikante Homologie zu dem oben genannten ADF3 aus Gerste aufweist.

5 Wenn im Folgenden von ADF3 gesprochen wird, ist damit der ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 gemeint, wohingegen bei Verwendung des Begriffs "ADFs" der ADF3 aus Gerste und/oder solche Proteine gemeint sind, die eine signifikante oder wesentliche Homologie zu dem ADF3 aus Gerste aufweisen.

10 Unter dem "Gehalt" an ADF3 aus Gerste bzw. ADFs im Allgemeinen wird erfindungsgemäß die Menge an ADF3 bzw. einem bestimmten ADF verstanden, wie er für den Wildtyp einer Pflanze bzw. Pflanzenzelle bestimmt werden kann.

Unter der "Aktivität" von ADF3 bzw. ADFs im Allgemeinen wird deren Fähigkeit
15 verstanden, mit globulärem Actin (G-Actin) oder filamentösem Actin (F-Actin) bzw. anderen physiologischen Bindungspartnern zu interagieren.

Unter einem "gegenüber dem Wildtyp veränderten Gehalt" an ADFs wird erfindungsgemäß daher eine gegenüber im Vergleich zum Wildtyp erhöhte oder
20 erniedrigte Menge an ADFs verstanden. Die Erhöhung des Gehalts an ADFs kann dabei durch eine Erhöhung der Menge an endogenen ADFs oder durch Zuführen einer zusätzlichen Menge an exogenen ADFs erzielt werden. Die Erniedrigung der Menge an ADFs in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen wird im Allgemeinen durch eine Erniedrigung des Gehalts an endogenen ADFs
25 erzielt.

Unter einem "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden.

Die Erhöhung der Aktivität an ADFs kann durch eine Erhöhung der Aktivität der endogenen ADFs und/oder durch Zufuhr einer zusätzlichen Menge an funktionellen ADFs erreicht werden. Eine Erniedrigung der Aktivität an ADFs kann durch eine Erniedrigung der Aktivität der endogenen ADFs erzielt werden. Gleichermaßen wird
5 erfindungsgemäß unter einer Erniedrigung der Aktivität an ADFs verstanden, dass die Aktivität an endogenem ADF3 bzw. endogenen ADFs unverändert bleibt, die Interaktion der ADFs mit ihren physiologischen Bindungspartnern durch z.B. die Expression nicht-funktioneller Formen der ADFs oder Antikörpern aber signifikant inhibiert wird.

10

Vorzugsweise beträgt die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren bewirkte Erhöhung des Gehalts und/oder der Aktivität an ADFs in einer transgenen Pflanze bzw. Pflanzenzelle mindestens 5%, bevorzugt mindestens 20%, ebenfalls bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 100%, ebenfalls besonders
15 bevorzugt mindestens den Faktor 5, insbesondere bevorzugt mindestens den Faktor 10, ebenfalls insbesondere bevorzugt mindestens den Faktor 50, noch bevorzugter mindestens den Faktor 100 und am meisten bevorzugt mindestens den Faktor 1000. Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen weisen vergleichbare Erhöhungen des Gehalts und/oder der Aktivität an ADFs in einer transgenen Pflanze bzw.
20 Pflanzenzelle auf.

Vorzugsweise beträgt die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren bewirkte Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität an ADFs in einer transgenen Pflanzenzelle bzw. Pflanze mindestens 5%, bevorzugt mindesten 10%, besonders
25 bevorzugt mindestens 20%, ebenfalls besonders bevorzugt mindestens 40%, ebenfalls besonders bevorzugt mindestens 60%, insbesondere bevorzugt mindestens 80%, ebenfalls insbesondere bevorzugt mindestens 90% und am meisten bevorzugt mindestens 98%.

Wie bereits oben erwähnt wurde, betrifft ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für den ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodiert. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die für funktionell äquivalente Teile des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren.

Wenn im Rahmen der Erfindung von "funktionell äquivalenten Teilen von ADF3" gesprochen wird, dann sind damit Fragmente der Nukleinsäuresequenzen, wie sie für den ADF3 mit der SEQ ID No. 1 kodieren, gemeint, deren Expression noch zu Proteinen mit den Bindungseigenschaften und strukturellen Eigenschaften des ADF3 führen. Gleichmaßen ist der Begriff "funktionell äquivalente Teile" zu verstehen, wenn er sich auf Proteinfragmente im Allgemeinen bezieht. Besonders bevorzugt handelt es sich dabei um Nukleinsäuresequenzen, die zu ADF3-Fragmenten führen, die Deletionen von mehreren Aminosäuren am N- und/oder C-Terminus aufweisen, ohne dass es zu einer Veränderung der strukturellen Eigenschaften bzw. der Bindungseigenschaften des ADF3 kommt. Mit Bindungseigenschaften von ADF3 ist insbesondere das Bindungsverhalten des ADF3 an G-Actin und/oder F-Actin gemeint.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die für Mutanten des ADF3 kodieren. Unter "Mutanten von ADF3" werden sowohl funktionelle als auch nicht-funktionelle Mutanten des ADF3 verstanden. Bei funktionellen Mutanten handelt es sich um Formen von ADF3, die Punktmutation(en), Insertion(en) und/oder Deletion(en) aufweisen, ohne dass es dadurch zu einem wesentlichen Verlust der strukturellen Eigenschaften bzw. der Bindungseigenschaften des ADF3 kommt.

Die Bindungseigenschaften von ADF3 aus *Zea mays* sind ebenso wie dessen strukturelle Eigenschaften beschrieben worden (Jiang et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 9973 – 9978). Da es sich bei dem ADF3 aus Mais um einen ADF

handelt, der im Sinne der vorliegenden Erfindung im Wesentlichen homolog zu ADF3 aus Gerste ist, können die in der genannten Publikation beschriebenen Erkenntnisse bezüglich des Bindungsverhaltens von ADFs an G-Actin und F-Actin auch bei der Herstellung von funktionellen und nicht-funktionellen Mutanten des erfindungsgemäßen ADF3 aus Gerste verwendet werden (siehe unten).

Funktionelle Punktmutanten wird man in der Regel dann erhalten, wenn ein so genannter konservativer Aminosäureaustausch vorgenommen wird, d.h. Aminosäuren mit vergleichbaren physiko-chemischen Eigenschaften werden gegeneinander ausgetauscht. Dabei werden hydrophobe für hydrophobe Aminosäuren, hydrophile für hydrophile Aminosäuren, positiv geladene für positiv geladene Aminosäuren, etc. ausgetauscht. Ein Beispiel für einen konservativen Aminosäureaustausch ist ein Austausch von einem Valin für ein Alanin. Dabei wird der Fachmann beachten, ob sich der konservative Aminosäureaustausch in einer Region von ADF3 befindet, die für dessen Bindungsverhalten an F-Actin oder G-Actin essentiell ist. Anhaltspunkte darüber, ob eine bestimmte Region für das Bindungsverhalten von ADF3 essentiell ist, kann sich durch ein so genanntes Sequenz-Alignment mit bereits bekannten ADFs ergeben, für die die Bindungseigenschaften und strukturellen Eigenschaften bereits ermittelt wurden (siehe Jiang et al., vide supra). Im Gegensatz zu einer konservativen Mutation wird der Fachmann eher nicht davon ausgehen, dass bei einem Austausch von z.B. einem Lysin gegen ein Glutamat, d.h. einem positiv geladenen Rest gegen einen negativ geladenen Rest, es nicht zu einer funktionellen bzw. strukturellen Änderung des ADF kommt. Die gleichen Überlegungen, die bei der Herstellung von funktionellen Punktmutanten von ADF3 angestellt werden, gelten auch bei der Herstellung von funktionellen Insertions- und/oder Deletionsmutanten von ADF3 mit der Maßgabe, dass der Fachmann in diesem Fall besonders darauf achten wird, ob die hinzugefügten bzw. entfernten Aminosäuresequenzbereiche sich in einem Bereich befinden, der für die Bindung an Actin essentiell ist oder nicht.

Ein Beispiel für eine funktionelle Mutante ist ein S⁶A-Aminosäureaustausch, der verhindert, dass das Protein am N-Terminus phosphoryliert wird. Durch den Austausch von Serin gegen Alanin in der Aminosäureposition 6 ist eine solche Mutante von ADF3 (SEQ ID No. 2) permanent aktiv und nicht mehr
5 posttranslational regulierbar.

Die mutierte Aminosäure befindet sich an Position 6 der Aminosäuresequenz, wobei das Wildtyp Serin (S) gegen ein Alanin (A) getauscht wurde (Smertenko, A.P. et al. (1998) Plant J 14, 187-193).

10

Wie bereits oben erwähnt, sind ein Gegenstand der Erfindung ebenfalls Nukleinsäuremoleküle, die für nicht-funktionelle Mutanten des ADF3 aus Gerste kodieren. Bei solchen nicht-funktionellen Mutanten des ADF3 handelt es sich um Formen von ADF3, die nicht mehr oder zumindest nur noch sehr beschränkt in der Lage sind, mit
15 G-Actin und/oder F-Actin bzw. anderen physiologischen Bindungspartnern von ADF3 zu interagieren. Solche nicht-funktionellen Mutanten von ADF3 können wiederum Punktmutation(en), Insertion(en) und/oder Deletion(en) umfassen. Solche nicht-funktionellen Mutanten von ADF3 sind z.B. bei der Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen nützlich, bei denen der Gehalt an
20 endogenem ADF3 in der Gerste nicht verändert wird, die Aktivität an endogenem ADF3 durch Überexpression der genannten nicht-funktionellen Mutanten aber blockiert wird.

Nicht-funktionelle Mutanten von ADF3 verfügen erfindungsgemäß über im
25 Wesentlichen gleiche Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen wie funktionelle Mutanten von ADF3. Sie weisen jedoch an einigen Stellen Punktmutation(en), Insertion(en) oder Deletion(en) von Nukleotiden oder Aminosäuren auf, die im Gegensatz zu funktionellen Mutanten von ADF3 bewirken, dass die nicht-funktionellen Mutanten von ADF3 nicht oder nur sehr begrenzt in der Lage sind, mit
30 F-Actin, G-Actin und/oder anderen physiologischen Bindungspartnern zu

interagieren. Solche erfindungsgemäßen funktionellen bzw. nicht-funktionellen Mutanten von ADF3 können vom Fachmann in einfacher Weise identifiziert werden. Dem Fachmann stehen eine Reihe von Techniken zur Verfügung, mit denen es möglich ist, Punktmutation(en), Insertion(en) oder Deletion(en) in die

5 Nukleinsäuresequenzen, die für funktionelle bzw. nicht-funktionelle Mutanten von ADF3 kodieren, einzufügen (Sambrook (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press). Nach Einführung der Punktmutation/Insertion und/oder Deletion, die auch allgemein als Mutation

10 bezeichnet werden, kann der Fachmann durch entsprechende Bindungstests, wie sie in den Beispielen dargestellt oder aus dem Stand der Technik bekannt sind, feststellen, ob die mutagenisierten ADF3 noch über ihre normalen Bindungseigenschaften bezüglich G-Actin, F-Actin und/oder anderen physiologischen Bindungspartnern verfügen.

15 Nicht-funktionelle Mutanten von ADF3 verfügen über eine im Vergleich zum nicht-mutagenisierten ADF3 bzw. zur funktionellen Mutante von ADF3 erniedrigte Bindungsspezifität, bevorzugt gegenüber G-Actin und/oder F-Actin. Erfindungsgemäß verfügt eine nicht-funktionelle Mutante von ADF3 über 1 bis 90%, bevorzugt über 1 bis 70%, besonders bevorzugt über 1 bis 50%, ebenfalls besonders

20 bevorzugt über 1 bis 30%, insbesondere bevorzugt über 1 bis 15% und am meisten bevorzugt über 1 bis 10% der Bindungseffizienz von ADF3 bzw. der entsprechenden funktionellen Mutanten von ADF3 gegenüber dem jeweiligen pathogenen und/oder physiologischen Bindungspartner, hierbei bevorzugt gegenüber G-Actin und/oder F-Actin.

25 Beispiele für Aminosäurepositionen, die für die Interaktion mit G-Actin und/oder F-Actin wichtig sind, sind die Aminosäurepositionen in ADF3 aus Gerste, die den Positionen Tyrosin-67 und Tyrosin-70 im ADF3 aus Mais entsprechen. Dabei handelt es sich um die Positionen Phenylalanin-66 und Phenylalanin-69 in HvADF3.

- Erfindungsgemäß umfasst der Begriff "nicht-funktioneller ADF3" nicht solche Proteine, die keine wesentliche Sequenzhomologie auf Aminosäure- bzw. Nukleinsäureebene zu funktionellem ADF3 aufweisen. Proteine, die nicht in der Lage sind, an G-Actin und/oder F-Actin zu binden und keine wesentliche
- 5 Sequenzhomologie zu ADF3 aufweisen, sind daher definitionsgemäß mit dem erfindungsgemäßen Begriff "nicht-funktionelle Mutante von ADF3" nicht gemeint. Nicht-funktionelle Mutanten von ADF3 werden im Rahmen der Erfindung auch als inaktivierte oder inaktive ADF3 bezeichnet.
- 10 Somit zeichnen sich die erfindungsgemäßen funktionellen und/oder nicht-funktionellen Mutanten von ADF3, die die oben genannte Punktmutation(en), Insertion(en) und/oder Deletion(en) tragen, oder die funktionell äquivalenten Teile durch eine wesentliche Sequenzhomologie zu ADF3 aus.
- 15 Unter "wesentlicher Sequenzhomologie" wird erfindungsgemäß allgemein verstanden, dass die Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz eines DNA-Moleküls bzw. eines Proteins zu mindestens 40%, bevorzugt zu mindestens 50%, weiter bevorzugt zu mindestens 60%, ebenfalls bevorzugt zu mindestens 70%, 80% oder
- 20 mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu mindestens 98% zu den Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen von ADF3 oder dessen funktionell äquivalenten Teilen identisch ist. Vorzugsweise wird die Homologie über die gesamte Sequenzlänge von ADF3 bestimmt.
- 25 Unter "Identität zwischen zwei Proteinen" wird die Identität der Aminosäuren über einen bestimmten Proteinbereich verstanden, vorzugsweise die gesamte Proteinlänge, insbesondere die Identität, die durch Vergleich mit Hilfe der Lasergene-Software der Firma DNA Star Inc., Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der CLUSTAL-Methode (Higgins et al., 1989), Comput. Appl. Biosci., 5 (2), 151) berechnet wird.

Bevorzugt wird die Homologie also über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Neben den oben genannten Programmen stehen dem Fachmann für den Vergleich verschiedener Sequenzen noch weitere Programme zur Verfügung, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen. Dabei liefern die

5 Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche kann z.B. auch das Programm Pile Aupa verwendet werden (J. Mol. Evolution. (1987), 25, 351 – 360; Higgins et al., (1989), Cabgos, 5, 151 – 153) oder die Programme Gap und Best Fit (Needleman und Wunsch, (1970), J. Mol. Biol., 48, 443 – 453 sowie Smith und Waterman

10 (1981), Adv., Appl. Math., 2, 482 – 489), die im GCG-Software-Paket der Genetics Computer Group (575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) enthalten sind.

Für die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Sequenz-Alignments

15 wurde das Clustal-W-Programm verwendet, wie es über <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> aufgerufen werden kann. Die Parameter der genannten Startseite blieben für die Alignments unverändert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nukleinsäuremoleküle, die

20 mit den Nukleinsäuremolekülen, die für ADF3, funktionell äquivalente Teile davon bzw. funktionelle oder nicht-funktionelle Mutanten von ADF3 kodieren, unter stringenten Bedingungen hybridisieren bzw. zu diesen im Wesentlichen komplementär sind. Mit dem Begriff "Komplementarität" wird die Fähigkeit eines Nukleinsäuremoleküls beschrieben, mit einem anderen Nukleinsäuremolekül

25 aufgrund von Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basen zu hybridisieren. Der Fachmann weiß, dass zwei Nukleinsäuremoleküle nicht über eine 100%ige Komplementarität verfügen müssen, um miteinander hybridisieren zu können. Bevorzugt ist eine Nukleinsäuresequenz, die mit einer anderen Nukleinsäuresequenz hybridisieren soll, zu dieser zu mindestens 40%, zu mindestens 50%, zu mindestens

30 60%, bevorzugt zu mindestens 70%, besonders bevorzugt zu mindestens 80%,

ebenfalls besonders bevorzugt zu mindestens 90%, insbesondere bevorzugt zu mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu mindestens 98% bzw. 100% komplementär.

- 5 Bevorzugt sind Homologie-, Komplementaritäts- und Identitätsgrade über die gesamte Protein- bzw. Nukleinsäurelänge zu bestimmen.

Nukleinsäuremoleküle sind identisch, wenn sie gleiche Nukleotide in gleicher 5'-3'-Reihenfolge aufweisen.

10

Stringente *in vitro* Hybridisierungsbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können der Literatur entnommen werden (siehe z.B. Sambrook et al., *vide supra*). Der Begriff "spezifische Hybridisierung" bezieht sich auf den Umstand, dass ein Molekül unter stringenten Bedingungen präferentiell an eine bestimmte Nukleinsäuresequenz bindet, wenn diese Nukleinsäuresequenz Teil einer komplexen

15 Mischung von z.B. DNA- oder RNA-Molekülen ist.

20

Der Begriff "stringente Bedingungen" bezieht sich damit auf Bedingungen, unter denen eine Nukleinsäuresequenz präferentiell an eine Zielsequenz bindet, aber nicht oder zumindest wesentlich reduziert an andere Sequenzen.

25

Stringente Bedingungen sind von den Umständen abhängig. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Generell werden stringente Bedingungen so gewählt, dass die Hybridisierungstemperatur circa 5°C unter dem Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten ionischen Stärke und einem definierten pH-Wert liegt. T_m ist die Temperatur (bei einem definierten pH-Wert, einer definierten ionischen Stärke und einer definierten Nukleinsäurekonzentration), bei der 50% der Moleküle, die zu einer Zielsequenz komplementär sind, mit dieser Zielsequenz hybridisieren. Typischerweise umfassen

30

stringente Bedingungen Salzkonzentrationen zwischen 0,01 und 1,0 M Natriumionen

- 44 -

(oder eines anderen Salzes) und einen pH zwischen 7,0 und 8,3. Die Temperatur ist mindestens 30°C für kurze Moleküle (z.B. für solche, die zwischen 10 bis 50 Nukleotiden umfassen). Zusätzlich können stringente Bedingungen die Zugabe von destabilisierenden Agenzien wie z.B. Formamid umfassen. Typische

5 Hybridisierungs- und Waschpuffer haben folgende Zusammensetzung.

Prähybridisierungslösung:

10 0,5 % SDS
 5x SSC
 50 mM NaPO₄, pH 6,8
 0,1% Na-Pyrophosphat
 5x Denhardt's Reagenz
 100 µg/ml Lachssperm

15

Hybridisierungslösung: Prähybridisierungslsg.
 1x10⁶ cpm/ml Sonde (5-10 min 95°C)

20 *20x SSC:* 3 M NaCl
 0,3 M Natriumcitrat
 ad pH 7 mit HCl

25 *50x Denhardt's Reagenz:* 5 g Ficoll
 5 g Polyvinylpyrrolidon
 5 g Bovine Serum Albumine
 ad 500 ml A. dest.

Eine typische Verfahrensweise für die Hybridisierung sieht folgendermaßen aus:

30 *Optional:* Blot 30 min in 1x SSC/ 0,1% SDS bei 65°C waschen

- 45 -

Prähybridisierung: mindestens 2 h bei 50-55°C

Hybridisierung: über Nacht bei 55-60°C

5			
	<i>Waschen:</i>	5 min	2x SSC/ 0,1% SDS Hybridisierungstemp.
		30 min	2x SSC/ 0,1% SDS Hybridisierungstemp.
		30 min	1x SSC/ 0,1% SDS Hybridisierungstemp.
		45 min	0,2x SSC/ 0,1% SDS 65°C
10		5 min	0,1x SSC Raumtemperatur

Wie bereits oben erwähnt wurde, können die oben genannten Nukleinsäuresequenzen, die für ADF3 aus Gerste, funktionell äquivalente Teile davon bzw. funktionelle oder nicht-funktionelle Mutanten davon kodieren, benutzt werden, um transgene Pflanzen mit einem veränderten Gehalt und/oder einer veränderten Aktivität an ADF3 herzustellen, was zur Folge hat, dass diese Pflanzen über eine erhöhte Pathogenresistenz gegenüber dem Mehltauerreger *Blumeria graminis f. sp. hordei* verfügen.

Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf Verfahren zur Herstellung von transgenen Gerstepflanzen bzw. Gerstepflanzenzellen, die aufgrund eines veränderten Gehalts und/oder veränderten Aktivität von ADF3 aus Gerste eine erhöhte Resistenz gegenüber *Blumeria graminis f. sp. hordei* zeigen, beschränkt.

Es wird davon ausgegangen, dass (i) durch die Veränderung des Gehalts und/oder der Aktivität von Homologen von ADF3 in anderen Pflanzen ebenfalls transgene Pflanzen bzw. Pflanzenzellen hergestellt werden können, die über eine erhöhte Pathogenresistenz im Sinne der vorliegenden Erfindung verfügen und (ii), dass zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten

Pathogenresistenz auch auf Homologe von ADF3 aus Gerste zurückgegriffen werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft damit generell Verfahren zur Herstellung von
5 transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz, bei denen im Vergleich zum Wildtyp der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens einem ADF verändert ist. Bei den im Folgenden beschriebenen Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz und Änderung
des Gehalts und/oder der Aktivität von mindestens einem ADF können daher neben
10 den oben erwähnten Nukleinsäuresequenzen auch solche Nukleinsäuresequenzen zum Einsatz kommen, die für ADFs kodieren, die im Wesentlichen homolog zu dem ADF3 mit der SEQ ID No. 1 aus Gerste sind.

Unter wesentlicher Sequenzhomologie von ADFs zu dem ADF3 mit der SEQ ID No.
15 1 aus Gerste wird dabei erfindungsgemäß verstanden, dass die Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz eines solchen ADFs zu mindestens 40%, bevorzugt zu mindestens 50%, weiter bevorzugt zu mindestens 60%, ebenfalls bevorzugt zu mindestens 70%, 80% oder 85%, besonders bevorzugt zu mindestens 90%, insbesondere bevorzugt zu mindestens 95% und am meisten bevorzugt zu
20 mindestens 98% zu den Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen des ADF3 aus Gerste sind. Die Sequenzhomologie kann dabei nach den oben genannten Methoden festgestellt werden.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren können neben den genannten
25 Nukleinsäuresequenzen, die für ADFs, die im Wesentlichen homolog zu ADF3 aus Gerste sind, kodieren, auch solche Nukleinsäuren verwendet werden, die für funktionell äquivalente Teile der ADFs bzw. funktionelle oder nicht-funktionelle Mutanten der ADFs kodieren, vorausgesetzt, dass es sich um ADFs handelt, die im Wesentlichen homolog zu dem ADF3 aus Gerste sind. Die oben beschriebenen

- 47 -

Definitionen für funktionell äquivalente Teile bzw. funktionelle oder nicht-funktionelle Mutanten gelten dabei auch für die ADFs im Allgemeinen.

5 Beispiele für solche ADFs, die für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, sind die in Tabelle 5 angegebenen ADFs aus *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* und *Triticum aestivum*. Geeignete Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen für die ADFs kann der Fachmann sowohl den in der Tabelle angegebenen Datenbankeinträgen als auch dem Sequenzprotokoll entnehmen.

10

Tabelle 5

Organismus	ADF	Datenbank / Accession Code	Aminosäure-sequenz SEQ ID No.	DNA-Sequenz SEQ ID No.	
Hordeum vulgare	HvADF3	Tigr / 45377	1	45	
	HvADF3-S6A	---	2	46	
	HvADF1	Tigr / 46250	3	47	
	HvADF2	Tigr / 60360	4	48	
	HvADF5	Tigr / TC46717	5	49	
	HvADF6	GenBank/CD056371	6	50	
	HvADF8	Tigr / TC49352	7	51	
	HvADF10	Tigr / TC62764	8	52	
	Arabidopsis thaliana	AtADF1	GenBank/At3g46010	9	53
		AtADF2	GenBank/At3g46000	10	54
AtADF3		GenBank/At5g59880	11	55	

	AtADF4	GenBank/At5g59890	12	56
	AtADF5	GenBank/At2g16700	13	57
	AtADF6	GenBank/At2g31200	14	58
	AtADF7	GenBank/At5g52360	15	59
	AtADF8	GenBank/At4g00680	16	60
	AtADF9	GenBank/At4g34970	17	61
	AtADF10	GenBank/At1g01750	18	62
	AtADF11	GenBank/At4g25590	19	63
	AtADF12	GenBank/At3g45990	20	64
Oryza sativa	OsADF1	Tigr / TC201477	21	65
	OsADF2	Tigr / TC208620	22	66
	OsADF3	GenBank/AC104433	23	67
	OsADF4	Tigr / TC192283	24	68
	OsADF5	Tigr / TC202703	25	69
	OsADF6	Tigr / TC185994	26	70
	OsADF7	GenBank/AL606647	27	71
	OsADF8	GenBank/AK072662	28	72
	OsADF9	Tigr / TC106152	29	73
	OsADF10	GenBank/AK069605.1	30	74
	OsADF11	GenBank/AC104433	31	75
Triticum aestivum	TaADF1	Tigr / 88586	32	76
	TaADF2	Tigr / 70034	33	77
	TaADF3a	GenBank/BJ284976	34	78
	TaADF3b	GenBank/CA486380	35	79
	TaADF4	Tigr / 70035	36	80
	TaADF5	Tigr / 66848	37	81
	TaADF6	Tigr / 86040	38	82
Zea mays	ZmADF1	Tigr / TC150616	39	83

	ZmADF2	Tigr / TC150192	40	84
	ZmADF3	Tigr / TC148556	41	85
	ZmADF5	Tigr / TC150207	42	86
	ZmADF6	Tigr / TC159321	43	87
	ZmADF7	Tigr / TC150192	44	88

Die GenBank-Datenbank kann über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez> aufgerufen werden. Die TIGR-Datenbank kann über <http://www.tigr.org> aufgerufen werden.

5 Es sind somit eine Vielzahl von DNA-Sequenzen, die für im Wesentlichen Homologe von ADF3 aus Gerste kodieren, bereits bekannt. Darüber hinaus können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch die Sequenzen von ADFs verwendet werden, die im Moment noch nicht in den öffentlichen Datenbanken zur Verfügung stehen.

10

Dem Fachmann ist bekannt, wie er entsprechende korrespondierende DNA-Sequenzen von anderen Organismen isolieren kann. Typischerweise wird der Fachmann zunächst durch Homologie-Vergleiche in den etablierten Datenbanken wie z.B. der GenBank-Datenbank am NCBI versuchen, entsprechende homologe
15 Sequenzen zu identifizieren. Solche Datenbanken können auf der NCBI-Homepage beim NIH unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> gefunden werden.

DNA-Sequenzen mit einer hohen Homologie, d.h. einer hohen Ähnlichkeit oder Identität sind bona fide Kandidaten für DNA-Sequenzen, die den erfindungsgemäßen
20 DNA-Sequenzen, d.h. ADF3 entsprechen. Diese Gensequenzen können durch Standardmethoden, wie z.B. PCR und Hybridisierung isoliert werden, und ihre Funktion durch entsprechende Enzymaktivitätstests und andere Experimente durch den Fachmann bestimmt werden. Homologievergleiche mit DNA-Sequenzen können erfindungsgemäß auch verwendet werden, um PCR-Primer zu designen, indem
25 zunächst die Regionen identifiziert werden, die zwischen den DNA-Sequenzen von

verschiedenen Organismen am meisten konserviert sind. Solche PCR-Primer können dann benutzt werden, um in einem ersten Schritt DNA-Fragmente zu isolieren, die Bestandteile von DNA-Sequenzen sind, die zu den DNA-Sequenzen der Erfindung homolog sind.

5

Es gibt eine Reihe von Suchmaschinen, die für solche Homologievergleiche bzw. -suchen verwendet werden können. Diese Suchmaschinen umfassen z.B. die CLUSTAL-Programmgruppe des BLAST-Programms, das durch das NCBI zur Verfügung gestellt wird.

10

Darüber hinaus sind dem Fachmann eine Reihe von experimentellen Methoden bekannt, mit denen DNA-Sequenzen aus verschiedensten Organismen isoliert werden können, die zu den erfindungsgemäßen ADFs homolog sind. Dazu gehört z.B. das Anfertigen und Screenen von cDNA-Bibliotheken mit entsprechend degenerierten Sonden (siehe auch Sambrook et al., *vide supra*).

15

Erfindungsgemäß weisen der ADF3 aus Gerste und die ADFs im Allgemeinen eine so genannte Konsensusregion auf. In Abb. 1 findet sich ein so genanntes Sequenz-Alignment von verschiedenen ADF-Sequenzen aus *A. thaliana* mit ADF3 aus Gerste.

20

Aus diesem Sequenz-Alignment können verschiedene Konsensussequenzen abgeleitet werden, die für die erfindungsgemäßen ADFs charakteristisch sind. Die Konsensussequenz I umfasst die folgende Sequenz:

25

X₁PX₂X₃X₄CRX₅X₆X₇X₈DX₉X₁₀X₁₁ (SEQ ID No. 89)

30

Dabei kann X₁ jede beliebige Aminosäure, bevorzugt L oder I, umfassen. X₂ kann jede Aminosäure umfassen. X₃ kann jede Aminosäure, bevorzugt N oder D umfassen. X₄ kann jede beliebige Aminosäure, bevorzugt D oder E umfassen. X₅ kann jede Aminosäure, bevorzugt Y oder F umfassen, X₆ kann jede Aminosäure,

- 51 -

bevorzugt A oder C umfassen. X₇ kann jede Aminosäure, bevorzugt V oder I umfassen. X₈ kann jede Aminosäure umfassen. X₉ kann jede Aminosäure umfassen. X₁₀ kann jede Aminosäure, bevorzugt D oder E umfassen. X₁₁ kann jede Aminosäure, bevorzugt F oder Y, umfassen. Die Aminosäuren sind dabei nach dem üblichen Einbuchstabencode angegeben.

Daneben sind die ADFs, die zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, durch das Vorhandensein einer zweiten Konsensussequenz gekennzeichnet.

10

Diese zweite Konsensussequenz II umfasst folgende Sequenz:

Y₁IY₂Y₃Y₄Y₅WY₆PY₇Y₈Y₉Y₁₀Y₁₁RY₁₂Y₁₃Y₁₄Y₁₅ (SEQ ID No. 90)

15 Dabei kann Y₁ jede Aminosäure, bevorzugt K oder R, sein. Y₂ kann jede Aminosäure sein. Y₃ kann jede Aminosäure, bevorzugt F oder Y sein. Y₄ kann jede Aminosäure, bevorzugt F, I oder V sein. Y₅ kann jede Aminosäure sein. Y₆ kann jede Aminosäure, bevorzugt S oder C sein. Y₇ kann jede Aminosäure, bevorzugt S, E oder D, sein. Y₈ kann jede Aminosäure sein. Y₉ kann jede Aminosäure, bevorzugt S oder A sein. Y₁₀ kann jede Aminosäure sein. Y₁₁ kann jede Aminosäure, bevorzugt I, V oder M sein. Y₁₂ kann jede Aminosäure sein. Y₁₃ kann jede Aminosäure, bevorzugt I, V oder M sein. Y₁₄ kann jede Aminosäure sein. Y₁₅ kann jede Aminosäure, bevorzugt S oder A sein. Auch hier sind die Aminosäuren im Einbuchstabencode angegeben.

25

Weiterhin sind die ADFs, die zur Verwendung in einem der erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind, durch folgende Konsensussequenz charakterisiert.

Die Konsensussequenz III umfasst die folgende Sequenz:

30

- 52 -

RZ₁Z₂Z₃GZ₄Z₅Z₆EZ₇Z₈ATDZ₉Z₁₀Z₁₁Z₁₂ (SEQ ID No. 91)

Z₁ kann jede Aminosäure, bevorzugt E, V oder T sein. Z₂ kann jede Aminosäure, bevorzugt L oder M sein. Z₃ kann jede Aminosäure, bevorzugt Q, E oder D sein. Z₄
5 kann jede Aminosäure, bevorzugt I oder V sein. Z₅ kann jede Aminosäure, bevorzugt H oder Q sein. Z₆ kann jede Aminosäure sein. Z₇ kann jede Aminosäure, bevorzugt I, L, M oder F sein. Z₈ kann jede Aminosäure, bevorzugt Q oder H sein. Z₉ kann jede Aminosäure sein. Z₁₀ kann jede Aminosäure, bevorzugt T oder S sein. Z₁₁ kann jede Aminosäure, bevorzugt E oder D sein. Z₁₂ kann jede Aminosäure, bevorzugt V, M
10 oder I sein. Die Aminosäuren sind wiederum im Einbuchstabencode angegeben.

Die erfindungsgemäßen ADF-Sequenzen bzw. die ADFs, die für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können, können die vorgenannten drei Konsensussequenzen I, II und III auch in Kombination enthalten.

15

Die vorliegende Erfindung bezieht sich somit auch auf Nukleinsäuresequenzen, die u.a. für die oben dargestellte Konsensus-Sequenz mit der SEQ ID No. 89, 90 und/oder 91 kodieren sowie deren Verwendung in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit einer erhöhten Pathogenresistenz durch
20 Änderung des Gehalts und/oder der Aktivität von mindestens einem ADF.

Wie bereits erwähnt, kann die Änderung des Gehalts und/oder der Aktivität von ADFs bzw. ADF3 auf verschiedene Weise erfolgen. Wenn im Folgenden auf ADFs im Allgemeinen Bezug genommen wird, schließt dies den ADF3 aus Gerste immer
25 mit ein. Die Erhöhung der ADF-Aktivität und des ADF-Gehalts kann z.B. durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Transkriptions-, Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend für mindestens einen ADF bzw. funktionellen Homologen, Teilen oder Mutanten davon gegenüber dem Wildtyp erfolgen. Dies kann
30 beispielsweise durch Induzierung des/der jeweiligen endogenen ADF-Gen(e) oder

durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend für ADFs bzw. funktionellen Homologen, Teilen oder Mutanten davon erfolgen.

- In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der ADF-Aktivität bzw. des ADF-Gehalts gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend für einen ADF. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend für einen ADF durch Einbringen von Nukleinsäuren, kodierend für mindestens ein ADF, in die jeweilige Pflanze bzw. Pflanzenzelle. Dazu können prinzipiell die ADF-Gene verschiedenster Organismen, also jede Nukleinsäure, die für einen ADF mit wesentlicher Homologie zu ADF3 aus Gerste bzw. funktionellen Homologen, Teilen oder Mutanten davon kodiert, verwendet werden. Bei genomischen ADF-Nukleinsäuresequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall, dass der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden ADF-Sequenzen zu spleißen, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen wie entsprechende cDNAs zu verwenden. Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können z.B. eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.
- Bei einem bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz wird eine Nukleinsäuresequenz, die für mindestens einen ADF kodiert, auf eine Pflanze bzw. Pflanzenzelle übertragen. Diese Übertragung führt zu einer Erhöhung der Expression bzw. der Aktivität an ADF im Vergleich zum Wildtyp und entsprechend zu einer Erhöhung der Pathogenresistenz in den transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen. Ein solches Verfahren kann verwendet werden, um die Expression von DNA-Sequenzen, die für ADFs oder deren funktionell äquivalente Homologe, Teile bzw. funktionelle Mutanten kodieren, zu erhöhen und damit die Pathogenresistenz in den transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen ebenfalls zu erhöhen. Die Verwendung von Vektoren,

- 54 -

die diese Sequenzen und regulatorische Sequenzen, wie Promotor- und Terminationssequenzen, umfassen, ist dem Fachmann bekannt.

Ein solches Verfahren umfasst erfindungsgemäß typischerweise die folgenden

5 Schritte:

a) Herstellung eines Vektors umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- 10 - eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz, die für mindestens einen ADF oder funktionell äquivalente Homologe, Teile oder Mutanten davon kodiert,
 - operativ damit verknüpft eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz
- 15 b) Übertragung des Vektors aus Schritt a) auf eine Pflanzenzelle und gegebenenfalls Integration in das pflanzliche Genom.

Der Fachmann weiß, wie ein Vektor aus Schritt a) auf Pflanzenzellen übertragen werden kann und welche Merkmale ein Vektor besitzen muss, um ins pflanzliche
20 Genom integriert werden zu können.

Ein Beispiel für die Überexpression einer funktionellen Mutante eines ADFs ist die Überexpression von HvADF3-S⁶A (SEQ ID No. 2, siehe Beispiele). Durch den Aminosäureaustausch von Serin gegen Alanin kann der ADF3 nicht mehr in der
25 Position 6 phosphoryliert werden. Dies führt zu einer konstitutiv aktiven Form von ADF3. So führt die Überexpression dieser Mutante sowohl zu einer Erhöhung des Gehalts an ADF3 in den transgenen Pflanzen als auch zu einer erhöhten Aktivität an ADF3.

Wenn der ADF-Gehalt in transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen durch Übertragen einer Nukleinsäure erhöht wird, die für eine ADF aus einem anderen Organismus wie z.B. *Dictyostelium discoideum* kodiert, dann ist es empfehlenswert, die durch die Nukleinsäuresequenz z.B. aus *Dictyostelium discoideum* kodierte

- 5 Aminosäuresequenz durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code in eine Nukleinsäuresequenz zu überführen, die vor allem solche Codons umfasst, die aufgrund der Organismus-spezifischen Codon-Usage häufiger verwendet werden. Die Codon-Usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

10

Unter Erhöhung der Genexpression bzw. der Aktivität einer Nukleinsäure kodierend einen ADF wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus- und insbesondere der Pflanzen-eigenen endogenen ADFs verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor-DNA-Sequenz für ADF

15 kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte, vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen ADF-Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA-Sequenzen erfolgen.

- Eine Veränderung der Promotor-Sequenz von endogenen ADF-Genen führt in der
- 20 Regel zu einer Veränderung der exprimierten Menge des ADF-Gens und damit auch zu einer Änderung der in der Zelle bzw. der Pflanzen nachweisbaren ADF-Aktivität.

- Des Weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression mindestens eines endogenen ADF-Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten
- 25 Organismus nicht vorkommendes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt. Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

- 56 -

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Aktivität und des Gehalts von endogenen ADFs besteht darin, Transkriptionsfaktoren, die in die Transkription der endogenen ADF-Gene involviert sind, z.B. durch Überexpression hochzuregulieren. Die Maßnahmen zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren sind dem Fachmann
5 bekannt und werden ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Erfindung für ADFs offenbart.

Darüber hinaus kann eine Veränderung der Aktivität von endogenen ADFs durch gezielte Mutagenese der endogenen Genkopien erreicht werden.
10

Eine Veränderung der endogenen ADFs kann ebenfalls durch Beeinflussung der post-translationalen Modifikationen von ADFs erreicht werden. Dies kann z.B. dadurch geschehen, dass die Aktivität von Enzymen wie Kinasen oder Phosphatasen, die in die post-translationalen Modifikation von ADFs involviert sind, durch entsprechende Maßnahmen wie Überexpression oder "gene silencing" reguliert wird.
15

Die Expression von endogenen ADFs kann auch über die Expression von Aptameren, die spezifisch an die Promotorsequenzen von ADFs binden, reguliert werden. Je nachdem, ob die Aptamere an stimulierende oder reprimierende Promotorbereiche binden, wird die Menge und in diesem Fall damit die Aktivität an
20 endogenem ADF erhöht.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz kann die Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität von mindestens einem ADF durch unterschiedliche Strategien erreicht werden. Zum Beispiel kann die Expression von mindestens einem ADF in transgenen Pflanzen durch "Silencing" erniedrigt werden.
25

Beim Silencing wird z.B. eine Nukleinsäure, die für mindestens einen ADF oder Teile davon kodiert und/oder dazu komplementär ist, auf die Pflanze übertragen. Um
30

sicherzustellen, dass die Pflanzen für die übertragenen Nucleinsäuren transgen sind, wird die zu übertragende Nucleinsäure in der Regel durch einen Vektor, wie z.B. ein Plasmid auf die Pflanze übertragen, der in der Lage ist, sich innerhalb der Pflanzenzelle stabil zu replizieren oder die übertragene Nucleinsäure in das pflanzliche
5 Genom zu integrieren.

Bevorzugt kann für das Silencing von ADFs das RNAi-Verfahren verwendet werden. Dabei wird z.B. ein Vektor auf die Pflanzenzelle übertragen, der in 5'-3'-Richtung die folgenden Elemente umfasst: Einen in Pflanzen funktionsfähigen Promotor; operativ
10 daran gebunden eine DNA-Sequenz, die die antisense-Sequenz der für den ADF oder Teile davon kodierenden Sequenz umfasst und an ihrem 3'-Ende vom Spleißosom erkennbare 3'-Exonsequenzen aufweist; ein Intron; eine DNA-Sequenz, die die sense-Sequenz der für den ADF oder Teile davon kodierenden DNA-Sequenz umfasst und an ihrem 5'-Ende vom Spleißosom erkennbare 5'-Exon-Sequenzen
15 aufweist; sowie eine Terminationssequenz. Ein solcher Vektor ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Position der antisense und sense-Sequenzen kann natürlich vertauscht werden. Dem Fachmann ist dabei klar, dass die jeweiligen 5'- und 3'-Splice sites entsprechend angepasst werden müssen.

20 Werden solche Vektoren stabil auf Pflanzenzellen übertragen, entsteht bei der Transkription dieser Vektoren zunächst eine prä-mRNA, die aus einem ersten Exon, das die antisense-Sequenz der für den ADF oder Teile davon kodierenden Sequenz umfasst, einem Intron und einem zweiten Exon, das die sense-Sequenz der für den ADF oder Teile davon kodierenden DNA-Sequenz umfasst, besteht. Da durch den
25 Spleiß-Vorgang das Intron entfernt wird, entsteht ein kontinuierliches RNA-Molekül mit Bereichen, die zueinander komplementär sind. Ein solches RNA-Molekül wird eine doppelsträngige Struktur ausbilden (Smith et al., 2000, Nature, 407:319-320).

Solche doppelsträngigen RNA-Moleküle sind in der Lage, durch Induktion des
30 PTGS-Systems spezifisch die mRNA von ADFs zu silencen, so dass als Folge ADFs

nicht mehr exprimiert werden. Welche ADFs nicht mehr exprimiert werden, kann dabei durch die entsprechende Wahl der antisense- und sense-Sequenzen bestimmt werden. Das Auffinden von Protein-charakteristischen Sequenzen gehört dabei zum üblichen Wissen eines Fachmanns. Der Fachmann weiß, dass eine Vielzahl von
5 ADFs auch durch die mehrfache Verwendung von jeweils charakteristischen Sequenzen gesilenct werden können.

Ein solches Verfahren kann z.B. folgende Schritte umfassen:

- 10 a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz
 - operativ daran gebunden die identische oder homologe antisense-Sequenz der für den mindestens einen ADF oder Teilen davon kodierenden
15 Sequenz, wobei die Sequenz an ihrem 3'-Ende vom Spleißosom erkennbare 3'-Exon-Sequenzen aufweist
 - operativ daran gebunden ein Intron
 - operativ daran gebunden die identische oder homologe sense-Sequenz der für den mindestens einen ADF oder Teilen davon kodierenden Sequenz,
20 wobei die Sequenz an ihrem 5'-Ende vom Spleißosom erkennbare 5'-Exon-Sequenzen aufweist
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz
- 25 b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

Der Fachmann weiß ebenfalls, dass neben den genannten Vektoren auch andere Vektoren für das RNAi-Verfahren bzw. PTGS eingesetzt werden können. Solche
30 Vektoren können z.B. so gebaut sein, dass die sense- und antisense-Sequenzen

jeweils von einem U6-Promotor ausgehend transkribiert werden, in der Zelle hybridisieren und das PTGS-System induzieren (Tuschl, 2002, Nat. Biotechnol. 20, 446-448; Miyagishi et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20, 497-500; Lee et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20, 500-505). Bei anderen Vektoren sind die sense- und antisense-

5 Sequenzen durch eine "loop"-Sequenz verbunden und werden von einem humanen RNAse P RNA H1-Promotor transkribiert. Durch Rückfaltung des "loop" können die sense- und antisense-Sequenzen hybridisieren, doppelsträngige RNA ausbilden und das PTGS-System induzieren (Tuschl, 2002, vide supra; Paul et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20, 505-508; Paddison et al., 2002, Genes Dev., 16, in press,

10 Brummelkamp et al., 2002, Science, 296, 550-553). Bei einer weiteren Ausführungsform des RNAi-Verfahrens werden keine Vektoren verwendet, sondern vorsynthetisierte doppelsträngige RNA-Moleküle, die über die oben beschriebenen Sense- bzw. Antisense-Sequenzen verfügen z.B. durch biolistische Methoden direkt in die zu transfizierenden Zelle eingebracht.

15

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die Vektoren, die zur Übertragung der Nukleinsäuren verwendet werden, in 5'-3'-Orientierung einen Promotor, operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die die für ADFs oder Teile davon kodierende Sequenz umfasst und zu sich selbst komplementäre Abschnitte enthält, sowie eine

20 Terminationssequenz. Bei der Transkription dieser Vektoren in der Pflanzenzelle entstehen RNA-Moleküle, die über Sequenzbereiche verfügen, die mit sich selbst hybridisieren können. Dadurch können in der Zelle doppelsträngige RNA-Moleküle auftreten, die das PTGS-System induzieren, was dann dazu führt, dass die mRNA von ADFs spezifisch abgebaut wird. Dieses auch als Co-Suppression bezeichnete

25 Verfahren zum Silencing von pflanzlichen Proteinen setzt voraus, dass die mRNA des (der) zu supprimierenden ADF(s) über Abschnitte verfügt, die zueinander komplementär sind. Solche Abschnitte können vom Fachmann durch einfache visuelle Inspektion der für das jeweilige Protein kodierenden DNA-Sequenz oder durch entsprechende Sequenzprogramme wie z.B. DNASTar der DNASTAR Inc.,

30 Madison, USA, identifiziert werden.

- 60 -

Ein solches Verfahren kann z.B. die folgenden Schritte umfassen:

- a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-
- 5 Orientierung:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden die identische oder homologe sense-Sequenz der für den/die endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz, wobei die Sequenz über selbst-komplementäre Bereiche verfügt,
 - 10 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.
- 15 Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung umfassen die zur Übertragung der Nukleinsäuren verwendeten Vektoren in 5'-3'-Orientierung einen Promotor, operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die die antisense-Sequenz der für ADFs oder Teile davon kodierenden Sequenz umfasst, sowie eine Terminationssequenz. Bei der
- 20 Transkription solcher Vektoren in Pflanzenzellen entsteht ein RNA-Molekül, dessen Sequenz komplementär zu der für ADFs oder Teilen davon kodierenden mRNA-Sequenz ist. Durch Hybridisierung der antisense-Sequenz mit endogenen mRNA-Sequenzen von ADFs *in vivo* kann daher die Expression von ADFs in Pflanzenzellen unterdrückt werden.
- 25 Ein solches Verfahren kann z.B. die folgenden Schritte umfassen:
- a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-
- Orientierung:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,

- 61 -

- operativ daran gebunden die identische oder homologe antisense-Sequenz der für den/die endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz,
 - operativ daran gebunden eine ein Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,
- 5
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

Bei einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur

10 Übertragung der Nukleinsäuren auf die Pflanzenzellen Vektoren verwendet, die in 5'-3'-Orientierung einen in Pflanzen funktionsfähigen Promotor, operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch die mRNA von mindestens einem ADF erkennt, sowie eine Terminationssequenz umfassen. Dem Fachmann ist bekannt, wie Ribozyme, die eine gegen eine bestimmte mRNA

15 gerichtete Endonuklease-Aktivität besitzen, hergestellt werden können. Im Detail ist dies z.B. in Steinecke et al. beschrieben (1992, EMBO J., 11: 1525). Im Rahmen dieser Erfindung sind mit dem Begriff "Ribozymen" auch solche RNA-Sequenzen gemeint, die neben dem eigentlichen Ribozym noch Führungssequenzen umfassen, die zu der mRNA der ADFs oder Teilen davon komplementär sind und so das

20 mRNA-spezifische Ribozym noch gezielter zum mRNA-Substrat des Ribozyms führen.

Ein solches Verfahren umfasst z.B. die folgenden Schritte:

- 25 a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch die mRNA des/der endogenen ADF(s) erkennt,
 - operativ daran gebunden eine ein Pflanzen funktionelle
- 30 Terminationssequenz,

- 62 -

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

Eine weitere Alternative zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter
5 Pathogenresistenz bietet die Übertragung von Nucleinsäuren durch Vektoren, die in
5'-3'-Orientierung einen in Pflanzen funktionsfähigen Promotor, operativ daran
gebunden eine DNA-Sequenz, die antisense-Sequenzen der für ADFs oder Teile
davon kodierenden Sequenzen sowie die für RNase P kodierende Sequenz umfasst,
10 entstehen in der Zelle RNA-Moleküle, die über eine Führungssequenz (die antisense-
Sequenz) verfügen, welche die RNase P zur mRNA der ADFs führt, wodurch die
Spaltung der mRNA durch RNase P bewirkt wird (US-Patent Nr. 5,168,053).
Vorzugsweise umfasst die Führungssequenz 10 bis 15 Nucleotide, die zur DNA-
Sequenz der ADFs komplementär sind, und eine 3'-NCCA Nucleotidsequenz, wobei
15 N vorzugsweise ein Purin ist. Die Transkripte der externen Führungssequenz binden
an die Ziel-mRNA über die Ausbildung von Basenpaaren, was die Spaltung der
mRNA durch die RNAase P am Nucleotid 5' von der gepaarten Region ermöglicht.
Eine solche gespaltene mRNA kann nicht in ein funktionsfähiges Protein translatiert
werden.

20

Ein solches Verfahren kann z.B. die folgenden Schritte umfassen:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nucleinsäuresequenzen in 5'-3'-
Orientierung:

- 25
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - eine operativ daran gebundene DNA-Sequenz, die zu der für die mRNA
des/der endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz
komplementär ist,
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für Ribonuklease P
30 kodiert,

- 63 -

- operativ daran gebunden eine ein Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

5

Darüber hinaus können zur erfindungsgemäßen Herstellung von transgenen Pflanzen mit einer erhöhten Pathogenresistenz auch Vektoren verwendet werden, die eine DNA-Sequenz enthalten, die in 5'-3'-Orientierung die folgenden Bestandteile aufweist: Eine DNA-Sequenz, die dem 5'-Bereich der für einen ADF kodierenden

10 DNA-Sequenz entspricht, eine DNA-Sequenz für Resistenzgene, sowie eine DNA-Sequenz, die dem 3'-Bereich der für einen ADF kodierenden Sequenz entspricht. Solche Vektoren können verwendet werden, um über homologe Rekombination einen spezifischen Gen-knock-out des interessierenden ADF's herbeizuführen. Bei Pflanzenzellen, in denen die homologe Rekombination stattgefunden hat, wird in die

15 DNA, die für den ADF kodiert, die Sequenz für das Resistenzgen inseriert, so dass keine funktionelle mRNA des ADF's mehr in der Zelle hergestellt werden kann. Durch Selektion gegen das Resistenzgen können die Pflanzenzellen, in denen die Rekombination stattgefunden hat, identifiziert werden. Wie solche Vektoren zum Gen-Knock-out durch homologe Rekombination im Einzelnen zu konstruieren sind,

20 welche Elemente sie umfassen müssen (Promotoren, Enhancer, flankierende Sequenzen) und wie die Pflanzenzellen des Knock-outs identifiziert werden, ist dem Fachmann bekannt. Als Resistenzgene werden typischerweise Antibiotika-Resistenzgene verwendet. Andere Resistenzgene, die eine Selektion der Zellen, in denen die Rekombination stattgefunden hat, erlauben, können natürlich auch

25 verwendet werden.

Ein solches Verfahren kann z.B. folgende Schritte umfassen:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-

30 Orientierung:

- 64 -

- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die identisch oder homolog zu der für das 5'-Ende des/der endogenen ADF(s) kodierenden Sequenz(en) ist,
- 5 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein Resistenzgen kodiert,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die identisch oder homolog zu der für das 3'-Ende des/der endogenen ADF(s) kodierenden Sequenz(en) ist,
- 10 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und Integration ins pflanzliche Genom.

15 Wenn im Rahmen der vorliegenden Erfindung von Nukleinsäure-Sequenzen gesprochen wird, die für ADFs oder Teile davon kodieren, dann sind damit sowohl die komplette kodierende DNA-Sequenz der ADFs als auch die komplette mRNA-Sequenz bzw. die jeweiligen Teilbereiche gemeint. Da einige der oben erwähnten Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, in denen die Expression von

20 ADFs signifikant reduziert ist, darauf beruhen, dass eine spezifische Hybridisierung zwischen der endogenen mRNA von ADFs und den Sequenzen, die bei der Transkription der oben erwähnten Vektoren entstehen, stattfindet (wie z.B. der antisense-Strategie), weiß der Fachmann, dass die übertragenen Nukleinsäuren nicht immer die gesamte für die ADFs kodierende Sequenz, unabhängig ob es sich um die

25 sense- oder antisense-Sequenz handelt, enthalten müssen. Vielmehr können für eine spezifische Hybridisierung bereits relativ kurze Bereiche der für ADFs kodierenden Sequenzen ausreichend für ein effizientes Silencing sein.

Bei Vektoren, deren Transkription zu doppelsträngigen RNA-Molekülen führt, reicht

30 es aus, wenn die Sequenzen, die den Sequenzbereichen der mRNA von ADFs

- 65 -

entsprechen, letztendlich zu doppelsträngigen RNA-Molekülen mit ca. 25
Nukleotiden, bevorzugt 21, 22 oder 23 Nukleotiden Länge führen. Die bei der
Antisense-Strategie übertragenen Sequenzen umfassen in der Regel zwischen 20-
1000 Nukleotide, bevorzugt zwischen 20-750 Nukleotide, besonders bevorzugt um
5 die 400-800 und 500-750 Nukleotide. Es können aber auch Sequenzen verwendet
werden, die zwischen 20-500 Nukleotide, zwischen 20-300 Nukleotide, zwischen 20-
150 Nukleotide und zwischen 20-100 oder 20-50 Nukleotide umfassen.

Der Fachmann weiß, dass beim RNAi bzw. PTGS die zur Ausbildung von doppel-
10 strängigen RNA-Molekülen verwendeten sense- und antisense RNAs auch um die
21, 22 oder 23 Nukleotide mit einem charakteristischen 3'-Überhang umfassen
können (Tuschl, 2002, Nat. Biotechnol. 20, 446-448).

Wenn Nukleinsäuren auf die Pflanzenzellen übertragen werden, deren Transkription
15 in der Zelle zu Sequenzen führen, die zu der mRNA von ADFs komplementär sind
(wie z.B. bei der antisense-Strategie), dann müssen diese Sequenzen nicht
hundertprozentig komplementär zu der mRNA sein. Vielmehr reicht es aus, wenn
diese Sequenzen zu mindestens 50%, bevorzugt zu mindestens 60%, besonders
bevorzugt zu mindestens 70%, weiterhin besonders bevorzugt zu mindestens 80%,
20 insbesondere bevorzugt zu mindestens 90% und am meisten bevorzugt zu
mindestens 95% komplementär sind. Die Abweichungen können dabei durch
Deletion, Substitution und/oder Insertion entstanden sein. Dem Fachmann ist
natürlich klar, dass mit abnehmender Komplementarität die Wahrscheinlichkeit
steigt, dass mehrere ADFs gesilencet werden.

25

Generell gilt, dass nur solche komplementären Sequenzen erfindungsgemäß ver-
wendet werden können, die in der Lage sind, spezifisch mit mRNA-Bereichen von
ADFs zu hybridisieren. Sequenzen, die in vivo mit RNA-Bereichen von anderen
Proteinen als ADFs hybridisieren und deren Silencing bewirken, sind für die
30 erfindungsgemäßen Verfahren nicht geeignet. Je nach der gewählten Sequenz und je

nach dem Komplementaritätsgrad, wird eine Vielzahl oder einige wenige ADFs gesilencet werden. Unter Umständen wird nur die Expression eines ganz spezifischen ADF unterbunden. Die Länge von komplementären Sequenzen beträgt bevorzugt zwischen 20-1000 Nukeotide, ebenfalls bevorzugt zwischen 20-750 Nukleotide, besonders bevorzugt zwischen 20-500 Nukleotide, ebenfalls besonders bevorzugt zwischen 20-300 Nukleotide, insbesondere bevorzugt zwischen 20-150 Nukleotide, ebenfalls insbesondere bevorzugt zwischen 20-75 Nukleotide und am meisten bevorzugt um die 20-50 Nukleotide. Unter Umständen können die Sequenzen auch nur um die 20 oder 25 Nukleotide umfassen.

10

Einige der oben erwähnten Verfahren können auch mit Sequenzen durchgeführt werden, die nicht Bestandteil des kodierenden Teils der mRNA von ADFs sind oder dazu komplementär sind. Es kann z.B. ausreichend sein, wenn es sich um Sequenzen aus dem 5'- oder 3'- untranslatierten Bereich handelt, sofern diese regulatorischen Sequenzen charakteristisch für die mRNA des jeweiligen ADF's sind.

15

Solche Sequenzen können insbesondere dann eingesetzt werden, wenn das Silencing durch doppelsträngige RNA-Konstrukte induziert wird oder die Translation einer mRNA durch antisense-Konstrukte inhibiert wird. Daher umfasst der Begriff mRNA erfindungsgemäß nicht nur die kodierenden Bestandteile der mRNA von ADFs, sondern auch alle regulatorischen Sequenzen, die in der prä-mRNA oder reifen mRNA auftreten und die für die mRNA der ADFs charakteristisch sind. Dies gilt entsprechend auch für die DNA-Sequenz. Dabei kann es sich z.B. um 5'- und 3'- untranslatierte Bereiche handeln, um Promotorsequenzen, um upstream activating sequences, um Introns etc.

20
25

Wenn Vektoren verwendet werden, deren Transkription zu RNA-Molekülen führt, die aus einer Führungssequenz und RNase P bestehen, dann muss die Führungssequenz ausreichend komplementär sein, um spezifisch den ADF zu erkennen. Welcher Bereich der mRNA des ADF's durch die Führungssequenz

30

- 67 -

erkannt wird, kann gemäß den jeweiligen Erfordernissen gewählt werden. Bevorzugt umfassen solche Führungssequenzen um die 20 Nukleotide, sie sollten jedoch nicht wesentlich kürzer als 15 Nukleotide sein. Bei einer 100%-igen Komplementarität der Führungssequenz sollten auch 12 Nukleotide ausreichend sein. Selbstverständlich
5 können die Führungssequenzen bis zu 100 Nukleotide oder mehr umfassen, da dadurch lediglich ihre Spezifität für die jeweilige mRNA erhöht wird.

Wenn im Rahmen der vorliegenden Erfindung von sense-Sequenzen gesprochen wird, dann sind damit diejenigen Sequenzen gemeint, die dem kodierenden Strang
10 der Gene für ADFs entsprechen oder Teile davon umfassen. Solche Sequenzen müssen jedoch nicht zu 100% identisch mit den für die interessierenden ADFs kodierenden Sequenzen sein. Es genügt, wenn die Sequenzen zu den für ADFs kodierenden Sequenzen derart ausreichend ähnlich sind, dass ihre Expression in pflanzlichen Zellen zu einem effizienten und spezifischen Silencing der ADFs in der
15 Zelle z.B. durch RNA interference oder Co-Suppression führt.

Es sollte ausreichen, wenn diese Sequenzen zu mindestens 50% identisch sind, bevorzugt zu mindestens 60%, besonders bevorzugt zu mindestens 70%, weiterhin besonders bevorzugt zu mindestens 80%, insbesondere bevorzugt zu mindestens
20 90% und am meisten bevorzugt zu mindestens 95% identisch sind. Bei solchen Identitätsgraden wird erfindungsgemäß davon gesprochen, dass die Sequenzen zueinander homolog sind bzw. eine Homologie aufweisen (siehe oben). Die Abweichungen zu den für die ADFs oder Teilen davon kodierenden Sequenzen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution und/oder Insertion entstanden
25 sein. Dem Fachmann ist natürlich klar, dass mit abnehmender Identität die Wahrscheinlichkeit steigt, dass mehrere ADFs gesilencet werden. Sequenzen, deren Identitäts- bzw. Homologiegrad so gering ist, dass andere Proteine als ADFs gesilencet werden, sind für die erfindungsgemäßen Verfahren nicht ausreichend spezifisch und nicht geeignet.

30

Wenn entsprechend von antisense-Sequenzen gesprochen wird, dann sind erfindungsgemäß diejenigen Sequenzen gemeint, die dem nicht kodierenden DNA-Strang der Gene der interessierenden ADFs entsprechen. Auch diese Sequenzen müssen natürlich nicht hundertprozentig identisch mit der Sequenz des nicht-

5 kodierenden DNA-Strangs der Genen der jeweiligen interessierenden ADFs sein, sondern können die oben genannten Homologiegrade aufweisen. Dieser Sachverhalt kommt auch in dem Umstand zum Ausdruck, dass antisense-Sequenzen, die definitionsgemäß zu der mRNA eines Gens komplementär sind, nicht zu 100% komplementär zu dieser mRNA sein müssen. Sie können z.B. auch zu mindestens

10 50% komplementär, bevorzugt zu mindestens 60% komplementär, besonders bevorzugt zu mindestens 70% komplementär, weiterhin besonders bevorzugt zu mindestens 80% komplementär, insbesondere bevorzugt zu mindestens 90% komplementär und am meisten bevorzugt zu mindestens 95%, 98% und/oder 100% komplementär sein. Wie oben ausgeführt, ist es ausreichend, wenn die antisense-

15 Sequenzen in der Lage sind, spezifisch mit der jeweiligen interessierenden mRNA von ADFs zu hybridisieren. Die Hybridisierung kann entweder *in vivo* unter zellulären Bedingungen oder *in vitro* stattfinden.

Die Hybridisierung einer antisense-Sequenz mit einer endogenen mRNA-Sequenz

20 findet typischerweise *in vivo* unter zellulären Bedingungen oder *in vitro* statt.

Die Begriffe "sense" und "antisense" sind darüber hinaus dem Fachmann bekannt. Der mit dem Silencing von Genen in Pflanzen vertraute Fachmann weiß entsprechend aus dem Stand der Technik auch, wie groß die zum Silencing

25 verwendeten Nukleinsäuremoleküle sein müssen und welche Homologie bzw. Komplementarität sie zu den jeweils interessierenden Sequenzen aufweisen müssen. Erfindungsgemäß können antisense-Sequenzen, die z.B. *in vivo* und/oder *in vitro* nicht spezifisch mit kodierenden sense-Sequenzen von ADFs hybridisieren können, d.h. auch mit den kodierenden sense-Sequenzen von anderen Protein-Klassen

30 hybridisieren, nicht verwendet werden.

Prinzipiell kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA Sequenzen, die, gekoppelt an die antisense-Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner et al., (1999) 5 FEMS Microbiol Rev. 23 (3), 257-75). Dies kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen.

Weitere Methoden zur Reduzierung der Expression von ADFs insbesondere in Pflanzen als Organismen umfassen die zur Kosuppression führende Überexpression 10 homologer ADF-Nukleinsäuresequenzen (Jorgensen et al., (1996) Plant Mol. Biol. 31 (5), 957-973) oder die Induktion des spezifischen RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell et al., (1999) Plant J. 20 (3), 357-362). Diese Methoden werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet (siehe oben).

15 Weitere Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in das endogene Gen mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al., (2000) Nat. Biotechnol. 18 (5), 555-558) oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., (1992) Plant Mol. 20 Biol. 20 (5) 963-976) oder homologer Rekombination (Hohn et al., (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 8321-8323.).

Ferner ist eine Genrepression (aber auch die Genüberexpression) auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. Faktoren vom Typus der Zink- 25 fingertranskriptionsfaktoren möglich. Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere sein (Famulok et al., (1999) Curr Top Microbiol Immunol. 243, 123-36).

Die Reduktion kann auch durch Aptamere erfolgen. Aptamere können auch so entworfen werden, dass sie spezifisch an die ADF-Proteine binden und durch z.B. Bindung an das katalytische Zentrum der ADFs die Aktivität der ADFs reduzieren. Die Expression von Aptameren erfolgt üblicherweise durch Vektor-basierte
5 Überexpression und ist dem Fachmann ebenso wie der Entwurf und die Selektion von Aptameren wohl bekannt (Famulok et al., (1999) *Curr Top Microbiol Immunol.*, 243,123-36).

Eine gute Übersicht zu einigen der oben beschriebenen Verfahren findet sich in z.B.
10 Waterhouse et al., (2001), *Nature* 411, 834-842; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.* 20, 446-448 und weiteren Publikationen in dieser Ausgabe, Paddison et al., (2002), *Genes Dev.*, 16, 948 – 958; Brummelkamp et al., (2002), *Science* 296, 550-553).

Als weitere proteinbindende Faktoren, deren Expression in Pflanzen eine Reduktion
15 des Gehalts und/oder der Aktivität an ADFs bewirkt, kommen ADF-spezifische Antikörper in Frage. Die Herstellung von monoklonalen, polyklonalen oder rekombinanten ADF-spezifischen Antikörpern folgt Standard-Protokollen (*Guide to Protein Purification*, *Meth. Enzymol.* 182, pp. 663-679 (1990), M. P. Deutscher, ed.). Die Expression von Antikörpern ist ebenfalls aus der Literatur bekannt (Fiedler et al.,
20 (1997) *Immunotechnology* 3, 205-216; Maynard and Georgiou (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 339-76). Dieser Ansatz ist weiter unten ausführlich dargestellt.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz sieht vor, dass die Aktivität an endogenen ADFs
25 dadurch verringert wird, dass in der Pflanze bzw. in den Pflanzenzellen nicht-funktionelle Mutanten von ADFs exprimiert werden. Durch Einführung solcher nicht-funktioneller Mutanten, bei denen es sich bevorzugt um dominant-negative Mutanten handelt, wird die Interaktion der endogenen ADFs mit ihren zellulären Bindungspartnern inhibiert. Durch Einführung von nicht-funktionellen Mutationen in
30 die endogenen ADFs können erfindungsgemäß ebenfalls Pflanzen und

- 71 -

Pflanzenzellen hergestellt werden, die über eine erhöhte Pathogenresistenz verfügen. Unter nicht-funktionellen Mutanten werden erfindungsgemäß Formen von ADFs verstanden, die über Mutationen verfügen, die verhindern, dass die ADFs mit G-Actin, F-Actin, Komponenten des Pathogens und/oder mit anderen physiologischen Bindungspartnern interagieren.

Wenn solche dominant-negativen Mutanten in der transgenen Zelle bzw. Pflanze exprimiert bzw. überexprimiert werden, sind sie in der Lage, die Interaktion der Pathogenkomponenten mit Wildtyp-ADFs bzw. die Interaktion von Wildtyp-ADFs mit den anderen physiologischen Faktoren, wie z.B. Actin, auszukompetitieren, so dass das Pathogen keine Möglichkeit zur Propagation hat. Überraschend bei diesem Verfahren ist, dass dadurch transgene Pflanzen hergestellt werden können, die über eine erhöhte Pathogenresistenz verfügen und gleichzeitig einen im Wesentlichen normalen Phänotyp aufweisen, obwohl solche dominant-negativen Mutanten das endogene Cytoskelett der Pflanzenzelle beeinflussen sollten.

Der Fachmann ist sich darüber bewusst, dass erfindungsgemäße transgene Pflanzen und Pflanzenzellen nicht nur durch Expression bzw. Überexpression dominant-negativer Mutanten von ADFs aus Pflanzen wie ADF3 hergestellt werden können, sondern selbstverständlich auch durch Expression bzw. Überexpression von dominant-negativen Mutanten von ADFs aus anderen Organismen. Dabei kommen ADFs aus Eukaryoten wie Hefen (z.B. *S. cerevisiae*), *C. elegans* oder höheren Säugetieren wie Maus, Ratte und Mensch in Frage. Voraussetzung ist, dass die Expression dieser dominant-negativen Mutanten eine Konkurrenz der endogenen pflanzlichen ADFs mit Pathogenkomponenten und/oder deren zellulären Interaktionspartnern bewirkt. Die ADFs aus anderen Organismen können durch die oben beschriebenen Datenbankanalysen und Homologie-Vergleiche identifiziert werden. Voraussetzung ist, dass sie über eine Region bzw. Regionen verfügen, die zu den oben genannten Konsensus-Sequenzen homolog ist.

30

- 72 -

Transgene Pflanzen, die dominant-negative Mutanten von ADFs exprimieren, können hergestellt werden, indem ein entsprechender Expressionsvektor auf Pflanzenzellen übertragen wird.

5 Ein solches Verfahren kann z.B. die folgenden Schritte umfassen:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
- 10 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für eine dominant-negative Mutante eines pflanzlichen ADFs, kodiert
- operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

b) Übertragen des Vektors aus a) auf die Pflanzenzellen und gegebenenfalls
15 Integration ins pflanzliche Genom.

Nicht-funktionelle Mutationen, bei denen es sich um dominant-negative Mutanten von ADFs handelt, kann der Fachmann durch einfaches routiniertes Experimentieren identifizieren. Zum einen sind, wie bereits oben erwähnt, eine Reihe von Mutationen
20 z.B. aus dem ADF3 von Mais bekannt, die die Interaktion mit F-Actin bzw. G-Actin inhibieren. Bei diesen handelt es sich um Mutationen, bei denen die Thyrosinreste in den Positionen 67 und 70 von ADF3 aus Mais durch Phenylalanin ersetzt werden. Durch so genannte Sequenz-Alignments können die für die Thyrosine 67 und 70 äquivalenten Positionen z.B. in ADF3 aus Gerste bzw. anderen ADFs bestimmt
25 werden und auf diese Weise ähnlich Mutationen hergestellt werden. Beim ADF3 aus Gerste handelt es sich z.B. um die Positionen Phenylalanin-66 und Phenylalanin-69. Diese können z.B. durch Alanin ersetzt werden.

Mutationen, die die Interaktion von ADFs mit G-Actin, F-Actin, anderen
30 physiologischen Bindungspartnern und/oder Pathogenkomponenten unterbinden,

können durch Herstellen von rekombinanten ADF-Proteinen, die unterschiedliche Mutation und/oder Deletion tragen, und Testen dieser rekombinanten Proteine in Bindungsassays mit den vorgenannten Komponenten in einfacher Weise ermittelt werden.

5

Auf gleiche Weise kann z.B. in *in vitro*-Bindungstests getestet werden, ob dominant-negative Mutanten von ADF-Proteinen und bevorzugt von ADF3 aus Gerste in der Lage sind, die Interaktion der ADF mit G-Actin, F-Actin, anderen zellulären Bindungspartnern und/oder Pathogenkomponenten zu kompetitieren.

10

Unter "dominant-negativen Mutationen" werden alle Mutationsarten verstanden, d.h. Insertion, Deletion und Punktmutation, die in der Lage sind, die Interaktion von ADFs mit G-Actin, F-Actin, anderen zellulären Bindungspartnern und/oder Pathogenkomponenten zu unterbinden.

15

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Herstellen von transgenen Pflanzen mit erhöhter Pathogenresistenz durch Expression von dominant-negativen Mutanten von ADFs findet eine Modulation des Grades an Interaktion zwischen den endogenen ADFs mit ihren Bindungspartnern und kein Silencing der Wirtsfaktoren statt, was den zusätzlichen Vorteil bringt, dass dieser Mechanismus keinen direkten Angriffspunkt für Pathogen-kodierte Suppressoren bietet.

20

Dem Fachmann ist bekannt, wie Punktmutation(en), Insertionsmutation(en) oder Deletionsmutation(en) in die für ADFs kodierende Nukleinsäuresequenzen eingeführt werden können. PCR-Techniken können z.B. zur Einführung von Punktmutationen bevorzugt sein ("PCR technology: Principle and Applications for DNA Amplification", H. Ehrlich, id, Stockton Press). Beispiele zur Einführung von Punktmutationen in für ADF3 kodierende DNA-Sequenzen finden sich zudem in den Ausführungsbeispielen.

30

Transgene Pflanzen bzw. Pflanzenzellen, die eine erhöhte Pathogenresistenz aufweisen, können erfindungsgemäß auch derart hergestellt werden, dass z.B. ein rekombinanter Antikörper, der spezifisch die Interaktion von ADFs (und bevorzugt ADF3 aus Gerste), mit G-Actin, F-Actin, anderen zellulären Bindungspartnern und/oder Pathogenkomponenten blockiert bzw. kompetitiert, in den Pflanzen exprimiert wird.

Wie solche rekombinanten Antikörper gegen z.B. eine spezifische Domäne von ADFs isoliert und identifiziert werden können, ist dem Fachmann bekannt und kann der Literatur entnommen werden (Harlow et al., 1999, Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Unter rekombinanten Antikörpern werden erfindungsgemäß die bekannten unterschiedlichen Formen von rekombinanten Antikörpern verstanden, wie sie z.B. in Skerra et al. (Curr. Opin. Immunol. (1993) 2, 250 – 262) beschrieben wurden. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Antikörper umfassen dabei die so genannten Fab-Fragmente, Fv-Fragmente, scFv-Antikörper, scFv-Homodimere, die über Disulfid-Brücken miteinander verknüpft sind und so genannte VH-Ketten. Die Fab-Fragmente bestehen aus assemblierten vollständigen leichten und verkürzten schweren Ketten, wohingegen Fv-Fragmente aus nicht-kovalent miteinander verknüpften VH- und VL-Ketten bestehen. Ein Überblick über die genannten Fragmente und rekombinanten Antikörper findet sich in Conrad et al. (Plant Mol. Biol. (1998) 38, 101 – 109). Die genannten Fab- und Fv-Fragmente können in vivo miteinander assoziieren.

Da dieser Prozess unter Umständen jedoch nicht sehr effizient abläuft, werden erfindungsgemäß bevorzugt scFv-Antikörper eingesetzt. Diese bestehen aus dem variablen Anteil der leichten Kette und dem variablen Anteil der schweren Kette, die über ein flexibles Linkerpeptid miteinander fusioniert sind. Die Herstellung solcher scFv-Antikörper ist im Stand der Technik intensiv beschrieben worden (siehe u.a.

- 75 -

Conrad et al., vide supra; Breitling et al. (1999) *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, New York). Die scFv-Antikörper weisen die gleiche Antigen-Spezifität und Aktivität wie normale Antikörper auf, müssen aber nicht wie andere natürliche oder rekombinante Antikörper in vivo aus Einzelketten assembliert werden. Sie eignen sich deshalb insbesondere für die erfindungsgemäßen Verfahren.

In den oben angegebenen Referenzen wird ausführlich dargestellt, wie Nukleinsäuresequenzen, die für die erfindungsgemäß bevorzugten scFv-Antikörper kodieren, durch den Fachmann isoliert und hergestellt werden können.

10

Üblicherweise wird dabei von bestehenden Hybridoma-Zelllinien ausgegangen, die monoklonale Antikörper produzieren. Danach werden die für die leichte und schwere Ketten des Antikörpers kodierenden cDNAs isoliert und in einem zweiten Schritt die kodierenden Regionen für die variable Region der leichten und der schweren Kette in einem Molekül miteinander fusioniert.

15

Ein weiterer, dem Fachmann bekannter Weg zur Erzeugung rekombinanter Antikörper ist das Screening von Bibliotheken rekombinanter Antikörper (so genannte "phage display libraries", siehe auch Hoogenboom et al. (2000) *Immunology Today* 21, 371-378; Winter et al. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455; De Wildt et al. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18, 989-994). Durch dem Fachmann bekannte Vorgehensweisen können bei diesem Verfahren rekombinante Antikörper gegen ein gegebenes Antigen angereichert, selektiert und isoliert werden.

20

25 Ein Verfahren zur Expression von Antikörpern gegen ADFs kann z.B. die folgenden Schritte umfassen:

30

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,

- 76 -

- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für einen rekombinanten Antikörper kodiert, der für die endogene(n) ADF(s) spezifisch ist und/oder die Interaktionen mit physiologischen Bindungspartnern, bevorzugt G-Actin und/oder F-Actin, blockiert,
- 5 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf die Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.
- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, in denen die endogenen Gene von ADFs Mutationen, d.h. Substitutionen, Insertionen und/oder Deletionen aufweisen, die dazu führen, dass die exprimierten endogenen ADFs nicht mehr oder nur bedingt in der Lage sind, mit Pathogenfaktoren und/oder ihren endogenen zellulären Bindungspartnern zu interagieren. Pflanzen
- 15 bzw. Pflanzenzellen, die solche Mutationen aufweisenden, endogenen Genkopien für ADFs besitzen, werden sich, wie die oben beschriebenen transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen, durch eine erhöhte transiente oder permanente Pathogenresistenz gegenüber den oben genannten Virusgruppen und Stämmen auszeichnen. Solche Pflanzen und Pflanzenzellen, die im Gegensatz zu den oben genannten Pflanzen und
- 20 Pflanzenzellen nicht transgen sind, können durch klassische Mutagenese hergestellt werden.
- Erfindungsgemäß müssen solche nicht-transgenen Pflanzen oder Pflanzenzellen aber in den für endogene ADFs kodierenden Genen die oben genannten Mutationsarten
- 25 aufweisen, die zu einer Modulation der Expression der endogenen ADFs und/oder des Bindungsverhaltens der endogenen ADFs führen. Modulation der Expression der endogenen ADFs kann z.B. bedeuten, dass durch Mutationen in regulatorischen DNA-Elementen der Gene der endogenen ADFs, wie z.B. Promotor, Enhancern oder allgemein so genannten "upstream activating sequences", die Expression der
- 30 endogenen ADFs herunterreguliert wird.

Die Modulation des Bindungsverhaltens von ADFs bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die oben genannten Mutationsarten zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens der endogenen ADFs gegenüber den pathogenen Faktoren und/oder den normalen zellulären Bindungspartnern führen. Bevorzugt ist eine Modulation des Bindungsverhaltens der endogenen ADFs, die dazu führt, dass diese nicht mehr oder nur bedingt mit Pathogenfaktoren und/oder ihren zellulären Partnern interagieren. Auch eine Kombination der Modulation der Expression und des Bindungsverhalten der endogenen ADFs ist denkbar.

10

Zum Beispiel können Pflanzen oder Pflanzenzellen Mutationen in den Gensequenzen für endogene ADFs aufweisen, die zur Reduktion der Expression dieser Proteine führen. Andere Pflanzen oder Pflanzenzellen weisen Mutationen auf, die zu den oben beschriebenen dominant-negativen Mutanten führen. In beiden Fällen werden Pflanzen mit einer erhöhten Pathogenresistenz erhalten.

15

Der Fachmann ist sich bewusst, dass durch Mutagenese z.B. auch Pflanzen bzw. Pflanzenzellen hergestellt werden können, die aufgrund von Mutationen in Enhancer- und/oder Promotor-Sequenzen der Gene für endogene ADFs eine Reduktion der Expression dieser Proteine aufweisen und gleichzeitig Mutationen in den kodierenden Bereichen der für endogene ADFs kodierenden Gene aufweisen, die bewirken, dass die verbleibenden exprimierten ADFs nicht mehr oder nur begrenzt mit den pathogenen und/oder anderen zellulären Bindungspartnern interagieren können. Umgekehrt können entsprechende Mutationen in Enhancer- und/oder Promotor-Sequenzen und in den kodierenden Sequenzen bewirken, dass eine oben dargestellte dominant-negative Mutante von endogenen ADFs, die nicht mehr oder nur sehr begrenzt in der Lage ist, mit pathogenen und/oder normalen zellulären Interaktionspartnern wechselzuwirken, überexprimiert wird und es somit zur oben beschriebenen Kompetitionsreaktion kommt.

30

- 78 -

Diese Pflanzen zeichnen sich durch eine erhöhte transiente oder permanente Pathogenresistenz gegenüber den oben genannten Pathogenen aus.

Bevorzugt können die erfindungsgemäßen nicht-transgenen Pflanzen und
5 Pflanzenzellen, die sich durch eine Modulation der Expression und/oder des Bindungsverhaltens der endogenen ADFs auszeichnen und eine permanente oder transiente Pathogenresistenz besitzen, durch den so genannten "TILLING"-Ansatz (Targeting Induced Local Lesion in Genomes) hergestellt werden. Dieses Verfahren ist im Detail in Colbert et al. (2001, *Plant Physiology*, 126, 480 – 484), McCallum et al. (2000, *Nat. Biotechnol.*, 18, 455 – 457) und McCallum et al. (2000, *Plant*
10 *Physiology*, 123, 439 – 442) beschrieben worden. Die vorgenannten Referenzen werden hier explizit als Offenbarung hinsichtlich der "TILLING"-Methode eingeführt.

15 Das TILLING-Verfahren ist eine Strategie der so genannten reversen Genetik, das die Produktion hoher Dichten von Punktmutationen in mutagenisierten Pflanzenkollektionen, z.B. durch chemische Mutagenese mit Ethylmethansulphonat (EMS), mit der schnellen systematischen Identifizierung von Mutationen in Zielsequenzen kombiniert. Zunächst wird die Zielsequenz über PCR in DNA-Pools mutagenisierter
20 M2-Populationen amplifiziert. Denaturierungs- und Annealingsreaktionen der heteroallelischen PCR-Produkte erlauben die Ausbildung von Heteroduplexen, bei denen ein DNA-Strang von dem mutierten und der andere vom „Wildtyp“ PCR-Produkt stammt. An der Stelle der Punktmutation erfolgt ein sogenannter Mismatch, der entweder über denaturierende HPLC (DHPLC, McCallum et al., 2000, *Plant*
25 *Physiol.*, 123, 439-442) oder mit dem *CeII* Mismatch-Detektionssystem (Oleykowsky *et al.*, 1998, *Nucl. Acids Res.* 26, 4597-4602) identifiziert werden kann. *CeII* ist eine Endonuklease, die Mismatches in Heteroduplex-DNA erkennt und spezifisch an diesen Stellen die DNA spaltet. Die Spaltungsprodukte können dann über automatisierte Sequenzierungs-Gelelektrophorese aufgetrennt und detektiert
30 werden (Colbert et al., 2001, *vide supra*). Nach Identifizierung von Zielgen-

spezifischen Mutationen in einem Pool werden individuelle DNA-Proben entsprechend analysiert, um die Pflanze mit der Mutation zu isolieren. Auf diese Weise wird bei den erfindungsgemäßen Pflanzen und Pflanzenzellen nach der Herstellung der mutagenisierten Pflanzenpopulationen durch Verwendung gegen
5 ADF3 bzw ADFs gerichtete Primersequenzen die Identifizierung der mutagenisierten Pflanzenzellen bzw. Pflanzen durchgeführt. Das TILLING-Verfahren ist generell für alle Pflanzen anwendbar und daher sind die oben genannten Kultur- und Nutzpflanzen für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

10 Die Vektoren, die zur Expression bzw. zum Silencing von ADFs verwendet werden, umfassen neben der zu übertragenden Nukleinsäuresequenz weitere regulatorische Elemente. Welche konkreten regulatorischen Elemente diese Vektoren enthalten müssen, hängt dabei jeweils von der Methode ab, die mit diesen Vektoren durchgeführt werden sollen. Über welche regulatorischen Elemente und auch
15 anderen Elemente diese Vektoren verfügen müssen, ist dem Fachmann, der mit den verschiedenen oben erwähnten Verfahren zum Herstellen von transgenen Pflanzen, in denen die Expression eines Proteins unterbunden wird, vertraut ist, bekannt.

Der Begriff "operativ verknüpft" bedeutet, dass die Sequenzen, die die
20 unterschiedlichen verwendeten Nukleinsäuresequenzen miteinander verknüpfen, so ausgewählt sind, dass die Funktion des jeweiligen verknüpften Nukleinsäuresegments erhalten bleibt. Sollen z.B. die kodierenden Sequenzen von ADF3 in einer Zelle exprimiert werden, ist darauf zu achten, dass sich zwischen der Sequenz für den Promotor und der kodierenden Sequenz für ADF3 keine Sequenzen
25 befinden, die zu einer Beendigung der Transkription führen würden.

Typischerweise handelt es sich bei den regulatorischen Elementen, die die Vektoren enthalten, um solche, die die Transkription und, falls erwünscht, Translation in der Pflanzenzelle gewährleisten. Solche Elemente können aber auch eine gezielte
30 Lokalisierung der Proteine in bestimmten Zelltypen bzw. Zellorganellen bewirken.

- 80 -

Dies kann z.B. durch Verwendung von Epidermiszellen-spezifischen Promotoren geschehen.

5 So können die zu übertragenden Nukleinsäuresequenzen beispielsweise unter Kontrolle von in Pflanzen funktionellen Promotoren stehen. Bei diesen Promotoren kann es sich um konstitutive, aber auch induzierbare oder gewebe- bzw. entwicklungs-spezifische Promotoren handeln. Darüber hinaus kann es sich auch um pilzspezifische Promotoren handeln.

10 Typischerweise wird man als Promotor für Vektoren den konstitutiven 35S-Promotor verwenden. Darüber hinaus können natürlich auch weitere Promotoren verwendet werden, die aus unterschiedlichen Quellen wie z.B. aus Pflanzen oder Pflanzenviren erhalten werden und für die Expression von Genen in Pflanzen geeignet sind. Die Auswahl des Promotors wie auch anderer regulatorischer Sequenzen bestimmen
15 dabei das räumliche und zeitliche Expressionsmuster und damit auch die Expression bzw. das Silencing der ADFs in transgenen Pflanzen.

Neben weiteren konstitutiven Promotoren wie beispielsweise dem Actin Promotor (McElroy et al., 1990, *Plant Cell*, 2:163) und dem Ubiquitin Promotor (Binet et al.,
20 1991, *Plant Science*, 79:87) kommen als gewebespezifische Promotoren die Promotoren der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase aus Mais (Hudspeth et al., 1989, *Plant Mol. Biol.*, 12:579) oder der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Kartoffel (WO 98/18940), die blattspezifische Expression vermitteln, in Frage. Es können auch Verwundungs-, Licht- oder Pathogen-induzierte sowie andere entwicklungs-
25 abhängige Promotoren oder Kontrollsequenzen verwendet werden (Xu et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22:573; Logemann et al., 1989, *Plant Cell*, 1:151; Stockhaus et al., 1989, *Plant Cell*, 1:805; Puente et al., 1996, *EMBO J.*, 15:3732; Gough et al., 1995, *Mol. Gen. Genet.*, 247:323). Eine Zusammenfassung von verwendbaren Kontrollsequenzen findet sich z.B. in Zuo et al., 2000, *Curr. Opin. Biotech.*, 11:146.

- Geeignete Promotoren umfassen auch Promotoren, die eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben garantieren, wie z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7943-7947; Stockhaus *et al.* (1989) EMBO J. 8:2445-2451). Ebenfalls verwendet werden können Promotoren, die
- 5 während der Pflanzentransformation, der Pflanzenregeneration oder bestimmten Stadien dieser Prozesse aktiv sind, wie z.B. zellteilungsspezifische Promotoren wie der Histon H3-Promotor (Kapros *et al.* (1993) In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 29:27-32) oder das chemisch induzierbare Tet-Repressor-System (Gatz *et al.* (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237). Weitere geeignete Promotoren können der Literatur, z.B.
- 10 Ward (1993, Plant Mol. Biol. 22:361-366), entnommen werden. Gleiches gilt für induzierbare und zell- bzw. gewebespezifische Promotoren, wie Meristem-spezifische Promotoren, die ebenfalls in der Literatur beschrieben worden sind und im Rahmen der Erfindung ebenfalls geeignet sind.
- 15 Weitere induzierbare Promotoren umfassen virusinduzierbare Promotoren wie den ACMV virion-sense Promotor (Hong *et al.*, 1996, Virology, 220:119-227), der durch das Genprodukt AC2 induziert wird. Darüber hinaus sind alle Promotoren solcher Proteine geeignet, die in Virus-befallenem Gewebe induziert werden, wie z.B. Phenylalanin Ammonium Lyase, Chalcone Synthase, Hydroxyprolin-reiches
- 20 Glykoprotein, Extensin, Pathogenese-verwandte Proteine (z.B. PR-1a) und Wund-induzierbare Protease-Inhibitoren (US 6,013,864).

Darüber hinaus ist der Durchschnittsfachmann in der Lage, mittels Routinemethoden weitere geeignete Promotoren zu isolieren. So kann der Fachmann mit Hilfe gängiger

25 molekularbiologischer Methoden, z.B. Hybridisierungsexperimenten oder DNA-Protein-Bindungsstudien, Speicherorgan-spezifische regulatorische Nukleinsäureelemente identifizieren. Dabei wird z.B. in einem ersten Schritt aus Speicherorganewebe des gewünschten Organismus, aus dem die regulatorischen Sequenzen isoliert werden sollen, die gesamte poly(A)⁺-RNA isoliert und eine

30 cDNA-Bank angelegt. In einem zweiten Schritt werden mit Hilfe von cDNA-Klonen,

- die auf poly(A)⁺-RNA-Molekülen aus einem Nicht-Speicherorgan-gewebe basieren, aus der ersten Bank mittels Hybridisierung diejenigen Klone identifiziert, deren korrespondierende poly(A)⁺-RNA-Moleküle lediglich im Gewebe des Speicherorgans akkumulieren. Anschließend werden mit Hilfe dieser so identifizierten cDNAs Promotoren isoliert, die über Speicherorgan-spezifische regulatorische Elemente verfügen. Dem Fachmann stehen darüber hinaus weitere auf PCR basierende Methoden für die Isolierung geeigneter Speicherorgan-spezifischer Promotoren zur Verfügung.
- 5
- 10 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich um den Promotor des Klasse I Patatin-Gens B33 aus Kartoffel. Weiterhin bevorzugte Promotoren sind solche, die insbesondere in Früchten aktiv sind. Hierzu zählen beispielsweise der Promotor eines Polygalacturonase-Gens, z.B. aus Tomate, der während der Reife von Tomatenfrüchten Expression vermittelt (Nicholass *et al.* (1995) *Plant Mol. Biol.* 28:423-435; dieser Stand der Technik beschreibt die Analyse von Promotor/GUS-Fusionskonstrukten), der Promotor einer ACC-Oxidase, z.B. aus Apfel, der in transgenen Tomaten Reife- und Fruchtspezifität vermittelt (Atkinson *et al.* (1998) *Plant Mol. Biol.* 38:449-460; dieser Stand der Technik offenbart ebenfalls Promotor/GUS-Expressionsanalysen), oder der 2A11-Promotor aus Tomate (van
- 15
- 20 Haaren *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol.* 17:615-630, beschreibt ebenfalls Promotor/GUS-Fusionen).

Auch im Fall von Frucht-spezifischen Promotoren kann der Fachmann weitere geeignete Promotoren der Literatur entnehmen oder, wie oben für Speicherorgan-spezifische Promotoren beschrieben, mittels Routineverfahren isolieren.

25

Der Fachmann weiß, dass die Verwendung von induzierbaren Promotoren die Herstellung von Pflanzen und Pflanzenzellen erlaubt, die die erfindungsgemäßen Sequenzen nur transient exprimieren bzw. transient silencen. Eine solche transiente Expression erlaubt die Herstellung von Pflanzen, die nur eine transiente

30

Pathogenresistenz zeigen. Solch eine transiente Resistenz kann z.B. dann
wünschenswert sein, wenn die Gefahr einer Pathogenkontamination droht und die
Pflanzen deswegen nur für einen bestimmten Zeitraum resistent gegen das Pathogen
sein müssen. Weitere Situationen, in denen eine transiente Resistenz wünschenswert
5 ist, sind dem Fachmann bekannt. Dem Fachmann ist darüber hinaus auch bekannt,
dass er durch die Verwendung nicht stabil in Pflanzenzellen replizierender Vektoren,
die die entsprechenden Sequenzen zur Expression zum Silencing von ADFs tragen,
eine transiente Expression bzw. ein transientes Silencing und eine transiente
Resistenz erzielen kann.

10

Auch sonst kann durch Wahl eines entsprechenden Vektors sichergestellt sein, dass
die Transfektion der transgenen Pflanzen nur transient erfolgt. Welche Vektoren für
eine transiente Transfektion geeignet sind und welche Vektoren für eine stabile
Transfektion verwendet werden müssen, ist dem Fachmann bekannt.

15

Die erfindungsgemäßen Vektoren können als regulatorische Elemente auch noch z.B.
Enhancer-Elemente umfassen, ferner können sie Resistenzgene, Replikationssignale
und weitere DNA-Bereiche enthalten, die eine Propagation der Vektoren in
Bakterien wie z.B. *E. coli* ermöglichen. Die regulatorischen Elemente umfassen auch
20 Sequenzen, die eine Stabilisierung der Vektoren in den Wirtszellen bewirken.
Insbesondere umfassen solche regulatorischen Elemente Sequenzen, die eine stabile
Integration des Vektors in das Wirtsgenom der Pflanze oder eine autonome
Replikation des Vektors in den Pflanzenzellen ermöglichen. Solche regulatorischen
Elemente sind dem Fachmann bekannt.

25

Bei den so genannten Terminationssequenzen handelt es sich um Sequenzen, die
sicherstellen, dass die Transkription bzw. die Translation ordnungsgemäß beendet
wird. Sollen die übertragenen Nukleinsäuren translatiert werden, handelt es sich bei
ihnen typischerweise um Stopcodons und entsprechende regulatorische Sequenzen;

sollen die übertragenen Nukleinsäuren nur transkribiert werden, handelt es sich in der Regel um poly-A-Sequenzen.

Erfindungsgemäß sind mit Vektoren Plasmide, Cosmide, Viren und andere in der Gentechnik gängige Vektoren gemeint, mit denen Nukleinsäuremoleküle auf Pflanzen bzw. Pflanzenzellen übertragen werden können.

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 erhaltende Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet und anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im Allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation können die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden. Klonierungsstandardverfahren können Sambrook et al., 2001 (Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) entnommen werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl bekannter 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 *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als

Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, den direkten Gentransfer isolierter DNA in Protoplasten, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten. Dabei können sowohl stabile als auch transiente Transformanten erzeugt werden.

5

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden per se keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Ähnliches gilt für den direkten Gentransfer. Es können einfache Plasmide wie beispielsweise pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig. Dem Fachmann sind die gängigen Selektionsmarker bekannt und es stellt für ihn kein Problem dar, einen geeigneten Marker auszuwählen. Gebräuchliche Selektionsmarker sind solche, die den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G418, Ampicillin, Bleomycin, Hygromycin, Methotrexat, Glyphosat, Streptomycin, Sulfonyl-Harnstoff, Gentamycin oder Phosphinotricin und dergleichen vermitteln.

10
15

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden beispielsweise 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- und Ri-Plasmid enthaltenen T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

20

Werden für die Transformationen Agrobakterien verwendet, muss die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären oder in einem 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 vir-

25
30

Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen
5 Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA-Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978), Molecular and General Genetics 163, 181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle
10 notwendig. Zusätzlich kann T-DNA vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzelle ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 515 beschrieben worden.

15 Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (beispielsweise Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte
20 Pflanzenzellen) können dann in einem geeignetem Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die Regeneration der Pflanzen erfolgt nach üblichen Regenerationsmethoden unter Verwendung bekannter Nährmedien. Die so erhaltenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen können dann auf Anwesenheit der
25 eingeführten DNA untersucht werden.

Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplasten-Transformation sind dem Fachmann bekannt (vgl. L. Willmitzer (1993) Transgenic Plants in: Biotechnology,

A Multi-Volume Comprehensive Treatise (Herausgeber: H.J. Rehm et al.), Band 2, 627-659, VCH Weinheim, Deutschland).

- 5 Während die Transformation dikotyler Pflanzen bzw. derer Zellen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, dass auch monokotyle Pflanzen bzw. deren Zellen der Transformation mittels auf Agrobakterien basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (siehe u.a. Chan et al. (1993), Plant Mol. Biol. 22, 491-506).
- 10 Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen bzw. deren Zellen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux (1994) Plant Physiol. 104, 37-48; Vasil et al. (1993) Bio/Technology 11, 1553-1558; Ritala et al. (1994) Plant Mol. Biol. 24, 317-325; Spencer et al. (1990), Theor. Appl. Genet. 79, 625-631), die Protoplasten-Transformation, die Elektroporation von
- 15 partiell permeabilisierten Zellen sowie die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986), Plant Cell Reports 5, 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die

20 gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen besitzen die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen,

25 dass das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, dass der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Ebenso können nach üblichen Methoden transgene Linien bestimmt werden, die für

30 die neuen Nukleinsäuremoleküle homozygot sind und ihr phänotypisches Verhalten

hinsichtlich einer vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Pathogen-Responsivität untersucht und mit dem von hemizygoten Linien verglichen werden.

- Selbstverständlich können Pflanzenzellen, die die erfindungsgemäßen
- 5 Nukleinsäuremoleküle enthalten, auch als Pflanzenzellen (einschließlich Protoplasten, Kalli, Suspensionskulturen und dergleichen) weiterkultiviert werden.

Die oben dargestellten Vektoren können auf Pflanzenzellen auf verschiedene Weise übertragen werden. Ob die Vektoren in linearer oder zirkulärer Form vorliegen

10 müssen, hängt von der jeweiligen Anwendung ab. Dem Fachmann ist bekannt, ob und wann er entsprechende linearisierte Vektoren verwenden kann oder nicht. Zum Beispiel weiß der Fachmann, dass zur Herstellung von spezifischen Knock-outs von Genen für ADFs durch homologe Rekombination es ausreichen kann, die entsprechenden Vektoren zu linearisieren und in transgene Pflanzen zu injizieren.

15 Erfindungsgemäß umfasst der Begriff transgene Pflanze sowohl die Pflanze in ihrer Gesamtheit, als auch alle Pflanzenteile, in denen erfindungsgemäß die Expression und/oder Aktivität von ADFs verändert ist. Bei solchen Pflanzenteilen kann es sich um Pflanzenzellen handeln, um Pflanzensamen, um Blätter, um Blüten und um

20 Pollen. Mit "transgener Pflanze" sind erfindungsgemäß auch das Vermehrungsmaterial von erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gemeint wie z.B. Samen, Früchte, Stecklinge, Knollen, Wurzelstücke etc., wobei dieses Vermehrungsmaterial ggf. oben beschriebene transgene Pflanzenzellen enthält, sowie Teile dieser Pflanzen wie Protoplasten, Pflanzenzellen und Kalli.

25 Bei der Herstellung von transgenen Pflanzen bieten sich verschiedene Methoden und Möglichkeiten an, wie bereits oben ausgeführt worden ist. Generell können Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit Hilfe herkömmlicher gentechnologischer Transformationsmethoden derart modifiziert werden, dass die neuen

30 Nukleinsäuremoleküle in das pflanzliche Genom integriert werden, d.h. dass stabile

Transformanten erzeugt werden und die überführten Nukleinsäuremoleküle mit dem pflanzlichen Genom repliziert werden. Je nach dem verwendeten Vektorsystem können erfindungsgemäß auch transgene Pflanzen hergestellt werden, bei denen die zu übertragenden Nukleinsäuren in der Pflanzenzelle bzw. der Pflanze als

5 selbstständig replizierendes System enthalten sind. Die zur Übertragung der Pflanzen verwendeten Vektoren müssen dann entsprechend über DNA-Sequenzen verfügen, die die Replikation von zur Übertragung verwendeten Plasmiden innerhalb der Zelle ermöglichen.

10 Bei den für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Pflanzen kann es sich im Prinzip um jede beliebige Pflanze handeln. Vorzugsweise ist es eine monokotyle oder dikotyle Nutz-, Nahrungs- oder Futterpflanze. Beispiele für monokotyle Pflanzen sind Pflanzen, die zu den Gattungen *Avena* (Hafer), *Triticum* (Weizen), *Secale* (Roggen), *Hordeum* (Gerste), *Oryza* (Reis), *Panicum*, *Pennisetum*, *Setaria*,

15 *Sorghum* (Hirse), *Zea* (Mais) und dergleichen gehören.

Dikotyle Nutzpflanzen umfassen unter anderem Baumwolle, Leguminosen wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen sowie Bäume. Weitere Nutzpflanzen können Obst (ins-

20 besondere Äpfel, Birnen, Kirschen, Weintrauben, Citrus, Ananas und Bananen), Kürbis, Gurke, Wein, Ölpalmen, Tee-, Kakao- und Kaffeesträucher, Tabak, Sisal sowie bei Heilpflanzen *Rauwolfia* und *Digitalis* umfassen. Besonders bevorzugt sind die Getreide Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Reis, Mais und Hirse, Zuckerrübe, Raps, Soja, Tomate, Kartoffel und Tabak. Weitere Nutzpflanzen können dem US-

25 Patent US 6,137,030 entnommen werden.

Bevorzugte Pflanzen sind Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf und Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola.

- 90 -

Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Erfindung betrifft somit ebenfalls Ernteprodukte und Vermehrungsmaterial
5 transgener Pflanzen, die nach einem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden und eine erhöhte Pathogenresistenz aufweisen. Bei den Ernteprodukten und dem Vermehrungsmaterial handelt es sich insbesondere um Früchte, Samen, Blüten, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, etc. Es kann sich auch um Teile dieser Pflanzen wie Pflanzenzellen, Protoplasten und Kalli handeln.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung der vorgenannten Nukleinsäuresequenzen zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz im Sinne der vorliegenden Erfindung.

15 Durch die vorliegende Erfindung ist es erstmals gelungen, neben *Ror1* und *Ror2* mit ADF3 ein weiteres Gen in der Gerste zu identifizieren, das in die durch *mlo*-vermittelte Resistenz involviert ist. Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wie aus den im Folgenden dargestellten Experimenten hervorgeht, gezeigt werden, dass durch die Erhöhung oder Erniedrigung der
20 Expression bzw. der Aktivität von ADF3 in Gerste resistente Gerstepflanzen erhalten werden, die über eine Rasse-unspezifische Resistenz gegenüber verschiedenen Isolaten des Pflanzenpathogens *Blumeria graminis f. sp. hordei* verfügen.

Solche transgenen Pflanzen weisen gegenüber anderen resistenten Pflanzen den
25 Vorteil auf, dass sie nicht nur gegenüber einigen spezifischen Mehltausisolaten resistent sind, sondern gegenüber einer Vielzahl der genannten Mehltausolate, und diese Resistenz auch nicht auf einzelne Gerste-Kultivare beschränkt ist.

Daher betrifft eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden
30 Erfindung transgene Gerstepflanzen bzw. -zellen mit einer erhöhten Resistenz

- 91 -

gegenüber *Blumeria graminis f. sp. hordei*, bei denen der Gehalt und/oder die Aktivität von ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 gegenüber dem Wildtyp verändert ist. Ebenso betreffen besonders bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Herstellung von transgenen Gerstepflanzen

5 bzw. der entsprechenden Zellen, die eine erhöhte Resistenz gegenüber *Blumeria graminis f. sp. hordei* aufweisen, bei denen der Gehalt und/oder die Aktivität an ADF3 mit der SEQ ID No. 1 gegenüber dem Wildtyp verändert ist. Ebenso betrifft eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ADF3 aus der Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodiert

10 sowie funktionell äquivalente Teile und funktionelle oder nicht-funktionelle Mutanten davon. Dasselbe gilt für Nukleinsäuresequenzen, die zu den besonders bevorzugten zuletzt genannten Nukleinsäuresequenzen im Wesentlichen komplementär sind und unter stringenten Bedingungen an diese hybridisieren.

15 Da das *Mlo*-Gen bisher in allen untersuchten Landpflanzen identifiziert wurde und somit auch in anderen Organismen als Gerste wie z.B. *Arabidopsis thaliana* sowie in anderen *Gramineae*-Arten wie z.B. Weizen, Hafer, Mais, Roggen, Reis, Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum, Mais und dergleichen auftritt, kann davon ausgegangen werden, dass der ADF3 aus Gerste als Prototyp für die entsprechenden

20 homologen ADFs aus anderen Pflanzen bei der Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit einer erhöhten Pathogenresistenz fungiert. Bei der jeweiligen Pathogenresistenz kann es sich dabei bevorzugt um eine Resistenz gegen *formae speciales* von *Blumeria graminis* handeln, da dieser Parasitismus auch z.B. bei Weizen, Hafer und Roggen auftritt. Darüber hinaus kann die Verwendung von

25 ADFs zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz auch auf solche Pathogene ausgedehnt werden, die eine funktionelle Interaktion mit dem Actin-Cytoskelett eingehen müssen, um eine effiziente Infektion zu etablieren.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen und Pflanzenzellen können eine permanente oder transiente Pathogenresistenz aufweisen. Die Art der Resistent hängt von den verwendeten Vektoren und angewandten Selektionsmechanismen ab.

- 5 Besonders bevorzugt sind transgene Pflanzen mit einer erhöhten Pathogenresistenz, die ausgewählt sind aus der Gruppe enthaltend Weizen, Gerste, Hafer, Reis, Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum, Mais und dergleichen.

Besonders bevorzugt sind die oben genannten Pflanzen resistent gegen die
10 verschiedenen formae speciales des Mehltauerregers *Blumeria graminis*, wie z.B. die Isolate *Blumeria graminis f. sp. hordei*, *Blumeria graminis f. sp. tritici*, *Blumeria graminis f. sp. avenae*.

Die Identifizierung von ADF3 aus Gerste als ein Faktor, der eine Rasse-
15 unspezifische Resistenz gegen verschiedene Isolate von *Blumeria graminis f. sp. hordei* vermittelt, wird nun im Folgenden dargestellt. Darüber hinaus werden Experimente dargestellt, die die Verwendung von ADF3 zur Herstellung von transgenen Pflanzen bzw. Pflanzenzellen mit erhöhter Resistenz gegen *Blumeria graminis f. sp. hordei* belegen. Diese Experimente dienen lediglich der Illustrierung
20 der allgemeinen Aspekte der vorliegenden Erfindung und sind in keiner Weise ausschließend zu deuten.

Experimente

25

1. Identifizierung von ADF3 aus Gerste

Die Identifizierung von Faktoren, die in den durch *mlo*-vermittelten Rasse-
unspezifischen Resistenz-Mechanismus in Gerste verwickelt sind, ist üblicherweise
30 anhand von Mutations-Screeningverfahren durchgeführt worden (Freialdenhoven et

al., vide supra). Dabei wird von Gerstekultivaren ausgegangen, die über *mlo*-Allele verfügen und resistent gegen Isolate von *Blumeria graminis f. sp. hordei* sind. Die Identifizierung von Faktoren, die mit dem *Mlo*-Locus interagieren, erfolgt dadurch, dass auf Pflanzen selektioniert wird, die nach der Mutagenese trotz eines *mlo*-
5 Genotyps für eine Infektion mit Isolaten von *Blumeria graminis f. sp. hordei* sensitiv sind. Der Nachteil dieser Identifikationsmethoden liegt darin, dass sie in einem erheblichen Ausmaß von der Sensitivität und der Stringenz des Screeningverfahrens zum Nachweis eines modifizierten Infektionstyps abhängen. Dieser Umstand sowie die Tatsache der genetischen Redundanz von verschiedenen *Gramineae*-Arten kann
10 die Erklärung dafür sein, dass es bisher nicht gelungen ist, weitere Bestandteile des *mlo*-vermittelten Rasse-unspezifischen Mechanismus zu identifizieren.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde daher ein komplett anderer Ansatz zur Identifizierung von Faktoren, die die *mlo*-vermittelte Resistenz in Gerste
15 beeinflussen, gewählt. Dazu wurde ein auf doppelsträngiger RNA interference basierendes Screeningverfahren durchgeführt, durch das Gene identifiziert werden sollten, die die Breitbandresistenz, wie sie durch rezessive "Loss of Function" *mlo*-Allele vermittelt wird, beeinflussen.

20 Damit wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Screeningverfahren verwendet, mittels dem es möglich ist, durch RNAi sämtliche Allele eines Gens spezifisch auszuschalten. Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek verwendet, die Epidermis-spezifische cDNA aus Gerste enthielt und von Dr. Patrick Schweizer (IPK Gatersleben, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurde.

25

Die Herstellung einer solchen Epidermis-spezifischen cDNA-Bibliothek aus Gerste erfolgt dabei folgendermaßen:

Bibliothek: HO
30 Pflanze: *Hordeum vulgare*

- 94 -

Sorte: Ingrid BC mlo5

Gewebe: Epidermis wurde von 7 Tage alten Pflanzen, die mit *Blumeria graminis hordei* oder *tritici* beimpft worden waren, 6 und 24 h nach der Beimpfung abgezogen

5

kompetente Zellen: XL10_Gold von Stratagene

Vector: pBluescript SK+

Insertionsstellen: EcoRI (5'-Ende der cDNA), XhoI (3'-Ende der cDNA)",

Selektion der transformierten Zellen: Ampicillin

10

Die cDNA Bank wurde mit einem Kit von Stratagene erstellt (pBluescriptII XR cDNA Library Construction Kit, Katalog Nr. 200455). Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte mit Ampicillin.

15 Die so isolierten cDNA-Fragmente wurden dann mittels der Gateway[®]-Technologie der Firma Invitrogen in den Vektor pUAMBN kloniert. Die Verwendung der Gateway[®]-Technologie ist im Detail in Walhout et al. beschrieben (Walhout et al. (2000) "GATEWAY recombinational cloning: Application of the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes", in Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins, San Diego: ACADEMIC PRESS Inc., pp 575-592).

20

Die cDNA-Fragmente wurden mittels PCR durch Gateway[®]-kompatible Oligonukleotide mit folgenden Sequenzen amplifiziert:

25 HO-attB-For: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG TGG
ATC CCC CGG GCT GCA GG-3'

Die unterstrichene Sequenz ist für die cDNA-Bibliothek spezifisch.

- 95 -

HO-attB-Rev: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT AGG
GCG AAT TGG GTA CCG GG-3'

Die unterstrichene Sequenz ist für die cDNA-Bibliothek spezifisch.

5

Anschließend wurden diese amplifizierten PCR-Fragmente in den Vektor pDONR (Invitrogen) durch die BP-Rekombination gemäß der Gateway[®]-Technologie inseriert und anschließend in den Vektor pUAMBN durch LR-Rekombination gemäß der Gateway[®]-Technologie transferiert.

10

Die Klonierung erfolgte im Detail folgendermaßen:

1. Kolonie-PCR (je 50 µl in 96er well) aus HO-Bibliothek

15

2. von diesen PCR-Reaktionen wurden je 1µl in 4 µl BP-Gateway-Reaktion eingesetzt:

20

- 1 µl DNA (ca. 75 ng)
- 1 µl Vektor pDonr201 (ca. 75 ng)
- 1 µl BP-Reaktionspuffer
- 1 µl BP-Enzym
- 1 µl H₂O

25

Die Mirotiterplatten wurden 24 h bei RT inkubiert; die kompletten Ansätze wurden in 50 µl chemokompetente *E.coli* (DH5α) transformiert (1 Std. 4° C; 2 Min. 42° C); die kompletten Transformationen wurden auf LB-Kan ausplattiert

- 96 -

3. dann wurden Kolonien gepickt und in Mikrotiterplatten angezogen und Millipore 96er Minipräparation hergestellt. Die DNA wurde in 50 µl aufgenommen

- 5 4. je 1 µl der Minipräparationen wurde in 4 µl LR-Reaktion eingesetzt
 - 1 µl DNA (ca. 75 ng)
 - 1 µl Vektor pUAMBN (ca. 75 ng)
 - 1 µl LR-Reaktionspuffer
 - 10 • 1 µl LR-Enzym
 - 1 µl H₂O

Die Mikrotiterplatten wurden 24 h bei RT inkubiert; die kompletten Ansätze wurden in 50 µl chemokompetente *E.coli* (DH5α) transformiert (1 Std. 4° C; 15 2 Min. 42° C); die kompletten Transformationen wurden auf LB-Amp ausplattiert

5. dann wurden Kolonien gepickt und in Mikrotiterplatten angezogen und Millipore 96er Minipräparation hergestellt. Die DNA wurde in 50 µl 20 aufgenommen

Der pUAMBN-Vektor hat einen Polyubiquitin-Promotor aus Mais, dem zwei Gateway[®]-Rekombinationskassetten in entgegengesetzter Orientierung folgen, die durch das dritte Intron des Gerste *Mla1*-Resistenzgens getrennt werden (siehe Abb. 25 2).

Durch diese Anordnung des Vektors ist gewährleistet, dass sich die durch PCR amplifizierten Fragmente in sense- und antisense-Richtung im Vektor befinden. Da das gleiche PCR-Fragment einmal in sense- und antisense-Richtung in den Vektor

kloniert wird, entsteht nach der Transfektion des Vektors in die Pflanzenzelle und Expression der Sequenzen ein doppelsträngiges Oligonukleotidmolekül, das in der Lage ist, in den Pflanzen eine RNAi-Antwort auszulösen.

- 5 Für die biolistische Transfektion wurde das Particle Delivery System Biolistic® PDS-1000/He (BioRad) verwendet. Das Verfahren wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden Goldpartikel mit der entsprechenden DNA beschichtet. Zur Beschichtung der Goldpartikel wurden typischerweise 5 µl DNA (1 µg/µl), 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 20 µl 0,1 M Spermidin auf vorpräparierte Goldpartikel gegeben.
- 10 Die Partikel wurden dann mittels einer Tischzentrifuge pelletiert und mit 140 µl 70% Ethanol und 140 µl 100% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beschichteten Goldpartikel in 48 bis 60 µl 100% Ethanol resuspendiert. Anschließend wurden die Epidermiszellen gemäß den Herstellerangaben mit den beschichteten Partikeln beschossen.
- 15 Zur Transfektion mit dem GUS-Reporterplasmid wurde der so genannte Single-Cell Transient Expression Assay, wie er von Shirasu et al. beschrieben wurde, verwendet (Shirasu et al. (1999), *Plant J.*, 17, 293 – 299). Dazu wurde das Reporterplasmid, das das GUS-Gen enthielt, auf Goldpartikel beschichtet. Die Beschichtung und
- 20 Bombardierung der Blätter wurde wie oben dargestellt durchgeführt. Die beschossenen Blätter wurden auf 1%ige Agar-Platten, die mit 8% mM Benzimidazol versetzt waren, transferiert und bei 18°C für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Blätter bezüglich GUS-Aktivität angefärbt und mikroskopisch untersucht.
- 25 Das GUS-Konstrukt ist in Nielsen et al. beschrieben (Nielsen et al. (1999) *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 54, 1 – 12).
- In Experimenten, in denen die dsRNAi-Konstrukte zusammen mit den GUS-
- 30 Konstrukten transfiziert wurden, wurden die entsprechenden DNA-Konstrukte vor

der Beschichtung auf die Goldpartikel vermischt. Die Experimente wurden dann entsprechend durchgeführt.

- 5 Gruppen von jeweils fünf doppelsträngigen RNAi (dsRNAi)-Konstrukten, die jeweils ein Gerstegen in Form von "inverted repeats" in der oben beschriebenen Weise in pUAMBN enthielten, wurden zusammen mit einem Plasmid, das die konstitutive Expression des Reporterproteins β -Glucuronidase (GUS) vermittelt, in die Epidermis-Zellen von einzelnen Gerstebältern transfiziert.
- 10 Anschließend wurden die transformierten Proben mit *Blumeria graminis f. sp. hordei* (*Bgh*) 96 Stunden nach der ballistischen Transfektion beimpft. 48 Stunden nach der Beimpfung wurden die Blätter hinsichtlich GUS-Aktivität gefärbt und einzelne transformierte Epidermiszellen, die mit *Bgh*-Sporen beimpft worden waren, wurden mikroskopisch hinsichtlich des Penetrationserfolges des Pilzes untersucht. Bei den
- 15 Gerstekultivaren, die mit den zwei genannten Vektoren transfiziert wurden, handelte es sich sowohl um den *Mlo*-Wildtyp als auch um Mehltau-resistente *mlo*-Genotypen, sowie Genotypen, die eine Rasse-spezifische Resistenz gegen bestimmte Mehltau-Isolate verleihen (*Mla1*, *Mla6*, *Mla12*, *Mlg*).

- 20 Es wurden folgende Gerste-Kultivare verwendet:

Kultivar Golden Promise (*Mlo*) : Max Planck Institut, Köln

Kultivar I10 (*Mla12*) : near isogenic to cv Ingrid

Kultivar BCPallas*Mla1*

- 25 Kultivar BCPallas*Mla6*

Kultivar BCPallas*Mlg*

Kultivar BCIngrid*mlo5*

Kultivar BCIngrid*mlo3*

- 30 Es wurden folgende Mehltau Isolate verwendet:

Blumeria graminis f.sp. *hordei* K1

Blumeria graminis f.sp. *hordei* A6

Blumeria graminis f.sp. *tritici* JIW2

5

Bei dieser Vorgehensweise kann ein Gen, dessen Expression durch das dsRNAi-Konstrukt gesilencet wird, dann als Teil des *Mlo*-Rasse-unspezifischen Resistenzmechanismus angesehen werden, wenn es in dem resistenten *mlo*-Genotyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem *Bgh*-Erreger bewirkt, aber die Rasse-spezifische Resistenz in den *Mla1*-, *Mla6*-, *Mla12*-, *Mlg*-Genotypen nicht beeinflusst.

10

Der Penetrationserfolg wird dabei mikroskopisch untersucht, indem z.B. das Ausmaß der Haustorienbildung beobachtet wird.

15 Auf diese Weise konnte das Gerstegen, das im Folgenden als ADF3 oder *HvADF3* benannt wird, identifiziert werden. Dieses Gerstegen wies eine hohe Aminosäuresequenzähnlichkeit zu den bereits früher beschriebenen Actin-depolymerisierenden Faktoren aus *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* auf. Der ADF3 aus Gerste hat die Sequenz mit der SEQ ID No. 1. Ein Sequenz-Alignment

20 mit anderen ADFs aus *Arabidopsis thaliana* ist in Abb. 1 gezeigt.

20

Es wurden die folgenden Penetrationsraten beim Silencing der Expression von ADF3 beobachtet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichungen von drei von einander unabhängigen Versuchen:

25

BCIngrid <i>mlo3</i> :	Penetrationsrate 17 % ± 1 %	Kontrolle: 0 % ± 1 %
BCIngrid <i>mlo5</i> :	Penetrationsrate 15 % ± 3 %	Kontrolle: 0 % ± 0 %
Golden Promise (<i>Mlo</i>):	Penetrationsrate 27 % ± 1 %	Kontrolle: 13 % ± 1 %

30

- 100 -

2. Interaktionen von *HvADF3* mit dem Actin-Cytoskelett

Eine genaue Untersuchung der Auswirkungen sowohl der Überexpression als auch des Silencing von *HvADF3* auf das Actin-Cytoskelett zeigte, dass sowohl die
5 Überexpression als auch das Silencing zu einem beinahe kompletten Verlust an Phalloidin-färbbaren Actin-Filamenten führt.

Für dieses Experiment wurden Blatt-Epidermiszellen von Gerste mit einem Plasmid transfiziert, das dsRED (RFP) exprimiert, um die transfizierten Zellen zu kenn-
10 zeichnen. Zusätzlich wurde in manchen Experimenten eine konstitutiv aktive Variante von *HvADF3*, die eine S⁶A-Aminosäuresubstitution trägt, die das Protein für eine N-terminale Phosphorylierung unzugänglich macht, exprimiert. Eine entsprechende Mutante wurde für ADF3 aus Mais beschrieben (Smertenko et al., Plant J 14, 187-193.)

15

Zur Herstellung der *HvADF3*-(S⁶A)-Mutante wurde ein PCR-Mutagenese-Verfahren verwendet:

Primer: *HvADF3*-CA-F (hat *Hind*III-Stelle sowie Mutation Ser6 → Ala6):

20 5'-TTT AAG CTT GCC ACC ATG GCA AAC GCT TCA GCA GGT GCT GGG-3'

Primer: *HvADF3*-CA-R (hat *Mlu*I-Stelle):

5'-GTT ACG CGT CTA GTG TGC GCG CTC CTT GA-3'

25 Der Serin⁶ gegen Alanin⁶-Austausch wurde durch Design der entsprechenden Primer in das Wildtyp-Gen von *HvADF3* eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und in den Überexpressionvektor pUbi-MCS-Nos ligiert, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen worden war.

30

- 101 -

Der resultierende Überexpressionvektor (pHvADF3-CA, Abb. 3) besitzt einen Mais Polyubiquitin Promotor (pUbi), das mutierte *HvADF3*-Gen (*HvADF3-CA*) und eine Nopaline Synthase Transkriptions-Terminationssequenz (NOS).

- 5 Zur Herstellung der Silencing-Vektoren wurde die Sequenz von *HvADF3* (SEQ ID No. 45) mit spezifischen Gateway Primern amplifiziert und mit Hilfe der Gateway-Technologie in den Vektor pUAMBN (siehe oben) rekombiniert. Folgende Primer wurden verwendet:

- 10 Primer *HvADF3*-Gate-F (verfügt über attB1-Region):

5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT GCC ACC ATG GCA
AAC GCT TCA TCA GG-3'

- 15 Primer *HvADF3*-Gate-R (verfügt über attB2-Region):

5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT AGT GTG CGC GCT
CCT TGA -3'

- 20 *HvADF3* spezifische Sequenzen sind unterstrichen.

Diese Vektoren wurden dann wie oben beschrieben zur Transfektion der Pflanzen verwendet.

- 25 Der dsRED Vektor (pUbi-RFP-Nos, Abb. 4) besitzt einen Mais Polyubiquitin Promotor (pUbi), das kodierende Gen für das rot fluoreszierende Protein (*Discosoma* sp. fluorescent protein FP583; RFP) und eine Nopaline Synthase Transkriptions-Terminationssequenz (NOS). Die GenBank Accessionnummer für RFP ist AF168419.

Die Experimente wurden in BCIngrid*mlo5* durchgeführt.

Wenn kein zusätzliches *HvADF3* (S^6A) exprimiert wurde, konnten gefärbte Actinfasern sowohl innerhalb der bombardierten Zelle als auch in den benachbarten
5 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5 a). Dagegen konnten bei der gleichzeitigen Expression von dsRED sowie *HvADF3* (S^6A) anfärbbare Actinfasern nur in den benachbarten, aber nicht in den bombardierten mit dsRED-markierten Zellen nachgewiesen werden, unabhängig davon ob *HvADF3* gesilencet (siehe Abb. 5 b) oder überexprimiert wurde (siehe Abb. 5 c).

10

Um die *HvADF3*-Funktion in Gerste weiter zu untersuchen, wurde die Auswirkung der Überexpression oder des Silencings von *HvADF3* auf die Mobilität von Peroxisomen untersucht. Für Peroxisomen ist bekannt, dass sie entlang Actinfilamenten bewegt werden (Mathur (2002) Plant Physiology, Vol. 128, 1031 –
15 1045). Gerste-Peroxisomen wurden dabei durch die Co-Transformation eines Plasmids, das eine Variante des Green Fluorescent Protein (GFP) mit einer peroxisomalen Targetingsequenz exprimiert (Mathur et al., vide supra), visualisiert. Dabei wurden Blatt-Epidermiszellen von Gerste entweder nur mit dem GFP-Konstrukt oder zusammen mit der bereits erwähnten Mutante von *HvADF3* (S^6A)
20 transfiziert. Die Expression dieser Mutante entspricht einer Erhöhung des Gehalts und der Aktivität an ADF3.

Mit Hilfe der PCR-Methode wurde C-terminal an das grün fluoreszierende Protein eine so genannte Peroxisomen-Zielsequenz (PTS) fusioniert. Diese besteht aus den
25 drei Aminosäuren Serin (S), Arginin (R) und Leucin (L) (Jedd, G. et al. (2002) Plant Cell Physiol 43, 384-392).

Primer GFP-F (hat *Hind*III-Stelle und bindet in GFP-Sequenz):

5'-GCG AAG CTT GCC ACC ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3'

30

- 103 -

Primer GFP-PTS-R (hat zusätzliche PTS und *Mlu*I-Stelle, bindet in GFP-Sequenz):
5'-AAG ACG CGT TTA GAG GCG GGA CTT GTA CAG CTC G-3'

Die PCR wurde mit einer GFP-Sequenz als Template durchgeführt.

5

Das PCR Produkt wurde mit den oben angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und in den Überexpressionsvektor pUbi-MCS-Nos ligiert, der zuvor mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenen worden war.

10 Der GFP-Peroxisomen-Zielsequenz-Vektor (pGFPTS, Abb. 6) besitzt einen Mais Polyubiquitin Promotor (pUbi), das kodierende Gen für das grün fluoreszierende Protein inklusive der Peroxisomen-Zielsequenz (GFPTS) und eine Nopaline Synthase Transkriptions-Terminationssequenz (NOS).

15 Die Überexpression von *HvADF3* wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Silencing-Experimente wurden ebenfalls wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Überexpression, aber auch das Silencing (Daten nicht gezeigt) von *HvADF3* bewirkte eine drastische Verlangsamung oder sogar einen kompletten Stopp der
20 peroxisomalen Bewegung und führte häufig zur Bildung von peroxisomalen Aggregaten (siehe Abb. 7). Während sich bei der Kontrolltransfektion mit GFP alleine GFP-markierte Peroxisomen konstant innerhalb der bombardierten Zelle bewegen (siehe Abb. 7 a), ist die Bewegung der Peroxisomen bei Co-Expression von *HvADF3* (S⁶A) wesentlich verlangsamt, und es kommt schließlich zu einer
25 Aggregation der Peroxisomen (siehe Abb. 7 b).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Überexpression und ebenso das Silencing von *HvADF3* zu einem Verlust an Phalloidin-färbaren Actin-Filamenten des Cytosekeletts führt, was zur Folge hat, dass intrazelluläre durch Actin-Filamente
30 vermittelte Transportprozesse beeinträchtigt sind.

3. Resistenz von Pflanzen, die bezüglich des Gehalts bzw. der Aktivität von *HvADF3* gegenüber dem Wildtyp verändert sind

5

Die oben beschriebene Beeinträchtigung der intrazellulären Transportmechanismen in Folge der Überexpression oder des Silencing von *HvADF3* kann zur Konsequenz haben, dass Transport-abhängige Verteidigungsmechanismen wie z.B. die Vesikelanhäufung an Infektionsstellen der Grund dafür sein könnten, dass in den Experimenten, die zur Identifizierung von *HvADF3* führten, eine erhöhte Penetrationsrate in eigentlich resistenten *mlo*-Genotypen beobachtet wurde. Es wurde daher untersucht, ob die Überexpression oder das Silencing von *HvADF3* ebenfalls zu einer Rasse-unspezifischen Resistenz gegen verschiedene *Bgh*-Isolate führt.

15 Daher wurden Zellen untersucht, die mit *HvADF3* Überexpressions-Konstrukten transfiziert worden waren.

Eine genaue Analyse solcher transfizierten Zellen ergab, dass die Entwicklung des Pathogens zu späteren Zeitpunkten entweder arretiert oder zumindest erheblich verlangsamt war. Während 72 Stunden nach der Infektion die Entwicklung von Pilzstrukturen in Stomatazellen, die sich in der Nähe der transfizierten Zellen befanden, normal erschien, waren die Pilzstrukturen von Sporen, die die transfizierten Zellen attackierten, nur gering entwickelt. Dabei muss beachtet werden, dass Stomatazellen eine verbleibende Empfindlichkeit für Mehltauinfektion auch in *mlo*-Genotypen behalten.

Für diese Experimente wurden Blatt-Epidermiszellen von Gerste mit einem Plasmid für den GUS-Reporter zusammen mit einem Plasmid, das für *HvADF3* (*S⁶A*) kodiert, wie oben beschrieben ko-transfiziert. Vier Stunden nach dem Bombardement wurden die Blätter mit *Bgh*-Konidien infiziert und 22 Stunden nach der Beimpfung wurden

- 105 -

die Blätter hinsichtlich GUS-Aktivität und Pilzstrukturen gefärbt. Die Abbildungen 8 a und b zeigen die Pilzentwicklung in einer transfizierten Blatt-Epidermiszelle. Die Abb. 8 c zeigt die Pilzentwicklung in einer Stomatazelle. Die Expression von HvADF3(S⁶A) entspricht einer Überexpression von HvADF3. Die Experimente
5 wurden in BCIngridmlo5-Pflanzen durchgeführt.

Wie man aus den Abbildungen 8 a, b und c erkennt, kann der Pilz bei Zellen, in denen *HvADF3* überexprimiert wird, nur sehr kurze Hyphen bilden, was die Etablierung einer nachhaltigen Infektion verhindert. Dagegen werden die
10 Pilzstrukturen in Stomatazellen, die nicht transfiziert wurden, voll ausgebildet (siehe Abb. 8 c). Es sieht daher so aus, dass das pilzliche Pathogen zwar zunächst von dem beeinträchtigten Actin-Cytoskelett des Wirts bei der erfolgreichen Zellwandpenetration profitiert, aber eine erfolgreiche Infektion nicht etablieren kann, da offensichtlich intakte Actin-Filamente für die Aufrechterhaltung einer
15 kompatiblen Interaktion notwendig sind. Somit kann durch Erhöhung bzw. Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität von ADF3 in Gerste eine Rasseunspezifische Resistenz gegen verschiedene *Bgh*-Isolate erreicht werden.

Die vorstehend beschriebenen Experimente beruhen alle auf einer transienten
20 Expression mittels Particle Bombardement. Die dadurch gewonnen Ergebnisse lassen sich jedoch ohne weiteres auf stabil transformierte transgene Pflanzen übertragen, bei denen die Expression von ADFs dauerhaft gesteigert oder reduziert ist. Stabil transformierte Pflanzen können z.B. wie nachfolgend beschrieben hergestellt werden.

25 Die in SEQ ID No. 11 angegebene Nukleinsäuresequenz für ADF 3 aus *Arabidopsis thaliana* kann durch folgende Primer amplifiziert werden:

Fra224 atggctaatgcagcatcagg

- 106 -

Fra 255 tcaattggctcggcctttga

Zur Transformation wird das erhaltene Fragment in einen binären Vektor kloniert. Vorher erfolgt eine Subklonierung in den Vektor pCR®2.1 TOPO (Invitrogen, 5 Karlsruhe), aus dem das Gen mit den Enzymen *EcoRV* und *HindIII* wieder ausgeschnitten werden kann (siehe Abb. 9). Die überhängenden Enden werden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt.

Für die konstitutive Expression von AtADF3 wird das oben hergestellte Fragment in 10 den mit *SmaI* geöffneten, dephosphorylierten binären Vektor pSUN2 ligiert (siehe Abb. 10).

Um auch die pathogen-induzierbare Expression von AtADF3 zu ermöglichen, wird dieses mit *BglIII* und *XbaI* aus pSUN2 ausgeschnitten und in den Vektor Lo215 15 ligiert. Dieser Vektor enthält bereits den Thi2.1-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. L41244; Epple, P., Apel, K. and Bohlmann, H. (1995) An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109 (3), 813-820), der durch Pathogenbefall induziert wird, was über ein nachgeschaltetes GUS-Gen bereits 20 gezeigt wurde. AtADF3 wird an die Stelle des vorhandenen GUS-Gens kloniert, indem dieses mit *SacI* und *SmaI* aus dem Vektor ausgeschnitten, der Vektor dephosphoryliert und aufgefüllt und das AtADF3-Fragment in den Vektor ligiert wird. Über eine homologe Rekombination (Gateway®-Reaktion, Invitrogen, Karlsruhe) wurde das Promotor-Gen Konstrukt anschließend in den binären Vektor 25 Lo123 umklont (siehe Abb. 11).

Die Transformation wird nach der Floral-Dip-Methode (modifiziert nach Clough und Bent, 1998) durchgeführt. Die Samen werden nach dem Ernten über Nacht mit Chlorgas sterilisiert und anschließend auf Selektionsplatten ausgelegt. Die 30 Antibiotikazugabe erfolgt in Abhängigkeit vom pflanzlichen Resistenzmarker. Bei

pSUN2 wird BASTA zugesetzt, bei Lo123 wird Kanamycin zugegeben. Die Samen werden nach der Sterilisation auf den Selektionsplatten ausgelegt und zur Stratifizierung zwei Tage bei 4 °C im Kühlraum aufbewahrt. Danach werden sie unter Kurztagbedingungen weiter beobachtet. Nach etwa 10 Tagen kann die erste Selektion der Pflanzen durchgeführt werden. Nicht-transgenen Pflanzen bleichen während Selektion aus, während die transgenen Pflanzen, die das entsprechende Resistenz-Gen besitzen, grün bleiben. Die Pflanzen, die nach der ersten Selektion grün bleiben, werden ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen selektiert. Die Pflanzen, die auch während der zweiten Selektion nicht ausbleichen, können dann auf Erde umgesetzt werden. Die Pflanzen werden geselbstet und die resultierenden T2-Samenpopulationen der phytopathologischen Analyse unterworfen.

Zur Analyse der Resistenz der transgenen *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gegenüber pathogenen Pilzen werden Inokulationen mit den biotrophen Oomyceten bzw. Pilzen *Peronospora parasitica* und *Erysiphe cichoracearum* vorgenommen.

a) Infektion mit *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.

b) Infektion mit *Erysiphe cichoracearum*

Der biotrophe Mehltau-Pilz wird auf *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen kultiviert. Zur Infektion der 4 Wochen alten transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen werden mit einem
5 feinen Pinsel Konidienträger auf der Oberfläche der Blätter abgenommen und auf die Blätter der transgenen 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.

10

c) Ergebnisse

Die transgenen *Arabidopsis* Pflanzen, die *AtADF3* konstitutiv oder pathogen-induzierbar exprimieren, zeigen sowohl gegen *Peronospora parasitica* als auch
15 gegen *Erysiphe cichoracearum* eine signifikant erhöhte Resistenz im Vergleich zu nicht-transgenen Wildtyp-Pflanzen zeigen.

Abbildungslegende

Abb. 1:

- 5 Abb. 1 zeigt ein Sequenz-Alignment von *HvADF3* sowie verschiedenen ADFs aus *Arabidopsis thaliana* (siehe auch Tabelle 7)

Abb. 2:

- 10 Abb. 2 zeigt den Vektor pUAMBN, der für das dsRNAi-basierte Silencing in Epidermiszellen von Gerste verwendet wurde. Ubi, Mais Polyubiquitin Promotor; attR1 und attR2, Gateway Rekombinationsstellen; ccdB, negativer Selektionsmarker; nos, *Agrobacterium tumefaciens* Nopaline Synthase transkriptioneller Terminator.

Abb. 3:

- 15 Abb. 3 zeigt den Vektor pHvADF3-CA.

Abb. 4:

Abb. 4 zeigt den Vektor pUbi-RFP-nos.

20 Abb. 5:

- Abb. 5 zeigt die Visualisierung des Actin-Cytoskeletts in transfizierten einzelnen Epidermisblattzellen von Hafer durch Phalloidin-Färbung. Die Zellen wurden mit einem Plasmid transfiziert, das dsRED (RFP) exprimierte, um bombardierte Zellen zu markieren. Wenn kein zusätzliches Gen exprimiert wurde (Kontrolle, **A**), waren gefärbte Actin-Fasern innerhalb der markierten Zellen sowie in benachbarten Zellen detektierbar. Sowohl im Fall von dsRNAi-basiertem Silencing von *HvADF3* (**B**) als auch im Fall der Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von *HvADF3*, die eine S⁶A-Aminosäuresubstitution trägt, die eine N-terminale Phosphorylierung des Proteins verhindert (**C**), waren Actin-Fasern nur in den benachbarten Zellen, aber
30 nicht in den durch dsRED-markierten Zellen sichtbar.

Abb. 6:

Abb. 6 zeigt den Vektor pGFPTS.

5 Abb. 7:

Abb. 7 zeigt die Bewegung von GFP-markierten Peroxisomen in einzelnen Blattepidermiszellen von Gerste. Ein Plasmid, das eine GFP-Variante mit einer C-terminalen peroxisomalen Targetingsequenz kodierte, wurde entweder alleine (**A**, Kontrolle) oder zusammen mit einem Plasmid, das eine "konstitutiv aktive" Variante von HvADF3, die eine S⁶A-Aminosäuresubstitution trägt (**B**), exprimiert. Während sich in den Kontrolltransfektionen (**A**) GFP-markierte Peroxisomen konstant innerhalb der bombardierten Zellen bewegten, waren die Peroxisomen bei Co-Expression der konstitutiv aktiven Variante von HvADF3 (**B**) verlangsamt und aggregierten schließlich.

15

Abb. 8:

Abb. 8 zeigt, dass die Überexpression von HvADF3 die Entwicklung des Pilzes inhibiert. Blattepidermiszellen von Gerste wurden mit GUS (β -Glucuronidase)-Reporterplasmiden und einem Plasmid transfiziert, das die ektopische Expression einer konstitutiv aktiven Variante von HvADF3 (die eine S⁶A-Aminosäuresubstitution trägt) bewirkt. 4 Stunden nach der Bombardierung wurden die Zellen mit *Bgh*-Konidiosporen beimpft und 72 Stunden nach der Beimpfung wurden die Blätter auf GUS-Aktivität und pilzliche Strukturen gefärbt. **A**, **B**, die pilzliche Entwicklung einer transfizierten Blattepidermiszelle. **C**, die pilzliche Entwicklung einer erfolgreich befallenen Stomatazelle.

25

Abb. 9:

Abb. 9 zeigt den Vektor pCR2.1 TOPO mit inseriertem *AtADF3*-Gen.

30 Abb. 10:

- 111 -

Abb. 10 zeigt den Vektor pSUN2 mit inseriertem *AtADF3*-Gen.

Abb. 11:

Abb. 11 zeigt den Vektor Lo123 mit inseriertem *AtADF3*-Gen.

5

P A T E N T A N S P R Ü C H E

5

1. Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens einem Actin-depolymerisierenden Faktor (ADF) in den Pflanzen bzw. Pflanzenzellen gegenüber dem Wildtyp verändert wird.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich um mindestens einen ADF, bevorzugt aus Pflanzen, besonders bevorzugt aus Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais, Panicum, Pennisetum, Setavia, Sorghum und/oder *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt um ADF3 aus Gerste, oder um ADFs handelt, die zu den genannten ADFs im Wesentlichen funktionell homolog sind.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich um die ADFs mit den SEQ ID Nos 1 bis 44 aus Tabelle 5, bevorzugt um den ADF mit der SEQ ID No. 1, oder um ADFs mit Sequenzen handelt, die zu den Sequenzen der genannten ADFs im Wesentlichen funktionell homolog sind.

20

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich um einen ADF handelt, der die Konsensussequenzen SEQ ID No. 89, 90 und/oder 91 aufweist.

25

- 113 -

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass der ADF-Gehalt und/oder die ADF-Aktivität durch
Übertragung mindestens einer Nukleinsäure, die für mindestens einen ADF oder
einen funktionell äquivalenten Teil und/oder Mutante davon kodiert, auf die Pflanze
5 bzw. Pflanzenzelle erhöht wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung eines Vektors umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in
5'-3'-Orientierung:
- 10 - eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz, die für mindestens einen
ADF oder funktionell äquivalente Teile oder Mutanten davon kodiert,
 - operativ damit verknüpft eine in Pflanzen funktionelle
Terminationssequenz
- 15 b) Übertragung des Vektors aus Schritt a) auf eine Pflanzenzelle und
gegebenenfalls Integration in das pflanzliche Genom.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens
20 einem endogenen ADF im Vergleich zum Wildtyp geändert wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens
einem endogenen ADF durch Beeinflussung der Transkription und/oder Translation
25 erhöht wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens
einem endogenen ADF durch Beeinflussung der posttranslationalen Modifikationen
30 erhöht wird.

- 114 -

10. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens einem endogenen ADF durch Übertragung von Nukleinsäuremolekülen umfassend
5 Sequenzen, die identisch, homolog oder komplementär zu den Sequenzen sind, die für die endogenen ADFs oder Teile davon kodieren, auf Pflanzenzellen erniedrigt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10,
10 **dadurch gekennzeichnet**, dass der Teil der übertragenen Nukleinsäuresequenzen, der identisch, homolog oder komplementär zu den für endogene ADFs oder Teilen davon kodierenden Sequenzen ist, 20 bis 1000 Nukleotide, 20 bis 750 Nukleotide, bevorzugt 20 bis 500 Nukleotide, ebenfalls bevorzugt 20 bis 250 Nukleotide, besonders bevorzugt 20 bis 150 Nukleotide, insbesondere bevorzugt 20 bis 100
15 Nukleotide und am meisten bevorzugt um die 20-50 Nukleotide umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, dass ein Teil der übertragenen Nukleinsäuresequenzen mindestens zu 50%, bevorzugt mindestens zu 60%, ebenfalls bevorzugt mindestens
20 zu 70%, besonders bevorzugt mindestens zu 80%, insbesondere bevorzugt mindestens zu 90% und am meisten bevorzugt mindestens zu 95% homolog zu den für endogene ADFs oder Teilen davon kodierenden Sequenzen ist.

13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
25 **dadurch gekennzeichnet**, dass ein Teil der übertragenen Nukleinsäuresequenzen mindestens zu 50%, bevorzugt mindestens zu 60%, ebenfalls bevorzugt mindestens zu 70%, besonders bevorzugt mindestens zu 80%, insbesondere bevorzugt mindestens zu 90% und am meisten bevorzugt mindestens zu 95% komplementär zu den für endogene ADFs oder Teilen davon kodierenden Sequenzen ist.

- 115 -

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität von mindestens einem endogenen ADF durch PTGS, VIGS, RNAi oder homologe Rekombination erfolgt.

5

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- 10
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine identische oder homologe antisense-Sequenz der für den mindestens einen ADF oder Teilen davon kodierenden Sequenz, wobei die Sequenz an ihrem 3'-Ende vom Spleißosom erkennbare 3'-Exon-Sequenzen aufweist,
 - 15
 - operativ daran gebunden ein Intron,
 - operativ daran gebunden eine identische oder homologe sense-Sequenz der für den mindestens einen ADF oder Teilen davon kodierenden Sequenz, wobei die Sequenz an ihrem 5'-Ende vom Spleißosom erkennbare 5'-Exon-Sequenzen aufweist,
 - 20
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

25

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung eines doppelsträngigen RNA-Moleküls von 15 bis 100 Nukleotiden Länge, bevorzugt von 20 bis 75 Nukleotiden Länge, insbesondere bevorzugt von 20 bis 50 Nukleotiden Länge, ebenfalls insbesondere bevorzugt von 30
- 20 bis 40 oder 20 bis 30 Nukleotiden Längen und am meisten bevorzugt von 20 bis

- 116 -

25 oder 21, 22 oder 23 Nukleotiden Länge, umfassend Nukleinsäuresequenzen, deren sense-Strang identisch oder homolog zu einem Teil der den/die endogenen ADF(s) kodierenden Sequenz(en) ist,

b) Übertragen des Moleküls aus a) auf Pflanzenzellen.

5

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- 10
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine identische oder homologe antisense-Sequenz der für den/die endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz(en),
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle
- 15
- Terminationssequenz,

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- 20
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine identische oder homologe sense-Sequenz
- 25
- der für den/die endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz(en), wobei die Sequenz über selbst-komplementäre Bereiche verfügt,
- operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

- 117 -

b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
- eine operativ daran gebundene DNA-Sequenz, die zu der/den für die mRNA des/der endogenen ADF(s) oder Teilen davon kodierenden Sequenz(en) komplementär ist,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für Ribonuklease P kodiert,
- operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,

15 b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

20 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die folgenden Schritte:

a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:

- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die identisch oder homolog zu der für das 5'-Ende des/der endogenen ADF(s) kodierenden Sequenz(en) ist,
- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein Resistenzgen kodiert,

- 118 -

- operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die identisch oder homolog zu der für das 3'-Ende des/der endogenen ADF(s) kodierenden Sequenz(en) ist,
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,
- 5
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und Integration ins pflanzliche Genom.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, umfassend die
10 folgenden Schritte:

- a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für ein Ribozym kodiert, das spezifisch die mRNA des/der endogenen ADF(s) erkennt,
 - 15 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz,
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

20 22. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet, dass die Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität des/der endogenen ADF(s) durch Expression mindestens eines nicht-funktionellen ADFs oder Teilen davon erfolgt, die Punktmutation(en), Deletion(en) und/oder Insertion(en) aufweisen.

25 23. Verfahren nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um mindestens einen nicht-funktionellen ADF handelt, der Punktmutation(en), Deletion(en) und/oder Insertion(en) aufweist, die die Bindung an pathogene oder physiologische
30 Bindungspartner, bevorzugt an G-Actin und/oder an F-Actin, verhindern.

- 119 -

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 oder 23, umfassend die folgenden Schritte:

- 5 a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für eine dominant-negative Mutante eines pflanzlichen ADFs, kodiert
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle
- 10 Terminationssequenz,
- b) Übertragen des Vektors aus a) auf die Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

25. Verfahren nach Anspruch 7,

15 **dadurch gekennzeichnet**, dass die Erniedrigung des Gehalts und/oder der Aktivität des/der endogenen ADF(s) durch Expression mindestens eines rekombinanten Antikörpers erfolgt, der für den/die endogenen ADF(s) spezifisch ist und die Interaktionen mit pathogenen und/oder physiologischen Bindungspartnern, bevorzugt G-Actin und/oder F-Actin, blockiert.

20

26. Verfahren nach Anspruch 25, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung eines Vektors, umfassend folgende Nukleinsäuresequenzen in 5'-3'-Orientierung:
- eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
 - 25 - operativ daran gebunden eine DNA-Sequenz, die für einen rekombinanten Antikörper kodiert, der für den/die endogenen ADF(s) spezifisch ist und die Interaktionen mit pathogenen und/oder physiologischen Bindungspartnern, bevorzugt G-Actin und/oder F-Actin, blockiert,
 - operativ daran gebunden eine in Pflanzen funktionelle
- 30 Terminationssequenz,

- 120 -

b) Übertragen des Vektors aus a) auf die Pflanzenzellen und gegebenenfalls Integration ins pflanzliche Genom.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 26,
5 **dadurch gekennzeichnet**, dass der Vektor zusätzlich zu Promoter- und Terminationssequenzen weitere regulatorische und funktionelle Sequenzen enthält.

28. Verfahren nach dem Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den regulatorischen Sequenzen um
10 Enhancer, um Replikationssignale, Selektionsmarker und/oder um Sequenzen handelt, die eine Propagation der Vektoren in Bakterien und/oder eine transiente und/oder permanente Replikation in Pflanzenzellen ermöglichen.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 28,
15 **dadurch gekennzeichnet**, dass es sich bei den Vektoren um Plasmide, Cosmide und/oder rekombinante Viren handelt.

30. Verfahren nach Anspruch 29,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Vektoren um pBR322, um pUC-
20 Vektoren, um M13mp-Vektoren oder um Vektoren handelt, die vom Ti- oder Ri-Plasmid von Agrobacterien abgeleitet sind.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 30,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Promotersequenzen um konstitutive
25 Promotoren, bevorzugt um den 35S-, den Actin- oder den Ubiquitin-Promotor, um gewebespezifische Promotoren, bevorzugt um den Phosphoenolpyruvat-Carboxylase- oder den Fructose-1,6-bisphosphatase-Promoter, um blattspezifische, um entwicklungspezifische, licht-, verwundungs-, oder pathogeninduzierte Promotoren handelt.

30

- 121 -

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 31,
dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor durch Transformation, Transfektion,
Injektion, biolistische Methoden und/oder Elektroporation auf die Pflanzen
übertragen wird.
- 5
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 32,
dadurch gekennzeichnet, dass der/die ADF(s) mindestens ein
Aminosäuresequenzmotiv enthalten, das mindestens zu 40%, bevorzugt mindestens
zu 50%, besonders bevorzugt mindestens zu 60%, insbesondere bevorzugt
10 mindestens zu 70%, ebenfalls insbesondere bevorzugt mindestens zu 80% und am
meisten bevorzugt bis zu 90% homolog zu einer der Aminosäuresequenzen SEQ ID
No. 89, 90 oder 91 ist.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 33,
15 **dadurch gekennzeichnet**, dass der/die ADF(s) mindestens zu 40%, bevorzugt
mindestens zu 50%, besonders bevorzugt mindestens zu 60%, insbesondere
bevorzugt mindestens zu 70%, ebenfalls insbesondere bevorzugt mindestens zu 80%
und am meisten bevorzugt mindestens zu 90% oder 98% homolog zu der
Aminosäuresequenz SEQ ID No. 1 ist.
- 20
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 34,
dadurch gekennzeichnet, dass die transgenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz
gegen Pathogene zeigen, die ausgewählt sind aus der Gruppe enthaltend *Blumeria*
graminis f. sp. hordei, tritici, avenae, secalis, lycopersici, vitis, cucumis, cucurbitae,
25 *pisi, pruni, solani, rosae, fragariae, rhododendri, mali* und *nicotianae*.
36. Verfahren nach Anspruch 35,
dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *Blumeria*
graminis f. sp. hordei zeigen.
- 30

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 36,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den transgenen Pflanzen um monokotyle Pflanzen, bevorzugt um Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum,
5 Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) und dergleichen gehören, handelt.
38. Verfahren nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Gerste oder Weizen handelt.
- 10 39. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 38,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den transgenen Pflanzen um dikotyle Pflanzen, bevorzugt um Baumwolle, Leguminosen wie Hülsenfrüchte und insbesondere Alfalfa, Sojabohne, Raps, Tomate, Zuckerrübe, Kartoffel, Zierpflanzen, Tabak sowie Bäume handelt.
- 15 40. Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die für einen funktionellen oder nicht-funktionellen Actin-depolymerisierenden Faktor (ADF), funktionell äquivalente Teile und/oder Derivate davon kodiert, und/oder mindestens einer Nukleinsäuresequenz, die für einen rekombinanten Antikörper kodiert, der für
20 den/die endogenen ADF(s) spezifisch ist und die Interaktionen mit pathogenen oder physiologischen Bindungspartnern, bevorzugt G-Actin und/oder F-Actin, blockiert, zur Herstellung von transgenen Pflanzen und/oder Pflanzenzellen mit erhöhter Pathogenresistenz.
- 25 41. Verwendung nach Anspruch 40,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die Nukleinsäuresequenz für einen pflanzlichen ADF, bevorzugt einen ADF aus Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) und dergleichen
30 gehören, handelt.

42. Verwendung nach Anspruch 41,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die ADFs mit den SEQ ID Nos 1 bis 44
aus Tabelle 5, bevorzugt um den ADF mit der SEQ ID No. 1, oder um ADFs mit
5 Sequenzen handelt, die zu den Sequenzen der genannten ADFs homolog sind.
43. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 42,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den nicht-funktionellen ADFs um
dominant-negative Mutanten handelt.
10
44. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle mit erhöhter Pathogenresistenz,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität mindestens eines
Actin-depolymerisierenden Faktors (ADF) im Vergleich zum Wildtyp verändert ist.
- 15 45. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach Anspruch 44,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens
einem endogenen ADF und/oder von mindestens einem exogenem ADF erhöht ist.
- 20 46. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach Anspruch 44,
dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt und/oder die Aktivität von mindestens
einem endogenen ADF erniedrigt ist.
- 25 47. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44
bis 46,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die ADFs mit den SEQ ID Nos 1 bis 4
aus Tabelle 5, bevorzugt um den ADF mit der SEQ ID No. 1, oder um ADFs mit
Sequenzen handelt, die zu den Sequenzen der genannten ADFs im Wesentlichen
funktionell homolog sind.

48. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44 bis 47,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen ADF handelt, der die Konsensussequenzen SEQ ID No. 89, 90 und/oder 92 aufweist.
- 5
49. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44 bis 48,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich um mindestens einen ADF, bevorzugt aus Pflanzen, besonders bevorzugt aus Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais, Reis,
10 Panicum, Pennisetum, Setaria, Hirse, Mais und/oder *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt um ADFs aus Gerste, oder um ADFs handelt, die zu den genannten ADFs im Wesentlichen funktionell homolog sind.
50. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44
15 bis 49,
dadurch gekennzeichnet, dass die transgenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene zeigen, die ausgewählt sind aus der Gruppe enthaltend *Blumeria graminis f. sp. hordei*, *tritici*, *avenae*, *secalis*, *lycopersici*, *vitis*, *cucumis*, *cucurbitae*, *pisi*, *pruni*, *solani*, *rosae*, *fragariae*, *rhododendri*, *mali* und *nicotianae*.
- 20
51. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44 bis 50,
dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den transgenen Pflanzen um monokotyle Pflanzen, bevorzugt um Pflanzen, die zu den Gattungen Avena (Hafer), Triticum
25 (Weizen), Secale (Roggen), Hordeum (Gerste), Oryza (Reis), Panicum, Pennisetum, Setaria, Sorghum (Hirse), Zea (Mais) und dergleichen gehören, handelt.
52. Transgene Pflanze oder Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 44 bis 51,

dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem ADF, dessen Gehalt und/oder Aktivität gegenüber dem Wildtyp verändert ist, um ADF3 aus Gerste, bei der Pflanze um Gerste und bei dem Pathogen, gegen das die Pflanze resistent ist, um *Blumeria graminis f. sp. hordei* handelt.

5

53. Transgene Pflanzenzelle oder Pflanze mit erhöhter Pathogenresistenz, hergestellt durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 39.

10

54. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

a) Nukleinsäuremoleküle, die für den Actin-depolymerisierenden Faktor 3 (ADF3) aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren,

b) Nukleinsäuremoleküle, die für funktionelle äquivalente Teile des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren,

15

c) Nukleinsäuremoleküle, die für Mutanten des ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 kodieren,

d) Nukleinsäuremoleküle, die zu den Nukleinsäuremolekülen aus a), b) und c) hybridisieren,

20

wobei die Nukleinsäuremoleküle aus b) und c) für Proteine bzw. Proteinfragmente kodieren, die zu dem ADF3 aus Gerste mit der SEQ ID No. 1 mindestens zu 80%, bevorzugt mindestens zu 85%, besonders bevorzugt mindestens zu 90%,

insbesondere bevorzugt zu mindestens 95% und meisten bevorzugt zu mindestens 98% homolog sind und wobei die Nukleinsäuremoleküle aus d) zu den

Nukleinsäuremolekülen aus a), b) und c) zu mindestens zu 80%, bevorzugt

25

mindestens zu 85%, besonders bevorzugt mindestens zu 90%, insbesondere bevorzugt zu mindestens 95% oder 97% und meisten bevorzugt zu mindestens 98% komplementär sind.

55. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 54,

dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Nukleinsäuremoleküle mit den Sequenzen SEQ ID No. 45 und 46 handelt.

56. Expressionsvektor, umfassend:
- 5 - eine in Pflanzen funktionelle Promotersequenz,
- operativ damit verknüpft eine DNA-Sequenz gemäß den Ansprüchen 54 oder 55,
- operativ damit verknüpft eine in Pflanzen funktionelle Terminationssequenz.
- 10
57. Isoliertes Protein, das durch eine der Nukleinsäuren gemäß Anspruch 54 oder 55 kodiert wird.
58. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 54 oder 55
- 15 in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 39.

```

At1g01750 -----MANSASGMHVSDECKLKFLELKAKRNYRFIVFKIDEKAQQVMIDK-----LG 47
At4g00680 -----MANSASGMHVNDECKIKFLELKAKRTRYRFIYFKIDEKAQQVQIEK-----LG 47
At5g52360 -----MANAASGMAVEDECKLKFLELKAKRNYRFIIFRIDG--QQVVVEK-----LG 45
At4g25590 -----MAVEDECKLKFLELKSKRNYRFIIFRIDG--QQVVVEK-----LG 38
At5g59890 -----MANAASGMVHDDCKLRFLELKAKRTRHRFIVYKIEEKQKQVIVEK-----VG 47
At3g46010 -----MANAASGMVHDDCKLRFLELKAKRTRHRFIVYKIEEKQKQVIVEK-----VG 47
At3g46000 -----MANAASGMVHDDCKLKFMELEKAKRTFRTIVYKIEDKQ--VIVEK-----LG 45
At5g59880 -----MANAASGMVHDDCKLKFMELEKAKRTRHRFIIYKIEELQKQVIVEK-----IG 47
At3g45990 -----MVLHDDCKLTFLELKERRTFRSIVYKIEDNM-QVIVEKHHYKMMHG 45
HvADF3 -----MANASSGAGIHDDCKLRFVELKSKRMHRFITRYLENQK-EVIVDQ-----TG 46
At4g34970 -----MTDDCKKSFMEMKWKVHRVYVYKLEEKSRKVTVDK-----VG 38
At2g16700 ---MAMAFKMATTGMRVTDECTSSFMDMKWKVHRVYVYKIEEKSRKVTVDK-----VG 51
At2g31200 MSFRGLSRPNAISGMGVADESKTTFLELQKRTKTRHYVVFKIDESKKEVVVEK-----TG 54
      : . : * . . * : : : : . * : : : : . * : : :
      : . : * . . * : : : : . * : : : : . * : : :

At1g01750 NPEETYEDFTSRIPEDECRYAVYDYDFTTPENCQKSKIFFIAWSPDTSRVRSKMLYASSK 107
At4g00680 NPEETYDDFTSSIPDDECRYAVYDFDFTTEDNCQKSKIFFIAWSPDTSRVRSKMLYASSK 107
At5g52360 SPQENYDDFTNYLPPNECRYAVYDFDFTTAENIQKSKIFFIAWSPDSSRVRMCMVYASSK 105
At4g25590 NPDETYDDFTASLPANECRYAVDFDFFITDENCQKSKIFFIAWSPDSSRVRMCMVYASSK 98
At5g59890 EPILTYEDFAASLPADECRYAIYDFDFVTAENCQKSKIFFIAWCPDVAKVRSKMIYASSK 107
At3g46010 QPIQTYEEFAACLPADECRYAIYDFDFVTAENCQKSKIFFIAWCPDIKVRSKMIYASSK 107
At3g46000 EPEQSYDDFAASLPADDCRYCIYDFDFVTAENCQKSKIFFIAWSPDTAKVRDKMIYASSK 105
At5g59880 EPGQTHEDLAASLPADECRYAIFDFDFVSSSEGVPRSRIFVAVSPDTARVRSKMIYASSK 107
At3g45990 EREQSYEEFANSLPADECRYAILDIEFVPGE----RKICFIAWSPSTAKMRKKMIYSSTK 101
HvADF3 QRDATYEDFTTKLPENDCRFAVDFDFTTPEDVPKSRIFYIFWSPDTAKVRSKMITYASN- 105
At4g34970 AAGESYDDLAAASLPEDDCRYAVDFDFVTVDNCRMSKIFFITWSPASRIREKMMYATSK 98
At2g16700 GAGESYHLEDLPLVDRCRYAVDFDFVTVDNCRMSKIFFIAWSPASKIRAKILYATSK 111
At2g31200 NPTESYDDFLASLPDNDCRYAVYDFDFVTSENCQKSKIFFIAWSPSTSGIRAKVLYSTSK 114
      . : : : * : : * : : * : : * : : . : . : * : . * . : : * * : : : .

At1g01750 DRFKRELDGIQVELQATDPSEMSLDIKGRVNL 140
At4g00680 DRFKREMEGIQVELQATDPSEMSLDIKGRNLN 140
At5g52360 DRFKRELDGIQVELQATDPSEMSLDIKSRAL- 137
At4g25590 DRFKRELDGIQVELQATDPSEMFDIISRAL- 130
At5g59890 DRFKRELDGIQVELQATDPTEMDLDVLSRVN- 139
At3g46010 DRFKRELDGIQVELQATDPTEMDLDVFRSRAN- 139
At3g46000 DRFKRELDGIQVELQATDPTEMDLDVFKSRTN- 137
At5g59880 DRFKRELDGIQVELQATDPTEMDLDVFKSRAN- 139
At3g45990 DRFKRELDGIQVEFHATDLTDSLDAIRRRIN- 133
ADF-Est EKFKRTLQIEMQATDPSEISLDVIKERAH- 137
At4g34970 SGLRRVLDGVHYELQATDPTEMGFDKIQRDRAK- 130
At2g16700 DGLRRVLEGIHYELQATDPTEMGFDIQRDRAK- 143
At2g31200 DQLSRELQGIHYEIQATDPTEVDLEVLRRERAN- 146
      . : * : : * : : * : : * : : * : : * : :

```

Abbildung 1

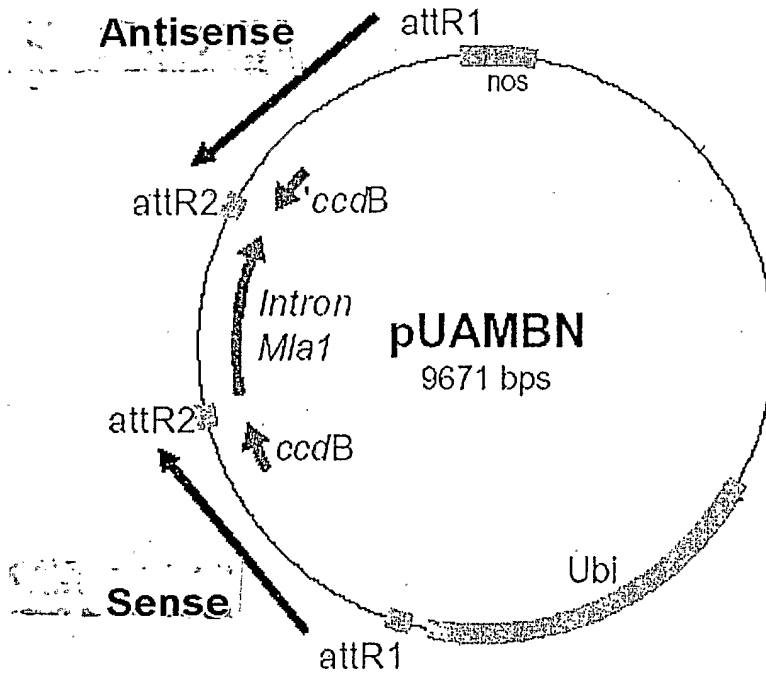


Abbildung 2

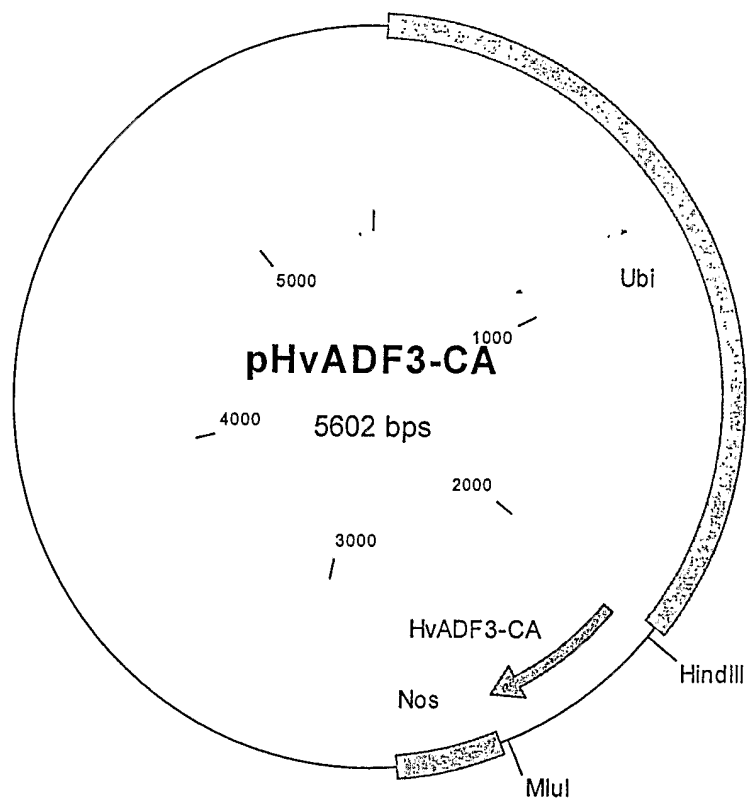


Abbildung 3

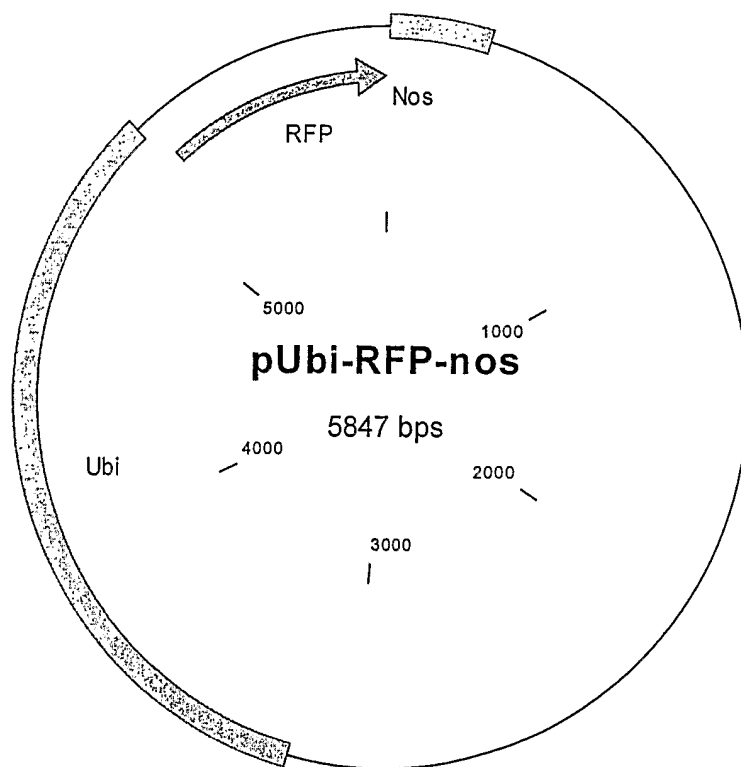


Abbildung 4

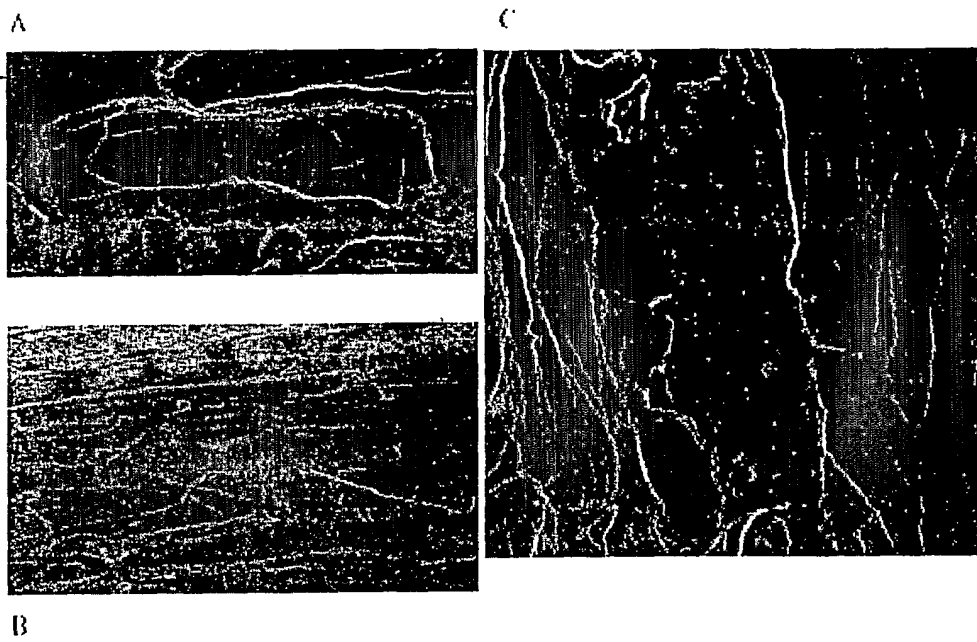


Abbildung 5

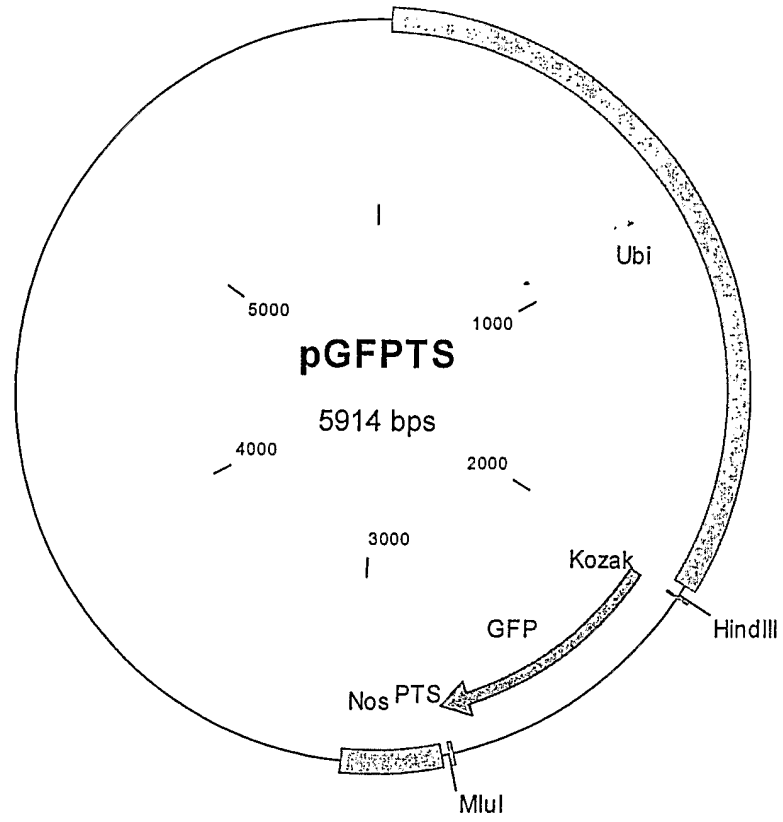
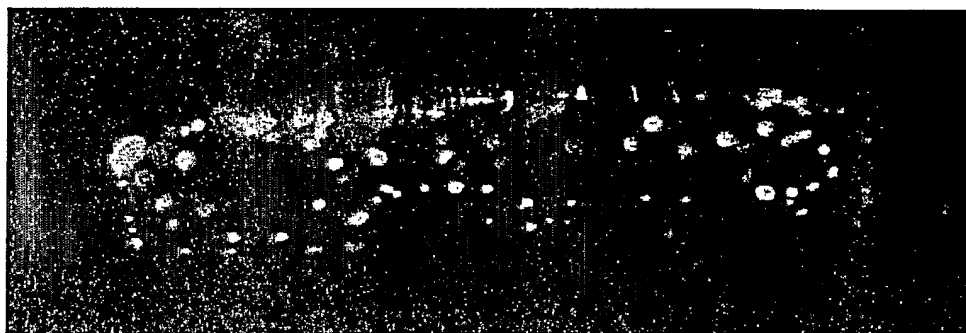


Abbildung 6

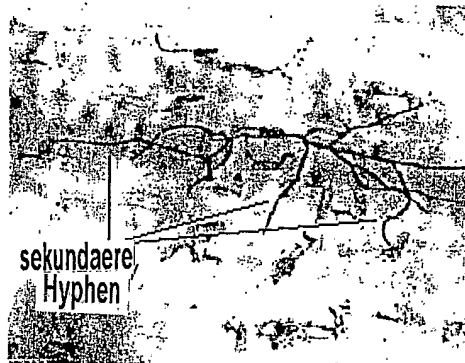
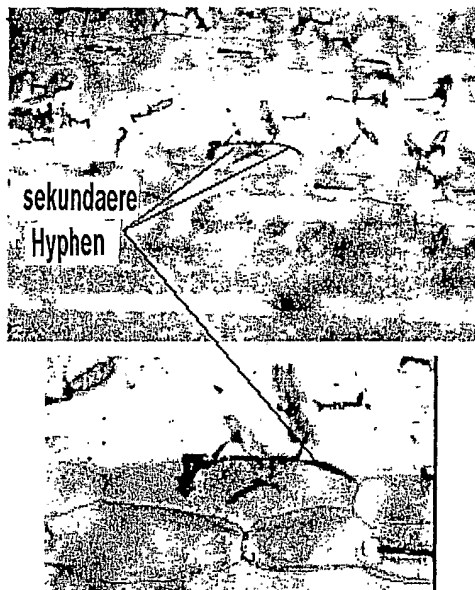
A



B

Abbildung 7

A



B

C

Abbildung 8

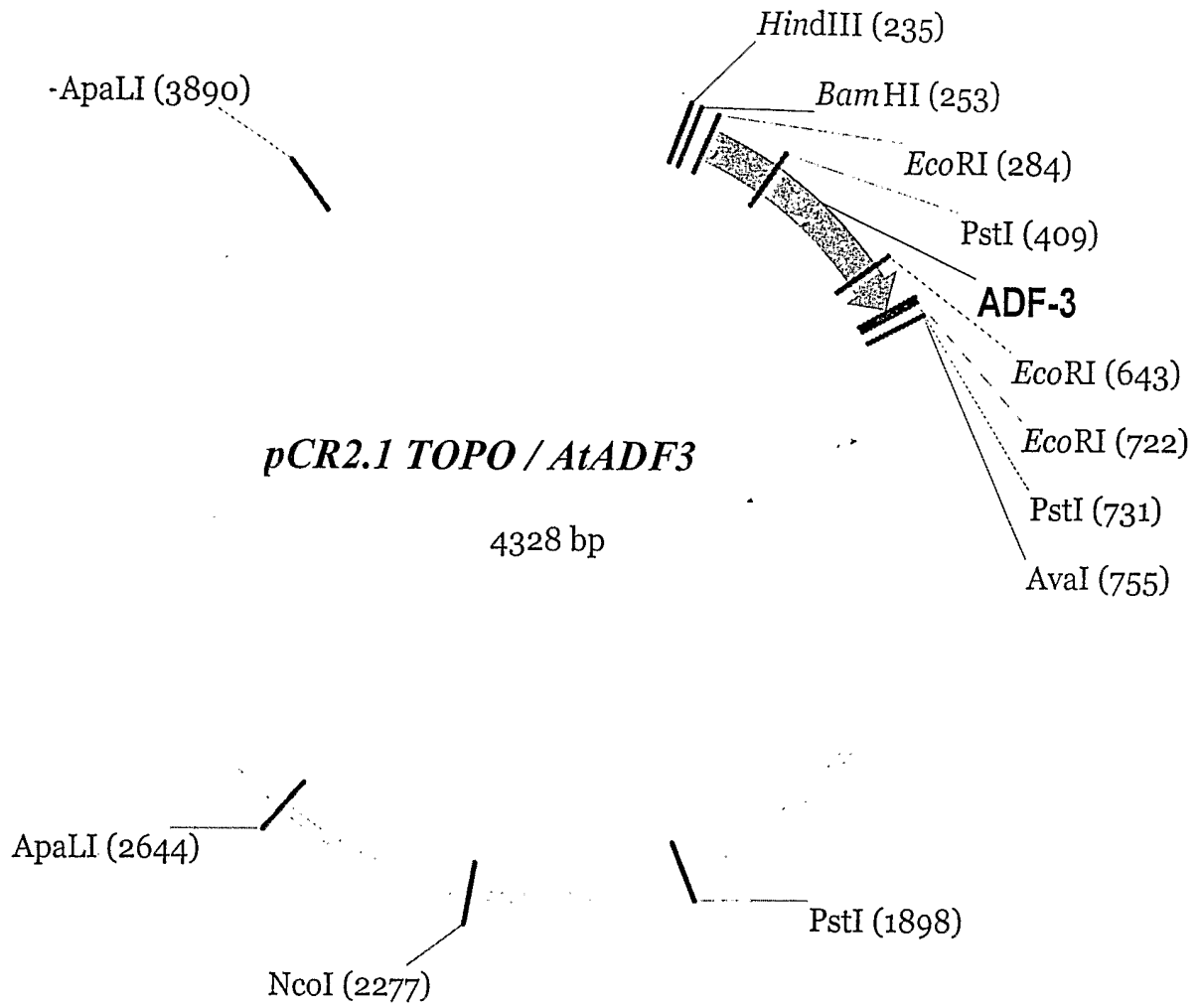


Abbildung 9

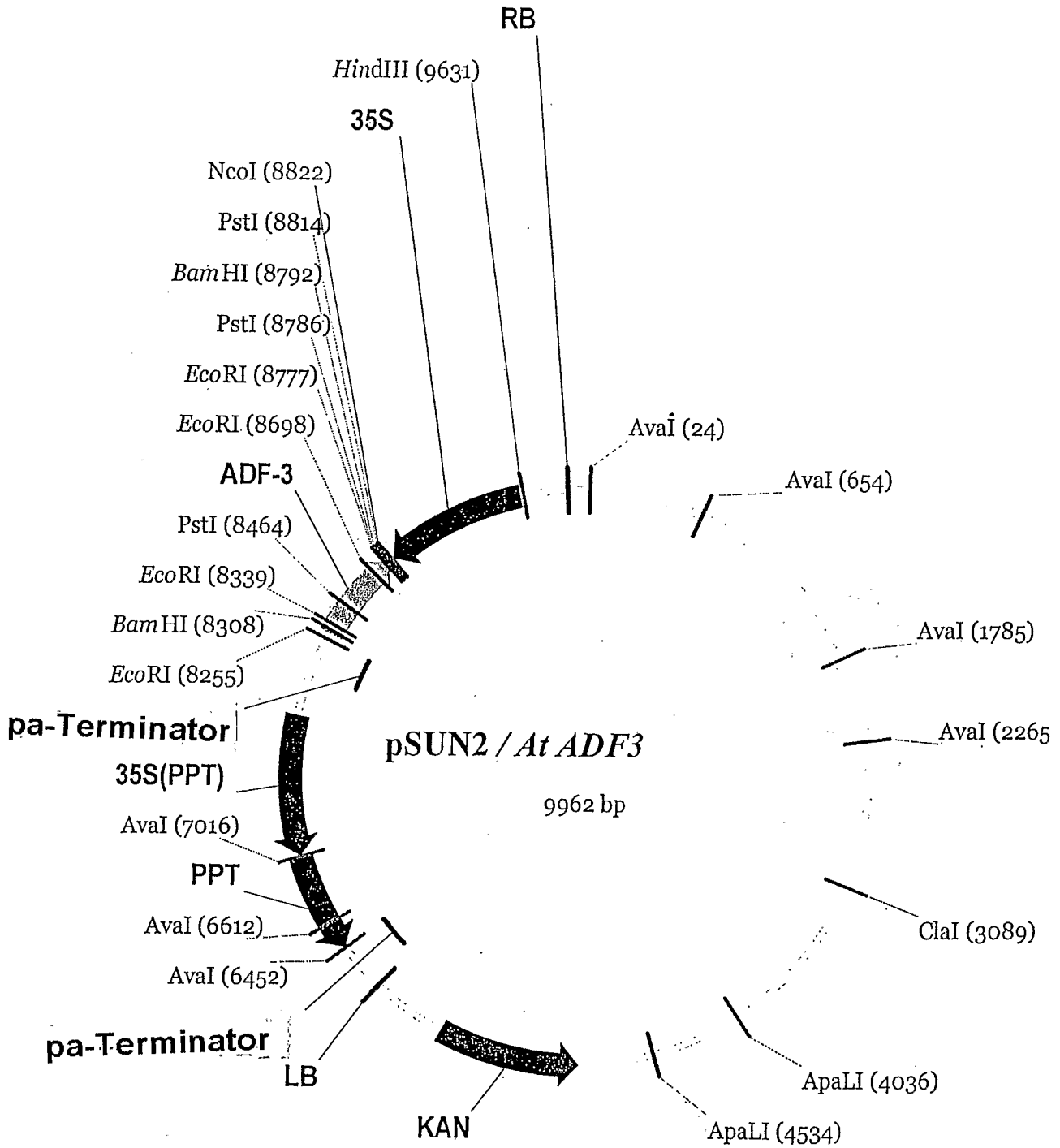


Abbildung 10

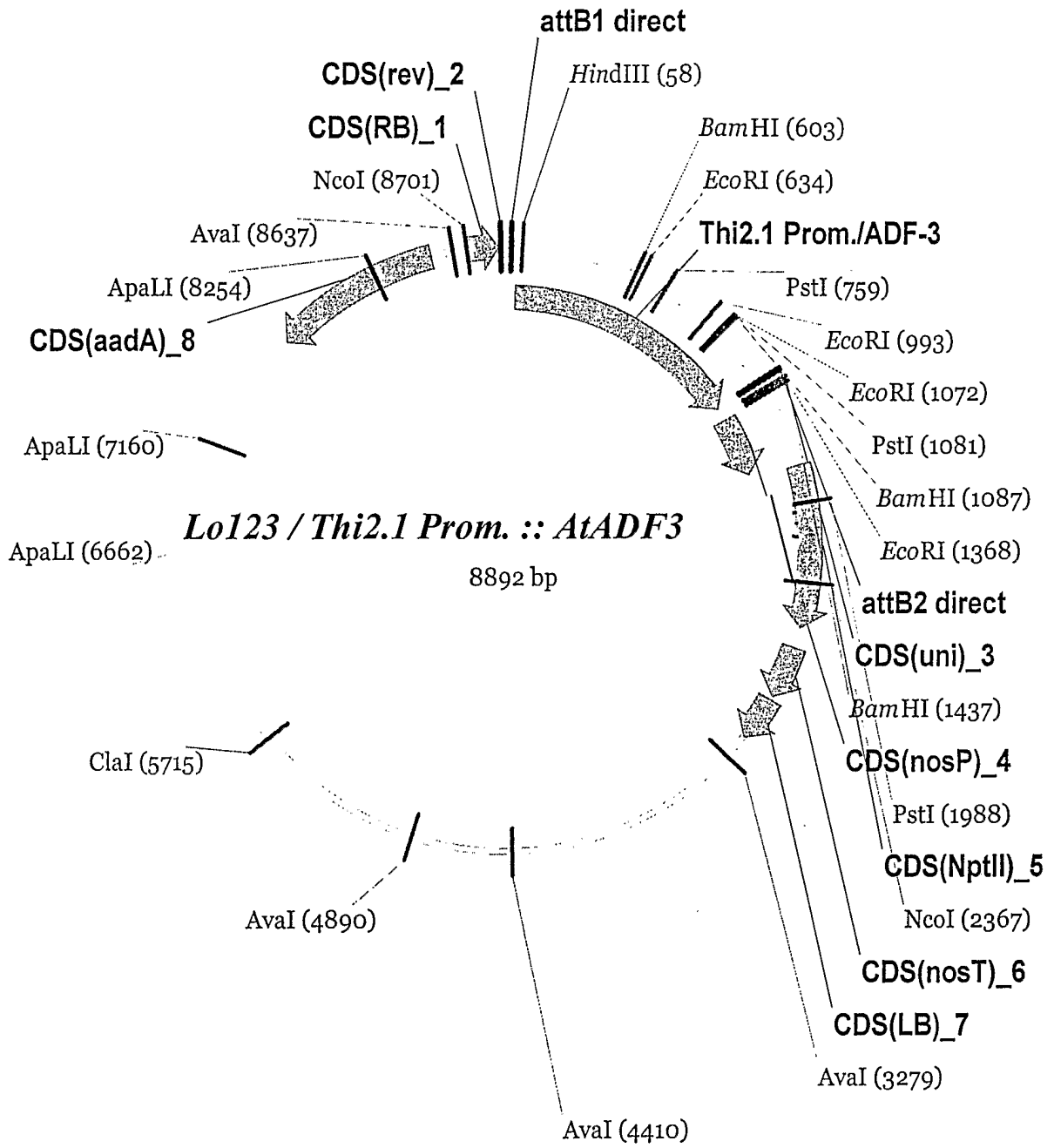


Abbildung 11

B7822.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> BASF Plant Science GmbH and Max-Planck-Gesellschaft
zur Förderung der Wissenschaften e.V.

<120> Method for producing transgenic plants with increased pathogen
resistance by modifying the content and/or activity of
actin-depolymerising factors

<130> B 7822/RN

<140> DE 10 2004 036 456.7

<141> 2004-07-28

<160> 99

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 138

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 1

Met Ala Asn Ala Ser Ser Gly Ala Gly Ile His Asp Asp Cys Lys Leu
1 5 10 15

Arg Phe Val Glu Leu Lys Ser Lys Arg Met His Arg Phe Ile Thr Tyr
20 25 30

Arg Leu Glu Asn Gln Lys Glu Val Ile Val Asp Gln Thr Gly Gln Arg
35 40 45

Asp Ala Thr Tyr Glu Asp Phe Thr Lys Thr Leu Pro Glu Asn Asp Cys
50 55 60

Arg Phe Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Thr Thr Pro Glu Asp Val Pro
65 70 75 80

Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Phe Trp Ser Pro Asp Thr Ala Lys Val
85 90 95

Arg Ser Lys Met Thr Tyr Ala Ser Thr Asn Glu Lys Phe Lys Arg Thr
100 105 110

Leu Asp Gly Ile Gln Ile Glu Met Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Ile
115 120 125

B7822.ST25.txt

Ser Leu Asp Val Ile Lys Glu Arg Ala His
 130 135

<210> 2
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 2

Met Ala Asn Ala Ser Ala Gly Ala Gly Ile His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Arg Phe Val Glu Leu Lys Ser Lys Arg Met His Arg Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

Arg Leu Glu Asn Gln Lys Glu Val Ile Val Asp Gln Thr Gly Gln Arg
 35 40 45

Asp Ala Thr Tyr Glu Asp Phe Thr Lys Thr Leu Pro Glu Asn Asp Cys
 50 55 60

Arg Phe Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Thr Thr Pro Glu Asp Val Pro
 65 70 75 80

Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Phe Trp Ser Pro Asp Thr Ala Lys Val
 85 90 95

Arg Ser Lys Met Thr Tyr Ala Ser Asn Glu Lys Phe Lys Arg Thr Leu
 100 105 110

Asp Gly Ile Gln Ile Glu Met Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Ile Ser
 115 120 125

Leu Asp Val Ile Lys Glu Arg Ala His
 130 135

<210> 3
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 3

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val Asp Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

B7822.ST25.txt

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Ile Tyr
 20 25 30

Lys Ile Asp Asp Lys Lys Lys Met Val Val Val Glu Lys Val Gly Glu
 35 40 45

Pro Ala Leu Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Thr Asn Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Phe Val Thr Glu Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Val Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Glu Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
 115 120 125

Val Gly Phe Asp Val Ile Gln Gly Arg Ala Asn
 130 135

<210> 4
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 4

Met Ala Leu Ala Ala Ala Pro Ala Ala Leu Ala Trp Pro Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Asn Ser Pro Ala Trp Ile Asp Val Pro Glu Arg Ser Lys Ser Ala
 20 25 30

Phe Met Glu Leu Lys Arg Arg Lys Val His Arg Tyr Val Ile Phe Lys
 35 40 45

Ile Asp Asp Ser Thr Glu Glu Val Val Val Glu Lys Thr Gly Ser Pro
 50 55 60

Gly Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Thr Ala Ser Leu Pro Val Asp Asp Cys

B7822.ST25.txt

Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Val Gln Ala Thr
 115 120 125

Asp Pro Ser Glu Met Gly Phe Asp Val Ile Arg Glu Arg Ala Gln
 130 135 140

<210> 6
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 6

Met Ala Phe Met Arg Thr Ser Ser Asn Ala Ser Ser Gly Met Gly Val
 1 5 10 15

Ala Pro Asp Ile Arg Glu Thr Phe Leu Glu Leu Gln Met Lys Lys Ala
 20 25 30

Phe Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Val
 35 40 45

Val Glu Lys Thr Gly Ala Thr Thr Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Leu Ala
 50 55 60

Cys Leu Pro Glu Asn Asp Cys Arg Tyr Ala Leu Tyr Asp Phe Asp Phe
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Asn Val Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Asp Thr Ser Arg Ile Arg Ala Lys Met Leu Tyr Ser Thr Ser
 100 105 110

Lys Asp Arg Ile Lys Gln Glu Leu Asp Gly Phe His Tyr Glu Ile Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp Val Leu Arg Asp Arg Ala
 130 135 140

His
 145

<210> 7

B7822.ST25.txt

<211> 139
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 7

Met Ser Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Cys Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Ala Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asn Glu Lys Val Gln Gln Val Val Val Asp Arg Val Gly Glu
 35 40 45

Lys Asn Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Cys Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ala Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Asp Ile Val Lys Ala Arg Ala Leu
 130 135

<210> 8
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> Hordeum vulgare

<400> 8

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Ser Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Asp Leu Lys Ala Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Thr Phe
 20 25 30

B7822.ST25.txt

Lys Ile Asn Glu Asn Thr Gln Gln Val Val Val Asp Arg Val Gly Gln
 35 40 45

Pro Gly Asp Thr Tyr Ala Asp Phe Thr Ala Ser Met Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ser Pro Asp Ser Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Glu Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Gly His Arg Gln Gly Gln Ser Pro Leu Lys Gln Ser Leu
 130 135 140

Val Ala Pro Ser Ile Pro Asp Ser Lys Ala Ser Ser Trp Ile His Tyr
 145 150 155 160

Thr Ala Cys Ala Cys Pro Thr Tyr
 165

<210> 9

<211> 139

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Arg Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Val Tyr
 20 25 30

Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Val Val Glu Lys Val Gly Gln
 35 40 45

Pro Ile Gln Thr Tyr Glu Glu Phe Ala Ala Cys Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

B7822.ST25.txt

Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Val Thr Ala Glu Asn Cys
65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Cys Pro Asp Ile Ala Lys
85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
115 120 125

Met Asp Leu Asp Val Phe Arg Ser Arg Ala Asn
130 135

<210> 10
<211> 137
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val His Asp Asp Cys Lys Leu
1 5 10 15

Lys Phe Met Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr Phe Arg Thr Ile Val Tyr
20 25 30

Lys Ile Glu Asp Lys Gln Val Ile Val Glu Lys Leu Gly Glu Pro Glu
35 40 45

Gln Ser Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Ala Asp Asp Cys Arg
50 55 60

Tyr Cys Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Val Thr Ala Glu Asn Cys Gln Lys
65 70 75 80

Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ala Lys Val Arg
85 90 95

Asp Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg Glu Leu
100 105 110

B7822.ST25.txt

Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu Met Gly
 115 120 125

Leu Asp Val Phe Lys Ser Arg Thr Asn
 130 135

<210> 11
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Met Glu Leu Lys Thr Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Ile Tyr
 20 25 30

Lys Ile Glu Glu Leu Gln Lys Gln Val Ile Val Glu Lys Ile Gly Glu
 35 40 45

Pro Gly Gln Thr His Glu Asp Leu Ala Ala Ser Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Phe Asp Phe Asp Phe Val Ser Ser Glu Gly Val
 65 70 75 80

Pro Arg Ser Arg Ile Phe Phe Val Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
 115 120 125

Met Asp Leu Asp Val Phe Lys Ser Arg Ala Asn
 130 135

<210> 12
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

B7822.ST25.txt

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Arg Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Val Tyr
 20 25 30

Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Ile Val Glu Lys Val Gly Glu
 35 40 45

Pro Ile Leu Thr Tyr Glu Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Val Thr Ala Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Cys Pro Asp Val Ala Lys
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
 115 120 125

Met Asp Leu Asp Val Leu Lys Ser Arg Val Asn
 130 135

<210> 13

<211> 143

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 13

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

Glu Cys Thr Ser Ser Phe Met Asp Met Lys Trp Lys Lys Val His Arg
 20 25 30

Tyr Ile Val Phe Lys Ile Glu Glu Lys Ser Arg Lys Val Thr Val Asp
 35 40 45

Lys Val Gly Gly Ala Gly Glu Ser Tyr His Asp Leu Glu Asp Ser Leu

B7822.ST25.txt

Ser Lys Asp Gln Leu Ser Arg Glu Leu Gln Gly Ile His Tyr Glu Ile
 115 120 125

Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu Val Asp Leu Glu Val Leu Arg Glu Arg
 130 135 140

Ala Asn
 145

<210> 15
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val Glu Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Asn Tyr Arg Phe Ile Ile Phe
 20 25 30

Arg Ile Asp Gly Gln Gln Val Val Val Glu Lys Leu Gly Ser Pro Gln
 35 40 45

Glu Asn Tyr Asp Asp Phe Thr Asn Tyr Leu Pro Pro Asn Glu Cys Arg
 50 55 60

Tyr Ala Val Tyr Asp Phe Asp Phe Thr Thr Ala Glu Asn Ile Gln Lys
 65 70 75 80

Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Ser Ser Arg Val Arg
 85 90 95

Met Lys Met Val Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg Glu Leu
 100 105 110

Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Met Ser
 115 120 125

Leu Asp Ile Ile Lys Ser Arg Ala Leu
 130 135

<210> 16

B7822.ST25.txt

<211> 140

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Met His Val Asn Asp Glu Cys Lys Ile
 1 5 10 15

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr Tyr Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asp Glu Lys Ala Gln Gln Val Gln Ile Glu Lys Leu Gly Asn
 35 40 45

Pro Glu Glu Thr Tyr Asp Asp Phe Thr Ser Ser Ile Pro Asp Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Tyr Asp Phe Asp Phe Thr Thr Glu Asp Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Met Glu Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Leu Asp Ile Ile Lys Gly Arg Leu Asn Leu
 130 135 140

<210> 17

<211> 130

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

Met Thr Asp Asp Cys Lys Lys Ser Phe Met Glu Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

Val His Arg Tyr Val Val Tyr Lys Leu Glu Glu Lys Ser Arg Lys Val
 20 25 30

B7822.ST25.txt

Thr Val Asp Lys Val Gly Ala Ala Gly Glu Ser Tyr Asp Asp Leu Ala
 35 40 45

Ala Ser Leu Pro Glu Asp Asp Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp
 50 55 60

Tyr Val Thr Val Asp Asn Cys Arg Met Ser Lys Ile Phe Phe Ile Thr
 65 70 75 80

Trp Ser Pro Glu Ala Ser Arg Ile Arg Glu Lys Met Met Tyr Ala Thr
 85 90 95

Ser Lys Ser Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Leu
 100 105 110

Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu Met Gly Phe Asp Lys Ile Gln Asp Arg
 115 120 125

Ala Lys
 130

- <210> 18
- <211> 140
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Met His Val Ser Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Asn Tyr Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asp Glu Lys Ala Gln Gln Val Met Ile Asp Lys Leu Gly Asn
 35 40 45

Pro Glu Glu Thr Tyr Glu Asp Phe Thr Arg Ser Ile Pro Glu Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Tyr Asp Tyr Asp Phe Thr Thr Pro Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

B7822.ST25.txt

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Leu Asp Ile Ile Lys Gly Arg Val Asn Leu
 130 135 140

<210> 19
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 19

Met Ala Val Glu Asp Glu Cys Lys Leu Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Lys Arg Asn Tyr Arg Phe Ile Ile Phe Arg Ile Asp Gly Gln Gln Val
 20 25 30

Val Val Glu Lys Leu Gly Asn Pro Asp Glu Thr Tyr Asp Asp Phe Thr
 35 40 45

Ala Ser Leu Pro Ala Asn Glu Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp
 50 55 60

Phe Ile Thr Asp Glu Asn Cys Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala
 65 70 75 80

Trp Ser Pro Asp Ser Ser Arg Val Arg Met Lys Met Val Tyr Ala Ser
 85 90 95

Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu
 100 105 110

Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Met Ser Phe Asp Ile Ile Lys Ser Arg
 115 120 125

Ala Leu
 130

B7822.ST25.txt

<210> 20
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 20

Met Val Leu His Asp Asp Cys Lys Leu Thr Phe Leu Glu Leu Lys Glu
 1 5 10 15

Arg Arg Thr Phe Arg Ser Ile Val Tyr Lys Ile Glu Asp Asn Met Gln
 20 25 30

Val Ile Val Glu Lys His His Tyr Lys Lys Met His Gly Glu Arg Glu
 35 40 45

Gln Ser Tyr Glu Glu Phe Ala Asn Ser Leu Pro Ala Asp Glu Cys Arg
 50 55 60

Tyr Ala Ile Leu Asp Ile Glu Phe Val Pro Gly Glu Arg Lys Ile Cys
 65 70 75 80

Phe Ile Ala Trp Ser Pro Ser Thr Ala Lys Met Arg Lys Lys Met Ile
 85 90 95

Tyr Ser Ser Thr Lys Asp Arg Phe Lys Arg Glu Leu Asp Gly Ile Gln
 100 105 110

Val Glu Phe His Ala Thr Asp Leu Thr Asp Ile Ser Leu Asp Ala Ile
 115 120 125

Arg Arg Arg Ile Asn
 130

<210> 21
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 21

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val Asp Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr Tyr Arg Phe Ile Ile Tyr
 20 25 30

B7822.ST25.txt

Lys Ile Asp Glu Lys Lys Lys Met Val Val Val Glu Lys Val Gly Glu
 35 40 45

Pro Val Leu Asn Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Ala Asn Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Phe Val Thr Glu Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
 115 120 125

Val Gly Leu Asp Val Ile Arg Gly Arg Ala Asn
 130 135

<210> 22
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 22

Met Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Leu Pro Trp Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Pro Ala Trp Ile Glu Val Pro Glu Lys Ser Lys Ser Ala Phe Trp Glu
 20 25 30

Leu Lys Arg Arg Lys Val His Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Asp Asp
 35 40 45

Arg Arg Glu Glu Ile Val Val Glu Lys Thr Gly Ala Pro Gly Glu Ser
 50 55 60

Tyr Asp Asp Phe Thr Ala Ser Leu Pro Ala Asp Asp Cys Arg Tyr Ala
 65 70 75 80

Val Tyr Asp Leu Asp Phe Val Ser Asp Asp Asn Cys Arg Lys Ser Lys

B7822.ST25.txt

85

90

95

Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Arg Ile Arg Ala Lys
 100 105 110

Thr Ile Tyr Ala Val Ser Arg Asn Gln Phe Arg His Glu Leu Asp Gly
 115 120 125

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

Val Leu Arg Gly Arg Ala Asn Arg Thr
 145 150

<210> 23
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 23

Met Ala Asn Ser Ser Ser Gly Val Ala Ile His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Asn Glu Leu Gln Ser Lys Arg Met His Arg Phe Ile Thr Phe
 20 25 30

Met Met Asp Asn Lys Gly Lys Glu Ile Ile Val Asp Lys Ile Gly Asp
 35 40 45

Arg Thr Thr Ser Tyr Glu Asp Phe Thr Ser Ser Leu Pro Glu Gly Asp
 50 55 60

Cys Arg Phe Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Leu Thr Ala Glu Asp Val
 65 70 75 80

Pro Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Leu Trp Ser Pro Asp Asn Ala Lys
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Asn Glu Arg Phe Lys Lys
 100 105 110

Glu Leu Asn Gly Ile Gln Leu Glu Val Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu
 115 120 125

B7822.ST25.txt

Ile Ser Leu Asp Ala Leu Lys Asp Arg Val Lys
 130 135

<210> 24
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 24

Met Ala Phe Val Arg Ser Arg Ala Asn Ala Ser Ser Gly Ile Gly Val
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Cys Lys Gln Thr Phe Leu Glu Leu Gln Arg Lys Lys Ser
 20 25 30

His Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Asp Asp Lys Cys Lys Glu Val Val
 35 40 45

Val Glu Lys Thr Gly Ser Ser Thr Glu Ser Phe Asp Asp Phe Met Asp
 50 55 60

Ser Leu Pro Glu Ser Asp Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe
 65 70 75 80

Val Thr Glu Glu Asn Cys Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Val Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Ser Val Ser Arg Ile Arg Ala Lys Met Leu Tyr Ala Thr Ser
 100 105 110

Lys Glu Arg Phe Arg Arg Glu Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Ile Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Ser Glu Leu Asp Ile Glu Leu Leu Arg Glu Arg Ala
 130 135 140

His
 145

<210> 25
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

B7822.ST25.txt

<400> 25

Met Ala Met Ala Tyr Lys Met Ala Thr Glu Gly Met Asn Val Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Cys Gln Arg Trp Phe Met Glu Met Lys Trp Lys Lys Val His Arg
 20 25 30

Phe Val Val Tyr Lys Ile Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Leu Val Asp
 35 40 45

Lys Val Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Leu Val Ala Ala Leu
 50 55 60

Pro Thr Asp Asp Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asn Cys Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro
 85 90 95

Thr Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ile Leu Tyr Ala Thr Ser Lys Gln
 100 105 110

Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Val Gln Ala Thr
 115 120 125

Asp Ser Ser Glu Met Gly Tyr Asp Val Ile Arg Gly Arg Ala Gln
 130 135 140

<210> 26

<211> 145

<212> PRT

<213> *Oryza sativa*

<400> 26

Met Ala Phe Met Arg Ser His Ser Asn Ala Ser Ser Gly Met Gly Val
 1 5 10 15

Ala Pro Asp Ile Arg Asp Thr Phe Leu Glu Leu Gln Met Lys Lys Ala
 20 25 30

Phe Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Val
 35 40 45

B7822.ST25.txt

Val Glu Lys Thr Gly Ala Thr Thr Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Leu Ala
 50 55 60

Ser Leu Pro Glu Asn Asp Cys Arg Tyr Ala Leu Tyr Asp Phe Asp Phe
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Asn Val Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Ser Thr Ser Arg Ile Arg Ala Lys Met Leu Tyr Ser Thr Ser
 100 105 110

Lys Asp Arg Ile Lys Gln Glu Leu Asp Gly Phe His Tyr Glu Ile Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Thr Glu Val Asp Leu Glu Val Leu Arg Glu Arg Ala
 130 135 140

His
 145

<210> 27
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 27

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Gly Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Ser Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Thr Phe
 20 25 30

Lys Ile Asp Glu Arg Thr Gln Gln Val Val Val Asp Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Pro Gly Asp Thr Tyr Asp Asp Phe Thr Ala Ser Met Pro Ala Ser Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ser Pro Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

B7822.ST25.txt

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Asp Ile Val Lys Ala Arg Ala Leu
 130 135

<210> 28
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 28

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Leu Ala Val Asn Asp Glu Cys Lys Phe
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Thr Arg Arg Gly Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asp Asp Lys Ala Met Glu Ile Lys Val Glu Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Thr Ala Glu Gly Tyr Glu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Tyr Asp Leu Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Phe Ser Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
 85 90 95

Thr Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Arg Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Cys Glu Ile Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Leu Asp Ile Ile Arg Ala Arg Ala His
 130 135

B7822.ST25.txt

<210> 29
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 29

Met Ala Met Ala Tyr Lys Met Ala Thr Glu Gly Met Asn Val Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Cys Gln Arg Trp Phe Met Glu Met Lys Trp Lys Lys Val His Arg
 20 25 30

Phe Val Val Tyr Lys Ile Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Leu Val Asp
 35 40 45

Lys Val Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Leu Val Ala Ala Leu
 50 55 60

Pro Thr Asp Asp Cys Arg Tyr Ala Val Phe Arg Thr Phe Glu Phe Arg
 65 70 75 80

His Arg Arg Gln Leu Pro Glu Glu Ala Arg Ser Phe Phe Ile Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Thr Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ile Leu Tyr Ala Thr Ser
 100 105 110

Lys Gln Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Val Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Ser Ser Glu Met Gly Tyr Asp Val Ile Arg Gly Arg Ala
 130 135 140

Gln
 145

<210> 30
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 30

Met Ser Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Cys Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

B7822.ST25.txt

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asn Glu Lys Val Gln Gln Val Val Val Asp Arg Leu Gly Gln
 35 40 45

Pro Gly Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Thr Ala Cys Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ala Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Asp Ile Val Lys Ser Arg Ala Leu
 130 135

<210> 31
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

<400> 31

Met Ala Asn Ala Thr Ser Gly Val Ala Val Ser Glu Glu Cys Lys Ala
 1 5 10 15

Arg Phe Gln Glu Leu Arg Ala Gly Arg Ala His Arg Phe Val Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asp Asp Ala Met Arg Gln Val Val Val Asp Arg Val Gly Pro
 35 40 45

Arg Asp Ala Gly Phe Asp Glu Leu Thr Ala Ser Leu Pro Ala Asp Gly
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Tyr Asp His Asp Phe Thr Val Ser Asp Ala Thr

B7822.ST25.txt

65

70

75

80

Ala Thr Ala Ala Ala Gly Glu Gly Gly Glu Ala Pro Arg Ser Lys Ile
85 90 95

Phe Phe Val Ser Trp Ser Pro Ala Ala Ala Asp Val Arg Ser Lys Met
100 105 110

Val Tyr Ala Ser Ser Asn Glu Gly Phe Lys Lys Glu Leu Asp Gly Val
115 120 125

Gln Ile Asp Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Leu Thr Leu Asp Val
130 135 140

Leu Lys Asp His Thr Ser
145 150

<210> 32
<211> 139
<212> PRT
<213> Triticum aestivum

<400> 32

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val Asp Asp Glu Cys Lys Leu
1 5 10 15

Lys Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Ile Tyr
20 25 30

Lys Ile Asp Asp Lys Lys Lys Met Val Val Val Glu Lys Val Gly Glu
35 40 45

Pro Ala Leu Asn Tyr Glu Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Thr Asn Glu
50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Phe Val Thr Glu Glu Asn Cys
65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Val Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Glu Arg Phe Lys Arg
100 105 110

B7822.ST25.txt

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Thr Glu
 115 120 125

Val Gly Phe Asp Val Ile Gln Gly Arg Ala Asn
 130 135

<210> 33
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 33

Met Ser Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Cys Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Ala Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asn Glu Lys Val Gln Gln Val Val Val Asp Arg Val Gly Glu
 35 40 45

Lys Thr Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Thr Ala Cys Leu Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ala Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Asp Ile Val Lys Gly Arg Ala Leu
 130 135

<210> 34
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

B7822.ST25.txt

<400> 34

Met Ala Asn Ala Ser Ser Gly Ala Gly Ile His Asp Asp Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Arg Phe Val Glu Leu Lys Ser Lys Arg Met His Arg Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

Arg Leu Glu Asn Gln Lys Glu Val Ile Val Asp Gln Thr Gly Glu Arg
 35 40 45

Glu Ala Thr Tyr Glu Asp Phe Thr Lys Thr Leu Pro Glu Asn Asp Cys
 50 55 60

Arg Phe Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Thr Thr Pro Glu Asp Val Pro
 65 70 75 80

Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Phe Trp Ser Pro Asp Thr Ala Lys Val
 85 90 95

Arg Ser Lys Met Thr Tyr Ala Ser Thr Asn Glu Lys Phe Lys Arg Thr
 100 105 110

Leu Asp Gly Ile Gln Ile Glu Met Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu Ile
 115 120 125

Ser Leu Asp Val Ile Lys Glu Arg Ala His
 130 135

<210> 35

<211> 139

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 35

Met Ala Asn Ala Arg Ser Gly Val Ala Val Asn Asp Glu Cys Met Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gly Glu Leu Gln Ser Lys Arg Leu His Arg Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

Lys Met Asp Asp Lys Phe Lys Glu Ile Val Val Asp Gln Val Gly Asp
 35 40 45

B7822.ST25.txt

Arg Ala Thr Ser Tyr Glu Asp Phe Thr Asn Ser Leu Pro Glu Asn Asp
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Val Thr Ala Glu Asp Val
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Leu Trp Ser Pro Asp Ser Ala Lys
 85 90 95

Val Lys Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Asn Gln Lys Phe Lys Ser
 100 105 110

Gly Leu Asn Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Ala Ser Glu
 115 120 125

Ile Ser Ile Asp Gln Ile Lys Asp Arg Ala Arg
 130 135

<210> 36
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 36

Met Ala Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Ser Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr Phe Arg Phe Ile Thr Phe
 20 25 30

Lys Ile Asn Glu His Ser Gln Gln Val Val Val Asp Arg Val Gly Gln
 35 40 45

Pro Gly Glu Thr Tyr Ala Asp Phe Thr Ala Thr Ile Pro Ala Asp Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ser Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

B7822.ST25.txt

Glu Leu Asp Gly Tyr Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Glu Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Thr Leu Asp Ile Val Lys Ala Arg Ala Leu
 130 135

<210> 37
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

<400> 37

Met Ala Met Ala Tyr Lys Met Ala Thr Glu Gly Met Asn Ile Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Cys Lys Arg Trp Phe Thr Glu Met Lys Trp Lys Lys Val His Arg
 20 25 30

Phe Val Val Tyr Lys Ile Asp Glu Arg Thr Arg Ala Val Leu Val Asp
 35 40 45

Lys Val Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Asp Glu Leu Val Ala Ala Leu
 50 55 60

Pro Gly Asp Asp Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Ser
 65 70 75 80

Val Asp Asn Cys Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ile Leu Tyr Ala Thr Ser Lys Gln
 100 105 110

Gly Leu Arg Arg Val Leu Glu Gly Val His Tyr Glu Val Gln Ala Thr
 115 120 125

Glu Arg Ser Glu Met Gly Phe Asp Val Ile Arg Glu Arg Ala Gln
 130 135 140

<210> 38
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum

B7822.ST25.txt

<400> 38

Met Ala Phe Met Arg Thr Ser Ser Asn Ala Ser Ser Gly Met Gly Val
 1 5 10 15

Ala Pro Asp Ile Arg Glu Thr Phe Leu Glu Leu Gln Met Lys Lys Ala
 20 25 30

Phe Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Val
 35 40 45

Val Glu Lys Thr Gly Ala Thr Thr Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Leu Ala
 50 55 60

Cys Leu Pro Glu Lys Asp Cys Arg Tyr Ala Leu Tyr Asp Phe Asp Phe
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Asn Val Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Asp Thr Ser Arg Ile Arg Ala Lys Met Leu Tyr Ser Thr Ser
 100 105 110

Lys Asp Arg Ile Lys Gln Glu Leu Asp Gly Phe His Tyr Glu Ile Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Thr Glu Val Glu Leu Asp Val Leu Arg Asp Arg Ala
 130 135 140

His
 145

<210> 39
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 39

Met Ala Asn Ala Ala Ser Gly Met Ala Val Asp Asp Asp Cys Lys Arg
 1 5 10 15

Arg Phe Leu Glu Leu Lys Ala Lys Arg Thr His Arg Phe Ile Ile Tyr
 20 25 30

B7822.ST25.txt

Arg Ile Asp Glu Lys Lys Lys Met Val Val Val Glu Gln Val Gly Lys
 35 40 45

Pro Val Leu Gly Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Ser Leu Pro Ala Asn Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Phe Val Thr Glu Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Ile Tyr Ala Ser Ser Lys Glu Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Asp Leu Gln Ala Thr Asp Ser Ala Glu
 115 120 125

Val Gly Leu Asp Val Ile Gln Gly Arg Ala Ser
 130 135

<210> 40
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 40

Met Ala Asn Ser Ser Ser Gly Leu Ala Val Asn Asp Glu Cys Lys Val
 1 5 10 15

Lys Phe Arg Glu Leu Lys Ser Arg Arg Ser Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Arg Ile Asp Asp Thr Asp Met Glu Ile Lys Val Asp Arg Leu Gly Gly
 35 40 45

Pro Asn Gln Gly Tyr Gly Asp Phe Thr Asp Ser Leu Pro Ala Asn Glu
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Leu Asp Phe Thr Thr Ile Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Phe Ser Trp Ser Pro Asp Thr Ala Arg

B7822.ST25.txt

85

90

95

Thr Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Arg Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Cys Glu Ile Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Leu Asp Ile Val Arg Ser Arg Thr Asn
 130 135

<210> 41
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 41

Met Ala Asn Ala Arg Ser Gly Val Ala Val Asn Asp Glu Cys Met Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gly Glu Leu Gln Ser Lys Arg Leu His Arg Phe Leu Thr Phe
 20 25 30

Lys Met Asp Asp Lys Phe Lys Glu Ile Val Val Asp Gln Val Gly Asp
 35 40 45

Arg Ala Thr Ser Tyr Glu Asp Phe Thr Asn Ser Leu Pro Glu Asn Asp
 50 55 60

Cys Arg Tyr Ala Ile Tyr Asp Phe Asp Phe Val Thr Ala Glu Asp Val
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Arg Ile Phe Tyr Ile Leu Trp Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 85 90 95

Val Lys Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Asn Gln Lys Phe Lys Ser
 100 105 110

Gly Leu Asn Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Ala Ser Glu
 115 120 125

Ile Ser Leu Asp Glu Ile Lys Asp Arg Ala Arg
 130 135

B7822.ST25.txt

<210> 42
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 42

Met Ala Met Ala Tyr Lys Met Ala Thr Glu Gly Met Asn Val Lys Glu
 1 5 10 15

Glu Cys Gln Arg Trp Phe Met Glu Met Lys Trp Lys Lys Val His Arg
 20 25 30

Phe Val Val Tyr Lys Ile Asp Glu Arg Ser Arg Ala Val Leu Val Asp
 35 40 45

Lys Val Gly Gly Pro Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Leu Val Ala Ala Leu
 50 55 60

Pro Gly Asp Asp Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr
 65 70 75 80

Val Asp Asn Cys Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp Ser Pro
 85 90 95

Ala Ala Ser Arg Ile Arg Ala Lys Ile Leu Tyr Ala Thr Ser Lys Gln
 100 105 110

Gly Leu Arg Arg Leu Leu Asp Gly Val His Tyr Glu Val Gln Ala Thr
 115 120 125

Asp Pro Ser Glu Met Gly Phe Asp Val Ile Arg Gly Arg Ala Gln
 130 135 140

<210> 43
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 43

Met Ala Phe Met Arg Ser Arg Ser Asn Ala Ser Ser Gly Met Gly Val
 1 5 10 15

Ala Pro Asn Ile Arg Glu Thr Phe Val Glu Leu Gln Met Lys Lys Ala
 20 25 30

B7822.ST25.txt

Phe Arg Tyr Val Ile Phe Lys Ile Glu Glu Lys Gln Lys Gln Val Val
 35 40 45

Val Glu Lys Thr Gly Ala Thr Thr Glu Ser Tyr Asp Asp Phe Leu Ala
 50 55 60

Ser Leu Pro Glu Asn Asp Cys Arg Tyr Ala Leu Tyr Asp Phe Asp Phe
 65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Asn Val Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ala Trp
 85 90 95

Ser Pro Ser Thr Ser Arg Ile Arg Ala Lys Met Leu Tyr Ser Thr Ser
 100 105 110

Lys Asp Arg Ile Lys Tyr Glu Leu Asp Gly Phe His Tyr Glu Ile Gln
 115 120 125

Ala Thr Asp Pro Ser Glu Val Asp Ile Glu Val Leu Arg Glu Arg Ala
 130 135 140

His
 145

<210> 44
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Zea mays

<400> 44

Met Ser Asn Ser Ala Ser Gly Met Ala Val Cys Asp Glu Cys Lys Leu
 1 5 10 15

Lys Phe Gln Glu Leu Lys Ala Lys Arg Ser Phe Arg Phe Ile Val Phe
 20 25 30

Lys Ile Asn Glu Asn Val Gln Gln Val Val Val Asp Arg Leu Gly Glu
 35 40 45

Pro Gly Glu Ser Tyr Asp Ala Phe Thr Ala Cys Phe Pro Ala Asn Glu
 50 55 60

B7822.ST25.txt

Cys Arg Tyr Ala Val Phe Asp Phe Asp Phe Val Thr Asp Glu Asn Cys
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Lys Ile Phe Phe Ile Ser Trp Ala Pro Asp Thr Ser Arg
 85 90 95

Val Arg Ser Lys Met Leu Tyr Ala Ser Ser Lys Asp Arg Phe Lys Arg
 100 105 110

Glu Leu Asp Gly Ile Gln Val Glu Leu Gln Ala Thr Asp Pro Ser Glu
 115 120 125

Met Ser Met Asp Ile Val Lys Ser Arg Ala Leu
 130 135

<210> 45
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 45
 atggcaaacg cttcatcagg tgctgggatc catgacgact gcaagctgag gttcgtggag 60
 ctcaagtcca agaggatgca ccgcttcata acctacaggc tggagaacca gaaggaggtc 120
 attgtggacc aaaccgggca gcgcgatgcc acctatgagg atttcaccaa gaccctccct 180
 gaaaacgact gccgattcgc agtgtttgac ttcgacttca ccaccccaga ggatgtgcca 240
 aagagcagga tcttctatat cttctgggtcc ccggacaccg caaaggtgag gagcaagatg 300
 acgtacgcga gcaccaacga gaagttcaag aggaccctgg acggcatcca gatcgagatg 360
 caggccaccg accccagcga aatcagcctg gacgtgatca aggagcgcgc aactag 417

<210> 46
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 46
 atggcaaacg cttcagcagg tgctgggatc catgacgact gcaagctgag gttcgtggag 60
 ctcaagtcca agaggatgca ccgcttcata acctacaggc tggagaacca gaaggaggtc 120
 attgtggacc aaaccgggca gcgcgatgcc acctatgagg atttcaccaa gaccctccct 180
 gaaaacgact gccgattcgc agtgtttgac ttcgacttca ccaccccgga ggatgtgcca 240
 aagagcagga tcttctatat cttctgggtcc ccggacaccg caaaggtgag gagcaagatg 300

B7822.ST25.txt

acgtacgcga gcaccaacga gaagttcaag aggacctgg acggcatcca gatcgagatg 360
 caggccaccg accccagcga aatcagcctg gacgtgatca aggagcgcgc aactag 417

<210> 47
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 47
 atggcaaacg ctgcgtcagg catggctgtg gacgacgaat gcaagctcaa gttcctggag 60
 ctgaaggcga agcgaacca ccgcttcac atctacaaga tagatgacaa gaagaagatg 120
 gttgtggtgg agaaggtcgg cgagcctgcc ctgaactatg aggacttcgc cgccagcctc 180
 cccaccaatg aatgcagata cgcgatattc gactatgact ttgtcactga ggagaactgc 240
 cagaagagca agatattctt cgtcgcattg tctcctgaca ccgcacgcgt gaggagcaag 300
 atgatctacg cgagctccaa ggagaggttc aagagggagc tcgatggcat ccaagtagag 360
 ctgcaggcga cagaccgac cgaggtcggc tttgatgtca tccaaggccg cgccaactg 419

<210> 48
 <211> 470
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 48
 atggcgtctg cggcggcgcc ggcggccttg gcgtggccat ccctgggtgg gaactcgcg 60
 gcgtggattg acgtcccga gcggagcaag agcgcgttca tggagctcaa gaggaggaag 120
 gtgcaccggt acgtgatatt caagatcgac gacagcacgg aggaggtcgt ggtcgagaag 180
 accggctcac ccgggaaag ctacgacgac ttcacggcct cgttgcccgt cgacgactgc 240
 cgctacgccg tttacgatct ggatttcgtc agcgacgaca actgccgcaa gagcaagatt 300
 ttcttcatct cctggtctcc tgatgattct cgcattcgtg caaagaccat atatgctgtg 360
 tccaggaatc aattccgcca tgagctcgac ggggtgact ttgagatcca ggcaactgac 420
 cctgatgaca tggacttggg agttctcagg gtccgtgcta atagaacctg 470

<210> 49
 <211> 431
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 49
 atggcaatgg cttacaagat ggcgacggag gggatgaaca tcaaggagga gtgcaagcgg 60

B7822.ST25.txt

tggttcacgg agatgaagtg gaagaaggtg caccgcttcg tggctctaaa gatcgacgag 120
 cgcacccgcg ccgtgctggt ggacaaggtg ggcggccccg gggaggggta cgaggagctc 180
 gtcgccgcgc tgcccaccga cgactgccgc tacgccgtct tcgacttcga cttcgtctcc 240
 gtcgacaact gccagaagag caagatcttc ttcacgcgat ggtcgccggc ggcgtcgagg 300
 atacgggcca agattctgta cgcgacgtcg aagcaaggcc tgcggcgggt gctggacggg 360
 gtccactacg aggtgcaggc caccgacccc tccgagatgg gcttcgacgt catcaggag 420
 cgcgcgcaat g 431

<210> 50
 <211> 438
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 50
 atggccttca tgcgcacctc ctccaatgca tcctctggca tgggagttgc tcctgatata 60
 agggagacat tcctggagct tcagatgaag aaggcatttc gctatggtat cttcaagata 120
 gaagaaaagc aaaagcaggt tgttgtggag aagacagggg ctacaactga gagttatgat 180
 gatttctctg cttgtctccc agagaacgac tgcagatatg cgctttatga ttttgacttt 240
 gttactgggg agaatgtgca gaaaagcaag attttcttca ttgcctggtc ccctgacaca 300
 tcccgcattc gagccaagat gctgtactcc acctccaagg accgcatcaa gcaagagctc 360
 gacgggttcc actacgagat ccaggcaact gacccgaccg aggtggagct cgacgtcctc 420
 cgtgaccggg cgcaactag 438

<210> 51
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 51
 atgtcgaatt ccgctcagg aatggctggt tgcgacgaat gcaaactcaa gttccaggaa 60
 ctcaaggcga agaggagctt ccgcttcatc gtgttcaaga tcaatgagaa ggtgcagcag 120
 gtgggtggtg acagggctcg ggaaaaaac gagagctacg atgatttcgc tgcctgcttg 180
 cctgctgacg agtgccgcta tgcggtattt gattttgact tcgtcactga tgagaactgc 240
 cagaagagca agatcttctt catctcttgg gctcctgaca catccagggt gaggagcaag 300
 atgctgtacg cgagctccaa ggaccgcttc aagagggagc tggacggcat ccagggtggag 360
 ctacaggcga ctgacccgag cgagatgagc atggacatcg taaaggcgcg agccctctg 419

B7822.ST25.txt

<210> 52
 <211> 504
 <212> DNA
 <213> *Hordeum vulgare*

<400> 52
 atggcgaact cggcgtcggg gatggccgtg agcgacgagt gcaagctcaa gttccaggac 60
 ctcaaggcga agcggagctt ccggttcata accttcaaga tcaacgagaa cacgcagcag 120
 gtggtggtgg acaggggtggg gcagcccggc gacacctacg ccgacttcac cgcctccatg 180
 cccgccgacg agtgccgcta cgcctcttc gacttcgact tcgtcaccga cgagaactgc 240
 cagaagagca agatattctt catctcctgg tccccggact cgtccagggt gaggagcaag 300
 atgctgtacg cgagctcaa ggacaggttc aagagggagc tggacggcat ccagggtggag 360
 ctgcaggcca ccgagcccag cgagatgagc atgggacatc gtcaaggcca gagccctctg 420
 aacagtccc tcgtcgtctc ttccattcca gactccaagg ccagcagctg gatccactac 480
 actgcatgtg catgccctac gtac 504

<210> 53
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 53
 atggcgaacg cggcatctgg aatggctgtg catgatgatt gcaagctgag atttctggaa 60
 ctgaaggcta aaaggacaca ccgtttcata gtttacaaga ttgaggagaa gcagaagcaa 120
 gttgttgttg agaaagtgg tcaaccgatc caaacttacg aggagtgtgc agcatgtctt 180
 ccagctgatg aatgccgtta cgccatttac gatcttgact ttgtaactgc tgagaattgc 240
 cagaagagca agatcttctt catcgcgtgg tgtccggata ttgctaaggt gagaagcaag 300
 atgatctacg cgagctcaa ggacaggttc aagagggaac tagatgggat tcaagtagag 360
 ctacaggcaa ctgatccaac agagatggat ctcgatgttt tcaggagccg tgccaactaa 420

<210> 54
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 54
 atggcaaacg cggcatcggg aatggctgtg catgatgatt gcaagctgaa atttatggaa 60
 ctgaaggcga aaagaacatt ccgtaccata gtctacaaga ttgaggataa gcaagtgatt 120

B7822.ST25.txt

gtagagaaac tcggtgaacc tgaacaatca tatgatgact ttgcagctag tcttccagct 180
 gatgattgcc gatattgcat ttacgatttc gactttgtca ctgCGGAGAA ctGCCAGAAG 240
 agcaagatct tcttcattgc atggTctccg gacactGCCA aagtGAGAGA caagatgatt 300
 tacgCGAGCT ctaaagatag gttcaagaga gaactagatg gaattcaagt ggaacttcaa 360
 gctactgatc caacagaaat gggTcttgat gttttcaaaa GCCGCACCAA ctaa 414

<210> 55
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 55
 atggcTaatg cagcatcagg aatggcagtc catgatgact gcaagctgaa atttatggaa 60
 ttgaagacga aaaggacaca ccgTttcatc atttacaaga ttgaggagct gcagaaacaa 120
 gtgattgttg agaaaatcgg tgaaccgggt caaacccatg aggaccttgc tgcaagtctt 180
 ccagctgatg aatgccgcta tgccattttc gattttgatt ttgtcagttc tgagggtgtc 240
 ccaaggagca ggattttttt cgtggcatgg tctccggaca cagcaagagt gagaagcaag 300
 atgatctatg cgagctcaa ggacaggttc aagagagaac tagacggaat tcaggtcgag 360
 cttcaggcaa ccgatccaac cgagatggat cttgatgttt tcaaaagccg agccaattga 420

<210> 56
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 56
 atggcTaatg ctgCGTcagg aatggcagtc catgatgact gcaagctaag atttctggaa 60
 ctgaaggcga aaaggacaca ccgTttcatt gtctacaaga ttgaggagaa gcagaagcaa 120
 gtgattgttg agaaagttgg tgaacctatt ctaacttacg aggactttgc agcaagtctt 180
 ccagctgacg aatgccgata cgccatttat gatttcgact ttgtcactgc agagaattgc 240
 cagaagagca agattttctt cattgcatgg tgtcccagc tagcaaaggt gagaagcaag 300
 atgatctatg cgagctctaa ggacaggttc aagcgtgaac ttgatggaat tcaagtggag 360
 cttcaagcaa ctgatccaac tgagatggat cttgatgttt tgaaaagccg cgtcaactaa 420

<210> 57
 <211> 432
 <212> DNA

B7822.ST25.txt

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 57

```

atggcgatgg ctttcaagat ggcgacgacg gggatgcgtg tgacggatga gtgtacgagt      60
tcattcatgg acatgaaatg gaagaaagt  catagataca tcgttttcaa gatcgaagag      120
aagtcacgta aagtcaccgt cgataaagtc ggcggcgccg gtgaaagcta ccacgatctc      180
gaagattctt taccggtgga tgattgtcgc tacgctgtct ttgatttcga ctttgtcacc      240
gtcgataact gccgcaagag caagatcttc ttcatatgat ggtcaccgga ggcaccaaag      300
ataagggcaa agatattgta cgcaacgtcg aaagatgggc tgaggagagt gttggaaggg      360
attcactatg aacttcaagc tactgatccg acggagatgg gtttcgatat tatccaagac      420
cgtgccaaat ag                                                                432

```

<210> 58

<211> 441

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 58

```

atgtctttca gaggacttag caggccaaat gcaatatctg gaatgggtgt tgcagatgag      60
agcaaaacca catttctaga gcttcaaagg aaaaaaactc atcgctatgt ggtcttcaag      120
attgatgaat ccaaaaaaga agttgttggt gagaaaactg gaaatcctac agagagctac      180
gatgatttct tagcttctact tcctgataat gactgcagat acgctgttta tgactttgat      240
ttcgttactt ctgagaattg tcaaaagagc aaaatcttct tctttgcttg gtctccttcg      300
acctctggaa ttcgagccaa ggtgctttac tcgacttcta aagaccagtt aagtagggag      360
cttcaagggg ttactatga gattcaagct actgatccta ctgaggttga tcttgaagtg      420
ttacgcgaac gagcgaactg a                                                                441

```

<210> 59

<211> 414

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 59

```

atggcgaacg cggcgtcggg gatggcgggtg gaggacgagt gtaagctgaa gtttttgag      60
ctaaaagcga agagaaacta taggttcata atattcagga tagatggaca acaagtgggtg      120
gtagaaaagc tgggaagccc ccaagagAAC tacgacgatt tcaccaatta cctaccgcca      180
aatgaatgcc gctacgccgt ttatgacttc gacttcacca ctgctgagaa tatccagaag      240

```

B7822.ST25.txt

agcaagatct tcttcatagc atggtcaccg gattcatcta gagtaaggat gaagatggtg 300
 tatgcgagct caaaggacag gttcaagagg gaattggatg gtattcaggt ggagttacaa 360
 gccactgacc cgagcgagat gagtctcgac atcatcaaaa gtcgagctct ctag 414

<210> 60
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 60
 atggctaatt cagcgtctgg gatgcatgtg aatgatgaat gcaagattaa gttcttagag 60
 ttgaaagcaa agaggactta caggttcatt gtgttcaaaa ttgatgagaa ggcacagcaa 120
 gtgcaaatag aaaagcttgg gaatccagaa gaaacttacg acgattttac cagctctatc 180
 cccgatgacg aatgccgata cgctgtctac gattttgatt tcaccacaga ggacaattgt 240
 cagaagagca agatcttttt catcgcgctgg tcacctgata catcgagagt tcggagtaag 300
 atgttgatg caagctcaaa agacaggttc aagagagaaa tggaaggaat tcaagttgaa 360
 ttgcaagcaa ctgatcctag tgagatgagc cttgacatca tcaaaggacg actcaatctc 420
 tga 423

<210> 61
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 61
 atgacggatg attgcaagaa atcgttcatg gagatgaaat ggaagaaagt gcatagatac 60
 gtcgtttaca aactcgagga gaagtctcgg aaagtcaccg tcgacaaggt tggtgccgcc 120
 ggcgagagct acgacgatct cgctgcttct ttgccggagg atgactgtcg ttacgccgtg 180
 tttgatttcg attacgtcac cgctcgataac tgctgatatga gcaagatctt cttcataact 240
 tggtcgccgg aggcttcaag gataaggag aagatgatgt acgcgacgtc gaagagcggg 300
 ctgagaagag tgttggatgg tgttcactac gagcttcaag ccaccgacc aaccgagatg 360
 ggatttgata aaatccagga ccgggccaaa tga 393

<210> 62
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 62

B7822.ST25.txt

atggctaatt cagcgtctgg gatgcacggt agcgatgagt gcaagctcaa gttcttggag 60
 ttaaaagcaa agaggaacta taggttcatt gtgttcaaaa ttgatgagaa ggctcagcaa 120
 gttatgatag acaagcttgg gaatccagaa gaaacttacg aagatttcac cagatctatt 180
 cccgaggatg agtgccgata tgctgtctat gactatgatt tcaccacccc tgagaactgc 240
 cagaagagca aaatcttttt catcgcatgg tcacctgata catcaagagt gaggagtaag 300
 atgttgtatg caagctcaaa ggacaggttc aagagggaaat tggatgggat tcaagttgaa 360
 ttgcaagcaa cagatcctag cgagatgagc ctcgacatca tcaagggacg agtcaatctc 420
 tga 423

<210> 63
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 63
 atggcagtgg aggacgagtg caagctgaag tttttggagc tcaagtcgaa aagaaactat 60
 cgattcataa tattcaggat agacgggcaa caagtgggtg tcgaaaagtt aggaaacccc 120
 gatgagactt acgatgattt caccgcctcc ctccctgcga acgagtgccg ctatgcagtc 180
 ttcgactttg acttcatcac cgatgaaaat tgccagaaga gcaaaatctt cttcattgca 240
 tggtcaccag attcatcaag ggtgaggatg aagatgggtg atgcaagctc taaggataga 300
 tttaagagag aattggacgg cattcaggtg gagttacaag ccaactgatcc tagcgagatg 360
 agcttcgaca ttatcaaaag ccgagctctc tag 393

<210> 64
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 64
 atggttttgc atgatgactg caagctaaca ttcttggaac tgaaggagag acgaacattc 60
 cgttccatag tctacaagat tgaggacaac atgcaagtga ttgtagagaa acatcactac 120
 aaaaaaatgc atggcgaacg tgaacaatca tatgaggagt ttgcaaacag tcttccagct 180
 gatgaatgcc gatatgccat tttggatata gaattcgtcc caggggagag aaagatttgc 240
 ttcacgcggt ggtctccatc cactgccaaag atgagaaaga agatgattta ctcgagcact 300
 aaggataggt tcaagagaga actagatgga attcaagtgg agtttcacgc aactgatcta 360
 accgatataa gtcttggatgc tatcagacgc cgcacatcaact aa 402

B7822.ST25.txt

<210> 65
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 65
 atggcgaatg cagcatctgg gatggctgtg gacgatgagt gcaagctcaa gttcctggag 60
 ctgaaggcaa agaggacctt ccgcttcata atttacaaga tagacgagaa gaagaagatg 120
 gttgtcgtgg agaaggttgg cgagcccgtt ctgaactacg acgattttgc cgctagcctc 180
 cctgccaacg aatgcagata cgccatattc gactacgatt tcgtgaccga ggagaactgc 240
 cagaagagca agatattctt cattgcatgg tctcctgata catcgcgctg gagaagcaag 300
 atgatctacg cgagctccaa ggacaggttc aagagggagc tcgacggcat tcaggtggag 360
 ctccaggcga ccgatccaac tgaggttggc ctcgacgtga tcagaggccg tgcaaaactg 419

<210> 66
 <211> 461
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 66
 atggtggcgg cggcggcggc ggtggtgcca tgggggtggcg gcggtcgcg ggcgtggatc 60
 gaggtgccgg agaagagcaa gagcgcgttc tgggagctga agaggaggaa ggtgcaccgc 120
 tacgtgattt tcaagatcga cgacaggcgg gaggagatcg tcgtcgagaa gaccggcgcg 180
 ccgggggaga gctacgacga cttcacggcg tcgctgcccg ccgacgactg ccggtacgcc 240
 gtctacgatc tggatttcgt cagcgacgac aactgcagga agagcaagat attcttcata 300
 tcatgggtccc cttctgtttc ccgcatccga gccaaagacca tatacgccgt gtcgaggaac 360
 caatttcggc acgagcttga cgggtgtcac tttgagattc aggccacgga ccctgatgac 420
 atggatttgg aagttctcag gggccgtgct aatagaacct g 461

<210> 67
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 67
 atggcaaatt catcatctgg agttgcaatt catgatgatt gcaagctgaa gttcaatgag 60
 ctacagtcca aaaggatgca ccgcttcata actttcatga tggataacaa ggggaaagag 120
 atcattgtgg acaagattgg ggatcgcaca acaagctatg aggatttcac tagcagcctg 180

B7822.ST25.txt

cctgaagggg actgccgggt tgcaatctat gactttgact tccttactgc agaggatgtg 240
 ccaaagagca ggatattcta tatcttatgg tcccagaca atgcaaaagt gaggagcaag 300
 atgctttatg ctagctccaa cgaaagattc aagaaggagc tgaatggcat tcagttgaa 360
 gtgcaggcta ctgacgccgg cgaaatcagt ctcgatgcgc tcaaagatcg tgtgaaataa 420

<210> 68
 <211> 437
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 68
 atggcattcg tcagatcacg cgcaaatgct tcctctggaa tcggtgtagc tgccgagtgc 60
 aagcagacat ttctggagct tcagaggaag aaatcacacc gctatgtcat cttcaagatc 120
 gacgacaagt gcaaggaggt cgtcgtcgaa aagacagggt catcgaccga gagcttcgac 180
 gatttcatgg actcactccc tgaatctgac tgccgctacg ccatctacga cttcgacttc 240
 gtcaccgagg agaactgcca gaagagcaag atcttcttcg tcgcatggtc gccttcgggt 300
 tctcgcatcc gcgccaagat gttgtatgct acctccaaag aacggttcag gagagagctg 360
 gatgggtgtgc actatgagat tcaggcaact gatccgtcgg agctggacat tgagcttctt 420
 agagagcgtg ctcattg 437

<210> 69
 <211> 431
 <212> DNA
 <213> *Oryza sativa*

<400> 69
 atggcaatgg cttacaagat ggcgacggag gggatgaacg tgaaggagga gtgccagagg 60
 tggttcatgg agatgaagtg gaagaagggt caccggttcg tgggtgtacaa gatcgacgag 120
 cggtcgctgg cggtgctggg ggacaagggt ggcggccccg gcgaagggtg cgaggagctc 180
 gtcgccgctg tgcccaccga cgactgccgc tacgccgtct tcgacttcga cttcgtcacc 240
 gtcgacaact gccagaagag caagatcttc ttcacgcct ggtcaccgac cgcacgagg 300
 ataagagcca agattctgta cgcgacgtcg aagcaagggc tgaggcgggt gcttgacggg 360
 gtccactacg aggtgcaagc cacggactcc tccgagatgg gctacgacgt catccgaggc 420
 cgcgctcagt g 431

<210> 70

B7822.ST25.txt

<211> 438

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 70

atggcgttca	tgcgttccca	ctccaatgca	tcctccggtg	tggggggttc	tcctgacatc	60
agggacacat	tccttgagct	tcagatgaag	aaagcatttc	gctatgttat	cttcaaaatc	120
gaggaaaagc	aaaagcaagt	tgttgtggag	aagaccgggg	caacaactga	gagttatgat	180
gatttcctgg	catctctccc	agaaaatgac	tgacagatat	ccctctatga	ttttgacttt	240
gttactgggg	agaatgtgca	aaagagcaag	attttcttca	tcgcctggtc	tccatcaaca	300
tcccggatcc	gtgctaagat	gctgtactcc	acctccaagg	atcgcatcaa	gcaagaactt	360
gatggattcc	actacgagat	ccaggcaacc	gacccaactg	aggtagacct	tgaggtcctc	420
cgggagcggg	ctcattaa					438

<210> 71

<211> 420

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 71

atggcgaact	cagcgtcggg	gatggccgtg	ggcgacgagt	gcaagctcaa	gttccaggag	60
ctcaagtcga	agaggagctt	ccgcttcatc	acgttcaaga	tcgacgagcg	gacgcagcag	120
gtggtcgtgg	acaggctggg	ccagccgggc	gacacctacg	acgacttcac	cgctccatg	180
cccgccagcg	agtgccgcta	cgccgtcttc	gacttcgact	tcgtcaccga	cgagaactgc	240
cagaagagca	agatcttctt	catctcctgg	tcgccggaca	cgtcgaaggt	gaggagcaag	300
atgctgtacg	cgagctccaa	ggaccggttc	aagagggagc	tggacgggat	ccaggtggag	360
ctgcaggcga	ccgatcccag	cgagatgagc	atggacatcg	tcaaagcgag	agccctctga	420

<210> 72

<211> 420

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 72

atggcgaatt	ctgcgtcagg	gctggcggtg	aacgacgagt	gcaagttcaa	gttccaggag	60
ctgaagacga	ggaggggggtt	caggttcatc	gtgttcaaga	tcgacgacaa	ggccatggag	120
atcaagggtg	agaggctcgg	gcagactgcc	gagggctacg	aggacttcgc	cgccaccctc	180
cccgccgacg	agtgccgcta	cgccgtctac	gacctcgact	tcgtcaccga	cgagaactgc	240

B7822.ST25.txt

cagaagagca agatcttctt cttctcctgg tcgcctgaca cggcgaggac aaggagcaag 300
 atgctgtacg cgagctccaa ggacaggttc aggagggagc tggacggaat ccagtgcgag 360
 attcaggcca cagaccccag cgagatgagc ctcgacatca tcagagccag agctcactga 420

<210> 73
 <211> 437
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 73
 atggcaatgg cttacaagat ggcgacggag gggatgaacg tgaaggagga gtgccagagg 60
 tggttcatgg agatgaagtg gaagaagggtg caccggttcg tgggtgtacaa gatcgacgag 120
 cggtcgcgcg ccgtgctggt ggacaagggtg ggcggccccg gcgaagggtta cgaggagctc 180
 gtcgccgcmc tgcccaccga cgactgccgc tacgccgtct tccggacttt cgaatttcgt 240
 caccgtcgac aactgccaga agaggcaaga tctttcttca tcgcctggtc accgaccgca 300
 tcgaggataa gagccaagat tctgtacgcg acgtcgaagc aagggtgag gcgggtgctt 360
 gacgggtcc actacgaggt gcaagccacg gactcctccg agatgggcta cgacgtcatc 420
 cgaggccgcg ctcaagtg 437

<210> 74
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 74
 atgtcgaatt cggcgtcggg aatggccgtg tgtgacgaat gcaaactcaa gttcctggaa 60
 cttaaggcga aaaggagctt ccgcttcacg gtgttcaaga tcaatgagaa ggtccagcag 120
 gtggtggtgg acaggttggg gcagccgggt gagagctatg acgacttcac tgcttgctta 180
 ccagcagatg agtgccgcta cgcggtatth gattttgact ttgtcactga tgaaaactgc 240
 cagaagagca agatattctt catctcctgg gctcctgata catcaagggt gaggagcaag 300
 atgctgtatg ctagctccaa ggatcggttc aagagggagc tggacggcat ccagggtggag 360
 ctgcaggcca ctgacccgag tgagatgagc atggacatcg tcaagtcgcg agccctctga 420

<210> 75
 <211> 453
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 75

B7822.ST25.txt

atggcgaacg cgacgtcggg tgtggcgggtg agcgaggagt gcaagggcgag gttccaggag 60
 ctgagggcg ggcgggcca caggttcgtg gtgttcaaga tcgacgacgc gatgcggcag 120
 gtggtggtcg acaggggtggg cccacgcgac gccggcttcg acgagctcac cgccagcctc 180
 cccgccgacg gctgccgcta cgccgtgtac gaccacgact tcaccgtcag cgacgccacg 240
 gccacggcg ggcgggcca caggttcgtg gtgttcaaga tcgacgacgc gatgcggcag 300
 tggtcgccgg cggcggcggg cgtgaggagc aagatgggtgt acgagctcac cgccagcctc 360
 ttcaagaagg agctcgacgg cgtccagatc gacctgcagg ccaccgaccc cagcgagctc 420
 accctcgacg tgctcaagga ccacacctcc taa 453

<210> 76
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 76
 atggcgaacg cggcatcggg catggctgtg gacgacgaat gcaagctcaa gttcctggag 60
 ctgaaggcga agcgaacca ccgcttcac atctacaaga tagacgacaa gaagaagatg 120
 gttgttgtgg agaaagtcgg cgagcctgcc ctgaactatg aggactttgc tgccagcctc 180
 cccaccaatg aatgcagata cgcgatattc gactatgact ttgtcaccga ggagaactgc 240
 caaaagagca agatattctt cgtcgcgatg tctcctgaca ccgcacgcgt gaggagcaag 300
 atgatctacg cgagctcaa ggagagggtc aagagggagc tcgacggcat ccaggtggag 360
 ctgcaggcga cagacccgac cgaggtcggc tttgatgtga tccaaggccg tgccaactg 419

<210> 77
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 77
 atgtcgaatt ccgctcagg aatggccggt tgccgacgaat gcaaactcaa gttccaggaa 60
 ctcaaggcga agaggagctt ccgcttcac gtgttcaaga tcaatgagaa ggtgcagcag 120
 gtggtggtgg acaggggtcgg ggaaaaaacc gagagctacg atgatttcac agcctgcttg 180
 ccagctgacg agtgccgcta tgcagtgttt gattttgact tcgtcactga tgagaactgc 240
 cagaagagca agatcttctt catctcttgg gctcctgaca catcaagggt gaggagcaag 300
 atgctgtacg cgagctcaa ggaccgcttc aagagggagc tggacggcat ccaggtggag 360
 ctacaggcga ccgacccgag cgagatgagc atggacatcg taaaggggag agccctctg 419

B7822.ST25.txt

<210> 78
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 78
 atggcaaacg catcatccgg agctgggacg catgatgact gcaagctgag gtttgtggag 60
 ctcaagtcca agaggatgca ccgcttcata acctacaggc tggagaacca gaaggaggtc 120
 attgtggacc aaactgggga gcgagaggcc acctatgagg acttcaccaa gaccctccct 180
 gagaatgact gccgattcgc ggtgttcgac ttcgacttca ccaccccgga ggatgtgcca 240
 aagagcagga tcttctatat cttctggtcc ccggacaccg caaaggtgag gagcaagatg 300
 acgtacgca gcaccaacga gaagttcaag aggaccctgg acggcatcca gatcgagatg 360
 caggccactg accccagcga aatcagcctg gacgtgatca aggagcgcgc gcactaa 417

<210> 79
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 79
 atggcaaatg caagatcggg tgctcgtgtg aatgacgagt gcatgctgaa gtttggcgag 60
 ctgcagtcga agaggctgca ccgcttcata acttacaaga tggatgacaa gttcaaggag 120
 atagttgtgg accaggttgg ggatcgtgct accagctacg aggacttcac aaacagcctc 180
 cctgagaatg actgccgata cgcaatctat gattttgact ttgtgactgc agaggatgtc 240
 cagaagagca ggatattcta tatcctatgg tccccagact ctgccaaagg gaagagcaag 300
 atgctttacg caagctctaa ccaaaagttc aagagtgggc tcaatggcat tcaggtggag 360
 ctccaggcta cagatgcaag tgaatcagc attgatcaga tcaaggatcg ggcacgctag 420

<210> 80
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 80
 atggcgaact cggcgtcggg catggccgtg agcgacgagt gcaagctcaa gttccaggag 60
 ctcaaggcga agcggacctt ccggttcac acgttcaaga tcaacgagca ctgcgagcag 120
 gtggtggtgg accgggtggg gcaaccgggc gagacctacg ccgacttcac cgccaccatc 180
 cccgccgacg agtgccgcta cgccgtcttc gactttgact tcgtcaccga cgagaactgc 240

B7822.ST25.txt

cagaagagca agatcttctt catctcctgg tccccggaca cgtccagggt gaggagcaag 300
 atgctgtacg cgagctccaa ggacaggttc aagagggagc tggacggcta ccagggtggag 360
 ctgcaggcca ccgaaccag cgagatgacg ttggacatcg tcaaggccag agccctctg 419

<210> 81
 <211> 432
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 81
 atggcaatgg cttacaagat ggcgacggag gggatgaaca tcaaggagga gtgcaagcgg 60
 tggttcacgg agatgaagtg gaagaaggtg caccgcttcg tggctacaa gatcgacgag 120
 cggacgcgcg ccgtgctggt ggacaaggtg ggcggccccg gggaggggta cgacgagctc 180
 gtcgccgcgc tgcccggcga cgactgccgc tacgccgtct tcgacttcga cttcgtctcc 240
 gtcgacaact gccagaagag caagatcttc ttcacgcat ggtcgccggc ggcgtcgagg 300
 ataaggcca agatcctgta cgcgacgtcg aagcaaggcc tgcggcgggt gctggagggg 360
 gtccactacg aggtgcagge caccgagcgc tccgagatgg gcttcgacgt catcagagag 420
 cgcgcgcaat ga 432

<210> 82
 <211> 437
 <212> DNA
 <213> Triticum aestivum

<400> 82
 atggccttca tgcgcacctc ctccaatgca tcctctggca tgggagttgc tcctgatata 60
 agggagacat tcctggagct tcagatgaag aaggcatttc gctatgttat cttcaaaatc 120
 gaagaaaagc aaaaacaggt tgttgtggag aagacagggg ctacaactga gagttatgat 180
 gatttcctgg cttgtctccc agaaaaggac tgcagatatg ccctttatga ttttgacttt 240
 gttactgggg agaatgtgca gaaaagcaag attttcttca ttgcctggtc ccctgacaca 300
 tcccgcatcc gcgccaagat gctgtactcc acctccaagg accgcatcaa gcaggagctc 360
 gacgggttcc actacgagat ccaggcaact gacccgaccg aggtggagct cgatgtcctc 420
 cgcgaccggg cgcaacta 437

<210> 83
 <211> 419
 <212> DNA

B7822.ST25.txt

<213> Zea mays

<400> 83

```
atggcaaacg cggcgtcagg gatggccgtg gacgacgact gcaagcgccg gttcctggag      60
ctcaaggcca agaggacgca ccgcttcata atctacagga tcgacgagaa gaagaagatg      120
gtggtggtgg agcaggtggg caagcccgtg ctcggctacg acgacttcgc cgccagcctc      180
cccgccaacg agtgcaggta cgccatcttc gactacgact tcgtcaccga ggagaactgc      240
cagaagagca agatcttctt catcgcttgg tctcctgaca cggcgcgcgt gaggagcaag      300
atgatctacg ccagctccaa ggagaggttc aagcggggagc tggacggcat tcaggtggat      360
ctccaggcca ccgactccgc cgaggttggc cttgacgtca tccagggccg tgcaagctg      419
```

<210> 84

<211> 419

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 84

```
atggcgaact cgtcgtccgg ccttgccgtg aacgacgagt gcaaggtgaa gttccgggag      60
ctgaagtgcg ggcggagctt ccggttcata gtgttcagga tcgacgacac ggacatggag      120
atcaagggtg accgcctcgg cggaccgaac cagggctacg gcgacttcac cgacagcctc      180
cccgccaacg agtgccgcta cgcgatctac gacctcgact tcaccacat cgagaactgc      240
cagaagagca agatcttctt cttctcctgg tcccctgaca ctgcacgcac caggagcaag      300
atgctgtacg ccagctccaa ggacaggttc aggagggagc tggacggcat ccagtgcgag      360
atccaggcca ccgaccccag cgagatgagc ctcgacatcg tcaggagccg gaccaactg      419
```

<210> 85

<211> 419

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 85

```
atggcaaacg cgagatcggg tgtcgtctgt aatgacgagt gcatgctcaa gttcggcgag      60
ctgcagtcga agaggctgca ccgcttccta actttcaaga tggacgacaa gttcaaggag      120
atcgttgtgg accaggtcgg ggatcgcgct accagctacg aggacttcac aaacagcctc      180
cccgagaatg actgccgata cgcgatctat gatttcgact ttgtcactgc agaagatgtc      240
cagaagagca ggatcttcta tatcctatgg tcccatacct ccgccaaggt gaagagcaag      300
atgctttatg caagctcaaa ccaaaaattc aagagtgggc tcaatggcat tcaggtggaa      360
```

B7822.ST25.txt

ctgcaggcta ctgatgcaag tgaaatcagc cttgatgaga tcaaggatcg ggctcgcta 419

<210> 86
 <211> 431
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 86
 atggcgatgg cgtacaagat ggcgacggag gggatgaacg tgaaggagga gtgccagcgc 60
 tggttcatgg agatgaagtg gaagaagggtg caccgcttcg tgggtgtacaa gatcgacgag 120
 cggtcgcgcg ccgtgctggg ggacaagggtg ggcggccccg ggaagggtta cgaggagctc 180
 gtggccgcgc tgcccggcga cgactgccgc tacgccgtct tcgacttcga cttcgtcacc 240
 gtcgacaact gccagaagag caagatcttc ttcatcgcct ggtcaccggc ggcgtcgagg 300
 atcagggcca agatcctgta cgcgacatcg aagcaaggcc tgcggcggct gctggacggg 360
 gtccactacg aggtgcaggc caccgacccc tctgagatgg gcttcgacgt catcagaggc 420
 cgcgcgcaat g 431

<210> 87
 <211> 437
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 87
 atggccttca tgcgctcccg ctcaaagca tcttctggca tgggagttgc tcctaacatt 60
 agggagacat tcgtcgagct tcaaaggaag aaggcattcc gatatgttat cttcaaaatc 120
 gaagagaagc aaaagcagggt ggttgtggag aagacagggg ctactactga aagctatgat 180
 gacttttttg cctctctccc agagaatgac tgccgatatg cgctgtatga ttttgatttt 240
 gttactgggg agaatgtgca gaaaagcaag attttcttca ttgcctggtc cccatcgaca 300
 tcccgcatag gtgctaagat gctgtactcc acgtcgaagg accgcatcaa gtacgagctt 360
 gacgggttcc actacgaaat ccaggcgacc gacccatcgg aggtggacat cgaggttctc 420
 cgggagcggg ctactg 437

<210> 88
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Zea mays

<400> 88
 atgtcgaact cggcgtcggg aatggccgtc tgtgatgaat gcaagctcaa gttccaggag 60

B7822.ST25.txt

ctcaaggcaa agaggagctt ccgcttcatc gtgttcaaga tcaacgagaa cgtgcagcag 120
 gtggtggtgg acaggctagg ggagccaggc gagagctacg acgccttcac ggcttgcttc 180
 cccgccaacg agtgccgcta cgccgtgttc gattttgact tcgtcactga cgagaactgc 240
 cagaagagca agatcttctt tatctcttgg gccccggata catcgagggt gagaagcaag 300
 atgctgtacg cgagctccaa ggaccggttc aagagggagc tggatggcat tcaggtggag 360
 ctacaagcaa ccgacccgag cgaaatgagc atggacatcg tcaagtcgcg agccctctg 419

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> consensus sequence I

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(11)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 89

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Cys Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

<210> 90
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> consensus sequence II

B7822.ST25.txt

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(18)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 91

Arg Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Ala Thr Asp Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa

<210> 92

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 92

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg tggatcccc gggctgcagg 50

<210> 93

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 93

ggggaccact ttgtacaaga aagctggggtt agggcgaatt gggtagcggg 50

<210> 94

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 94

tttaagcttg ccacatggc aaacgcttca gcaggctgctg gg 42

<210> 95

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

B7822.ST25.txt

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 95
gttacgcgctc tagtgtgcgc gctccttga 29

<210> 96
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 96
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg ccaccatggc aaacgcttca tcagg 55

<210> 97
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 97
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt agtgtgcgcg ctccttga 48

<210> 98
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 98
gcgaagcttg ccaccatggt gagcaagggc gag 33

<210> 99
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 99
aagacgcggt tagaggcggg acttgtacag ctcg 34