

(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
24. März 2011 (24.03.2011)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/032537 A1

- (51) **Internationale Patentklassifikation:**
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
- (21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE2010/001081
- (22) **Internationales Anmeldedatum:**
15. September 2010 (15.09.2010)
- (25) **Einreichungssprache:** Deutsch
- (26) **Veröffentlichungssprache:** Deutsch
- (30) **Angaben zur Priorität:**
10 2009 041 333.2
15. September 2009 (15.09.2009) DE
- (71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):** KWS SAAT AG [DE/DE]; Grimsehlstrasse 31, 37555 Einbeck (DE).
- (72) **Erfinder; und**
- (75) **Erfinder/Anmelder (nur für US):** KRAUS, Josef [DE/DE]; Negenbornerweg 8, 37574 Einbeck (DE). MENZE, Andreas [DE/DE]; Hölleweg 8A, 37077 Göttingen (DE). WURBS, David [DE/DE]; Backofenstrasse 42, 37574 Einbeck (DE).
- (74) **Anwälte:** POHL, Manfred et al.; POHL & PARTNER, Kirchenhang 32 b, 21073 Hamburg (DE).
- (81) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**
— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** INHIBITION OF THE RUNNING TO SEED AND FLOWERING OF A SUGAR BEET PLANT

(54) **Bezeichnung :** INHIBIERUNG DES SCHOSSENS UND BLÜHENS EINER ZUCKERRÜBENPFLANZE

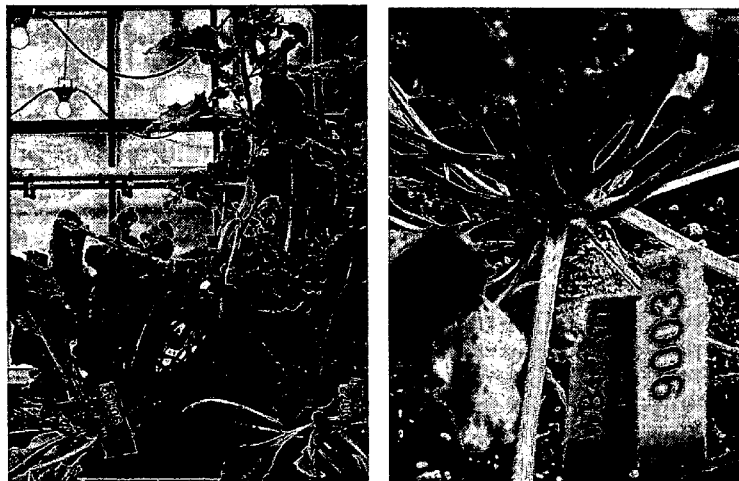


Fig. 2

(57) **Abstract:** The invention relates to means for inhibiting the running to seed and flowering of a sugar beet plant, for example, an isolated nucleic acid having a sequence or partial sequence of SEQ ID NO 1-3, and which can be used for producing a sugar beet, in which the running to seed and flowering is inhibited after vernalisation.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zum Inhibieren des Schossens und Blühens einer Zuckerrübenpflanze bereit, u.a. eine isolierte Nukleinsäure mit einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO 1-3, die zur Herstellung einer Zuckerrübe verwendet werden kann, bei der das Schossen und Blühen nach Vernalisation inhibiert ist.



WO 2011/032537 A1



-
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h) — mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)

Inhibierung des Schossens und Blühens einer Zuckerrübenpflanze

Die vorliegende Erfindung betrifft eine isolierte Nukleinsäure zum Inhibieren des Schossens und Blühens einer Zuckerrübenpflanze sowie deren Verwendung, ein Protein, ein Verfahren
5 zur Herstellung einer transgenen Zuckerrübenpflanze, bei der das Schossen und Blühen nach Vernalisation inhibiert ist, Vektoren oder mobile genetische Elemente sowie eine transgene Zuckerrübe, bei der das Schossen und Blühen nach Vernalisation inhibiert ist, und Samen und Teile davon.

10 Mittels molekularbiologischer Methoden ist es möglich, Nutzpflanzen genetisch zu verändern, ihre Eigenschaften damit zu ändern und zu verbessern. Eine für den Anbau und die Nutzung wichtige Eigenschaft von zweijährigen Pflanzen wie der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) besteht darin, dass deren Schossen und anschließendes Blühen einer Induktion durch eine längere Kälteperiode, wie sie in gemäßigten Breiten regelmäßig im Winter auftritt, bedarf. Dieser durch
15 eine andauernde Periode mit niedrigen Temperaturen hervorgerufene Wechsel von der vegetativen in die generative Phase wird als Vernalisation bezeichnet.

Es gibt verschiedene Stoffwechselwege, von denen das Blühen gesteuert wird. Dazu gehören u.a. der Langtagstoffwechselweg, ein autonomer, ein gibberellinsäure- und ein vernalisationsabhängiger Stoffwechselweg. Eine große Anzahl von Genen, die an der Regulation des Blühens
20 beteiligt sind, konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Besonders die Kontrolle des Blühzeitpunktes wurde extensiv an der Modellpflanze *Arabidopsis* erforscht (Boss, P.K., Bastow, R.M., Mylne, J.S., und Dean, C. (2004) Multiple pathways in the decision to flower: Enabling, promoting, and resetting, *Plant Cell* 16 Suppl: 18-31; He, Y. und Amasino, R. M. (2005) Role of chromatin modification in flowering-time control, *Trends Plant Sci* 10, 30-35; Bäumle, I. und Dean, C. (2006) The timing of developmental transitions in plants, *Cell* 125(4): 655-664). Vor allem mittels *Arabidopsis*-Mutantenanalyse konnten viele „Frühblüh“ („Early-flowering“)- oder „Spätblüh“ („Late-flowering“)-Gene identifiziert werden (Gazzani S., Gendall, A.R., Lister, C., und Dean, C. (2003) Analysis of the molecular basis of flowering time
25 variation in *Arabidopsis* accessions, *Plant Physiol.* 132: 1107-1114; Geraldo, N., Bäumle, I., Kidou, S., Hu, X., und Dean, C. (2009), FRIGIDA Delays Flowering in *Arabidopsis* via a Cotranscriptional Mechanism Involving Direct Interaction with the Nuclear Cap-Binding
30

Complex, *Plant Physiology*, Juli 1, 2009; 150(3): 1611–1618; Michaels, SD, Amasino, RM (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization, *Plant Cell* 13: 935–942).

5

In Zuckerrübe wurde bisher nur BvFLC eingehend charakterisiert. Dabei hat sich gezeigt, dass dieses Gen nicht als Schlüsselkontrollgen für den Blühstoffwechsel bzw. die Vernalisation der Zuckerrübe dient (Reeves, PA, He, Y, Schmitz, RJ, Amasino, RM, Panella, LW, Richards, CM (2007), Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (*Beta vulgaris*), *Genetics* 176(1): 295–307; Chia, T. Y. P., Müller, A., Jung, C., und Mutasa-Göttgens, E. S. (2008), Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus, *J. Exp. Bot.* 59(10): 2735–2748).

10

15

Das Schossen und Blühen von Zuckerrübenpflanzen ist unerwünscht, da in diesem Fall nicht die Samen bzw. Früchte, sondern der unterirdische Teil der Pflanze, die Rübe, genutzt wird, deren Speicherstoffe jedoch während des Schossens und Blühens von der Pflanze aufgebraucht würden. Darüber hinaus kann bei einzelnen Pflanzen, die als „Schosser“ bezeichnet werden, ein unerwünschtes Schossen bereits im Jahr der Aussaat auftreten, was bei Ernte und Verarbeitung sehr nachteilig ist.

20

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Mittel bereitzustellen, die es ermöglichen, das Schossen und/oder Blühen der Zuckerrübe zu inhibieren und sogar vollständig zu verhindern.

25

Erfindungsgemäß erfolgt die Lösung der gestellten Aufgabe mittels einer isolierten Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst, die

a) eine Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 aufweist, oder

b) zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 komplementär ist, oder

30

c) eine Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 oder eine dazu komplementäre Sequenz in Antisinn-Richtung aufweist, oder

d) zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 homolog ist, oder

- 3 -

e) mit einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 zu mindestens 80% identisch ist, oder

f) für ein Protein oder einen Teil des Proteins mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 kodiert, oder

5 g) für ein Protein mit einer Aminosäuresequenz aus *Beta vulgaris* kodiert, die zu der Sequenz der SEQ ID NO: 4 oder einem Sequenzabschnitt der SEQ ID NO: 4 homolog ist, oder

h) mit einer Sequenz oder Teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 1-3 oder einer dazu komplementären Nukleotidsequenz oder einer dazu in Antisinn-Richtung orientierten Nukleotidsequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

10

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann dazu verwendet werden, beispielsweise mittels RNAi-Ansatz oder miRNA-Ansatz (Fire, A, Xu, S, Montgomery, M, Kostas, S, Driver, S, Mello, C (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature 391 (6669): 806–811) das Schossen und Blühen von Zuckerrüben zu hemmen, vornehmlich, das Schossen und Blühen nach Möglichkeit vollständig zu unterbinden, z.B. durch Inhibieren von Genen, die Blühinduktoren wie FT, FUL, Co oder VIN3 kodieren.

15

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sich mit ihr transgene Pflanzen, insbesondere Zuckerrüben, mit besonderen Eigenschaften herstellen lassen: In bevorzugter Weise lässt sie sich beispielsweise zu folgenden Zwecken bzw. mit folgenden Vorteilen verwenden:

20

Herstellung nichtschossender, nichtblühender Zuckerrüben

Herstellung einer Zuckerrübe als Winterrübe

25

Herstellung einer Zuckerrübe als Lenzrübe

Erhöhung der Biomasse von Zuckerrüben

Erhöhung des Zuckerertrages

Vermeidung der Schosserbildung bei Zuckerrüben

Verlängerung der Zuckerrübenkampagne

30

Vermeidung von Speichersubstanzverlusten bei Zuckerrüben

Nutzung der höheren Feuchte im Herbst

Bedeckung des Bodens und Nutzung des eingelagerten Stickstoffs

Schutz für Nützlinge auf dem Feld

Die Zuckerrübe ist eine zweijährige Pflanze. Nach Überwinterung und damit erfolgter Vernalisation kommt die Zuckerrübe normalerweise im zweiten Jahr zur Blüte. Mittels der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, zum Beispiel einer in einem RNAi- oder MicroRNA-Ansatz eingesetzten Sequenz gemäß SEQ ID No: 5 bis SEQ ID No: 7 oder einer anderen erfindungsgemäßen Sequenz oder Teilsequenz, können Gene inhibiert und die Effekte der Vernalisation inhibiert bzw. gänzlich unterbunden werden. Mechanismen und Methoden zur Inhibierung bzw. Abschaltung von Genen sind dem Fachmann beispielsweise unter dem Begriff „Gene silencing“ bekannt und können die bereits erwähnten und dem Fachmann geläufigen RNAi- oder Micro(mi)RNA-Verfahren umfassen, sind aber hierauf nicht beschränkt. In einem RNAi-Ansatz können beispielsweise die Sequenzen gemäß SEQ ID No: 5 bis SEQ ID No: 7 mittels dem Fachmann bekannter molekularbiologischer Techniken in Antisinnorientierung unter Kontrolle eines geeigneten Promotors in eine Zuckerrübenzelle eingebracht und dort exprimiert werden.

Durch die vorliegende Erfindung kann das Schossen und Blühen der Pflanze vollständig unterbunden werden. Das Rübensaatgut kann dadurch früher ausgebracht werden, was letztlich zu einer verlängerten Vegetationsperiode und damit zu einer höheren Biomasse bzw. einem höheren Zuckerertrag führt. In Kombination mit einer Kältetoleranz können die Rüben beispielsweise auch als so genannte Winterrüben angebaut werden. Bei einem Anbau der Zuckerrübe im August kann die Rübe im darauf folgenden Frühjahr bereits als Lenzrübe geerntet werden. Dies ermöglicht dem Landwirt eine zusätzliche Fruchtfolge. Durch Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure führen längere Kälteeinbrüche nach Aussaat auf dem Feld nicht mehr zu verstärkter Schosserbildung. Auch die ohne längere Kälteeinbrüche bei bisherigen Zuckerrüben beobachtbare Schosserbildung kann verhindert oder zumindest deutlich vermindert werden. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung kann nicht nur bewirkt werden, dass das Schossen und in der Folge davon auch das Blühen von Zuckerrüben nach einer ersten Vernalisation, d.h. im zweiten Jahr, inhibiert bzw. verhindert wird, sondern die Zuckerrübe auch weiteren Kälteperioden ausgesetzt werden kann, ohne dass Vernalisationswirkungen beobachtbar wären.

Der Zuckerrübenanbau erfolgt normalerweise von April bis Oktober/November. Da nicht alle geernteten Zuckerrüben zur gleichen Zeit verarbeitet werden können, müssen diese ein- bzw. zwischengelagert werden. Während der Lagerung z.B. in Mieten entstehen große Speichersubstanzverluste (Saccharoseverluste) durch Spaltung der Saccharose in Glucose und Fruktose.

5 Mittels der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere bei deren Verwendung in einem RNAi Ansatz, können die Aussaat und Erntetermine so variiert werden, dass die Gesamterntezeit (Kampagne) ohne Ernteverluste verlängert werden kann. Es können damit mehr Zuckerrüben während eines längeren Zeitraums ohne oder mit geringem Speichersubstanzverlust verarbeitet werden.

10

Unter dem Begriff „Zuckerrübe“ oder „Zuckerrübenpflanze“ wird hier eine Pflanze der Gattung *Beta vulgaris* verstanden, z.B. *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *altissima* (Zuckerrübe i.e.S.), *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (See-Mangold), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* (Mangold), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *conditiva* (Rote Rübe/Bete), *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *crassa/alba* (Futterrübe).

15

Unter einer „isolierten Nukleinsäure“ wird eine aus ihrer natürlichen bzw. ursprünglichen Umgebung herausgelöste Nukleinsäure verstanden. Der Begriff umfasst auch eine synthetisch hergestellte Nukleinsäure.

20

Unter einer „Inhibierung des Schossens und Blühens“ einer Zuckerrübenpflanze wird hier eine Minderung des Anteils von schossenden und gegebenenfalls blühenden Zuckerrübenpflanzen im Vergleich zu einer nicht erfindungsgemäß veränderten Zuckerrübenpflanze in einer vergleichbaren Entwicklungsphase, insbesondere im zweiten Jahr nach Durchlaufen einer entsprechenden Kälteperiode, d.h. nach Vernalisation, verstanden. Insbesondere umfasst der Begriff 25 eine Minderung des Schosseranteils auf höchstens 80%, vorzugsweise höchstens 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% oder 10%, besonders bevorzugt höchstens 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2% oder 0,1% des Schosseranteils von nicht gemäß der Erfindung veränderten Kontrollpflanzen. „Kontrollpflanzen“ sind vorzugsweise Pflanzen derselben Sorte, die jedoch 30 nicht gemäß der vorliegenden Erfindung verändert sind, und die beispielsweise einen Schosseranteil von maximal 0.01% aufweisen. Unter dem Begriff „Unterbindung“ oder „vollständige Unterbindung“ des Schossens und Blühens wird eine Inhibierung um mindestens 99%, vor-

zugsweise mindestens 99,5%, besonders bevorzugt mindestens 99,8% oder mindestens 99,9%, d.h. eine Minderung des Schosseranteils auf höchstens 1%, höchstens 0,5%, höchstens 0,2% oder höchstens 0,1%, insbesondere im zweiten Jahr nach Vernalisation, im Vergleich zu einer nicht erfindungsgemäß veränderten Zuckerrübenpflanze, die beispielsweise einen Schosseranteil von maximal 0,01 % aufweist, verstanden. Der Begriff der Inhibierung bzw. des Unterbindens des Schossens und Blühens umfasst vor allem die Inhibierung/Unterbindung des Schossens, unabhängig davon, ob es zu einem Blühen der Pflanze kommt, oder nicht.

Der Begriff „transgen“ bedeutet hier gentechnisch verändert. Der Begriff umfasst, wenn er hier verwendet wird, auch den Fall, dass eine arteigene Nukleinsäure in einer Form, Anordnung oder Menge in die Zelle eingebracht ist, in der die Nukleinsäure natürlicherweise nicht in der Zelle vorkommt.

Der Begriff „Homologie“ bezieht sich auf Übereinstimmungen oder Ähnlichkeiten in der Nukleotidsequenz zweier Nukleinsäuremoleküle oder Aminosäuresequenz zweier Proteine bzw. Peptide. Das Vorhandensein einer Homologie zwischen zwei Nukleinsäuren bzw. Proteinen kann festgestellt werden, indem man jeweils eine Position in der einen Sequenz mit der entsprechenden Position in der anderen Sequenz vergleicht und ermittelt, ob hier identische oder ähnliche Reste vorhanden sind. Zwei miteinander verglichene Sequenzen sind homolog, wenn ein bestimmter Mindestanteil identischer oder ähnlicher Nukleotide vorliegt. „Identisch“ heißt, dass beim Vergleich zweier Sequenzen an äquivalenten Stellen jeweils dasselbe Nukleotid bzw. dieselbe Aminosäure steht. Dabei kann es gegebenenfalls erforderlich sein, Sequenzlücken zu berücksichtigen, um eine möglichst gute Alinierung der Vergleichssequenzen herzustellen. Ähnliche Nukleotide/Aminosäuren sind dabei nichtidentische Nukleotide/Aminosäuren mit gleichen oder äquivalenten chemisch-physikalischen Eigenschaften. Beim Austausch eines Nukleotids (einer Aminosäure) durch ein anderes Nukleotid (eine andere Aminosäure) mit gleichen oder äquivalenten chemisch-physikalischen Eigenschaften spricht man von einem „konservativen Austausch“. Beispiele für physikalisch-chemische Eigenschaften einer Aminosäure sind beispielsweise die Hydrophobie oder die Ladung. In Zusammenhang mit Nukleinsäuren wird auch von einem ähnlichen Nukleotid bzw. einem konservativen Austausch gesprochen, wenn in einer kodierenden Sequenz ein Nukleotid in einem Kodon durch ein anderes ersetzt wird, wobei jedoch, z.B. aufgrund der Degeneration des genetischen Kodes, dieselbe

Aminosäure oder eine ähnliche Aminosäure wie in der Vergleichssequenz von dem vom Austausch betroffenen Kodon kodiert wird. Dem Fachmann ist bekannt, welcher Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausch ein konservativer Austausch ist. Zur Feststellung des Grades an Ähnlichkeit bzw. Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird dabei vorzugsweise von einer Mindestlänge von 60 Nukleotiden bzw. Basenpaaren, bevorzugt einer Mindestlänge von 70, 80, 90, 100, 110, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 350 oder 400 Nukleotiden bzw. Basenpaaren, besonders bevorzugt von der vollen Länge der zu vergleichenden Nukleinsäuren ausgegangen, bei Proteinen/Peptiden von einer Mindestlänge von 20 Aminosäuren, bevorzugt einer Mindestlänge von 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250 oder 300 Aminosäuren, und besonders bevorzugt von der vollen Länge der zu vergleichenden Aminosäuresequenzen ausgegangen. Der Grad der Ähnlichkeit („positives“) oder Identität zweier Sequenzen kann beispielsweise mit Hilfe des Computerprogramms BLAST (S.F. Altschul et al. (1990), Basic Local Alignment search tool, J.Mol. Biol. 215: 403-410; s. z.B. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) unter Verwendung von Standardparametern ermittelt werden. Die Feststellung einer Homologie hängt von der Länge der verglichenen Sequenzen ab. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung wird von Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen, deren kürzere mindestens 100 Nukleotide umfasst, ausgegangen, wenn mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindestens 95%, mindestens 97%, mindestens 98%, oder mindestens 99% der Nukleotide identisch und/oder ähnlich („identities“ oder „positives“ gemäß BLAST), vorzugsweise identisch, sind. Bei einer Sequenzlänge von 50-99 Nukleotiden wird bei einer Identität oder zumindest Ähnlichkeit von mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 85%, 86%, 87%, 88% oder 89%, bei einer Sequenzlänge von 15-49 Nukleotiden bei einer Identität oder Ähnlichkeit von mindestens 90%, bevorzugt mindestens 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% von Homologie zwischen den Sequenzen ausgegangen. Bei Proteinen wird von Homologie ausgegangen, wenn bei Verwendung des Computerprogramms BLAST unter Verwendung von Standardparametern und der BLOSUM62-Substitutionsmatrix (Henikoff, S., und Henikoff, J., Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 10915-10919, 1992) eine Identität („identities“) und/oder Ähnlichkeit („positives“), vorzugsweise Identität, von mindestens 25%, mindestens 26%, mindestens 27%, mindestens 28%, mindestens 29%, mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 35%, mindestens 40%, mindestens 45%, mindestens 50%, mindestens 55%, mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90%, mindes-

tens 95%, mindestens 97%, mindestens 98%, oder mindestens 99% erhalten wird, wobei vorzugsweise die gesamte Länge des Proteins/Peptids, das mit einem anderen Protein verglichen wird, berücksichtigt wird, z.B. die Länge von 653 Aminosäuren im Falle der SEQ ID NO: 4. Dem Fachmann ist anhand seines Fachwissens ohne weiteres ersichtlich, welches der verfügbaren BLAST-Programme (z.B. BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn oder tBLASTx) für die Ermittlung der Homologie in Frage kommt. Darüber hinaus existieren noch weitere Programme, die der Fachmann kennt, und die er im Bedarfsfall bei der Beurteilung der Homologie zweier oder mehrerer zu vergleichender Sequenzen oder Teilsequenzen heranziehen kann. Solche Programme sind beispielsweise auf den Internetseiten des European Bioinformatics Institute (EMBL) verfügbar (s. z.B. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/similarity.html>).

Unter „Hybridisieren“ oder „Hybridisierung“ wird ein Vorgang verstanden, bei dem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül sich an einen komplementären Nukleinsäurestrang anlagert, d.h. mit diesem eine Basenpaarung eingeht. Standardverfahren zur Hybridisierung sind beispielsweise in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3. Aufl. 2001) beschrieben. Vorzugsweise wird darunter verstanden, dass mindestens 50%, weiter bevorzugt mindestens 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% oder 85%, besonders bevorzugt 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% der Basen des Nukleinsäurestranges eine Basenpaarung mit dem komplementären Nukleinsäurestrang eingehen. Die Möglichkeit einer solchen Anlagerung hängt von der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen ab. Der Begriff „Stringenz“ bezieht sich auf die Hybridisierungsbedingungen. Hohe Stringenz ist dann gegeben, wenn eine Basenpaarung erschwert ist, niedrige Stringenz, wenn eine Basenpaarung erleichtert ist. Die Stringenz der Hybridisierungsbedingungen hängt beispielsweise von der Salzkonzentration bzw. Ionenstärke und der Temperatur ab. Generell kann die Stringenz durch eine Erhöhung der Temperatur und/oder eine Erniedrigung des Salzgehaltes erhöht werden. Unter „stringenten Hybridisierungsbedingungen“ sind solche Bedingungen zu verstehen, bei denen eine Hybridisierung überwiegend nur zwischen homologen Nukleinsäuremolekülen stattfindet. Der Begriff „Hybridisierungsbedingungen“ bezieht sich dabei nicht nur auf die bei der eigentlichen Anlagerung der Nukleinsäuren herrschenden Bedingungen, sondern auch auf bei den anschließenden Waschschritten herrschenden Bedingungen. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise Bedingungen, unter denen überwiegend nur solche Nukleinsäuremoleküle hybridisieren, die mindes-

tens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, mindestens 80%, mindestens 85%, mindestens 90% oder mindestens 95% Sequenzidentität aufweisen. Wenig stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise: Hybridisieren in 4 x SSC bei 37 °C und anschließendes mehrfaches Waschen in 1 x SSC bei Raumtemperatur. Stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise: Hybridisieren in 4 x SSC bei 65 °C und anschließendes mehrfaches Waschen in 0,1 x SSC bei 65 °C für insgesamt etwa 1 Stunde.

Der Begriff „komplementär“ bezieht sich auf die Fähigkeit von Purin- und Pyrimidinnukleotiden, über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander Basenpaare zu bilden. Komplementäre Basenpaare sind beispielsweise Guanin und Cytosin, Adenin und Thymin sowie Adenin und Uracil. Ein komplementärer Nukleinsäurestrang ist dementsprechend ein Nukleinsäurestrang, der durch Paarung mit komplementären Basen eines anderen Nukleinsäurestrangs einen Doppelstrang bilden kann.

Unter einem „Fragment“ oder einer „Teilsequenz“ einer Nukleinsäure ist hier ein zusammenhängender Teilabschnitt der Nukleinsäure zu verstehen, d.h. ein Sequenzabschnitt aus aufeinander folgenden Nukleotiden der Nukleinsäure. Fragmente können z.B. in einem RNAi- oder miRNA-Ansatz vorteilhaft eingesetzt werden, wobei die Sequenz dabei beispielsweise in Antisinn(„antisense“)-Richtung eingesetzt werden kann. „Antisinnrichtung“ bzw. „Antisinnorientierung“ einer Nukleinsäuresequenz, z.B. einer DNA-Sequenz, bedeutet hier beispielsweise, dass eine Transkription der DNA-Sequenz zu einer mRNA führt, deren Nukleotidsequenz komplementär ist zu einer natürlichen (endogenen) mRNA, so dass deren Translation durch Anlagerung der komplementären RNA behindert oder verhindert wird. Unter einer „Antisinn-RNA“ bzw. „Antisense-RNA“ wird eine zu einer bestimmten mRNA oder zu bestimmten anderen RNAs komplementäre RNA verstanden. „Antisinnrichtung“ oder „Antisinnorientierung“ einer mRNA-Sequenz bedeutet daher, dass die mRNA eine Sequenz aufweist, die komplementär ist zu einer mRNA-Sequenz, deren Translation somit durch Anlagerung behindert oder verhindert werden kann. Teilsequenzen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorteilhaft beispielsweise in Antisinnorientierung eingesetzt werden können, sind beispielsweise Nukleinsäuren mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 5, 6 oder 7. Bei diesen Teilsequenzen handelt es sich um Abschnitte der erfindungsgemäßen Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 3. Es können

aber auch beliebige andere Nucleinsäuren mit Sequenzen oder Teilsequenzen der SEQ ID 1-3, zum Beispiel in Antisinnrichtung, eingesetzt werden.

Bevorzugt umfasst eine Teilsequenz einer Nucleinsäure mindestens 15, vorzugsweise mindestens 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 oder mindestens 100 aufeinander folgende
5 Nucleotide, weiter bevorzugt mindestens 150, 200, 250, 300, 350, 400 oder 450 aufeinander folgende Nucleotide. Ein Teil eines Proteins (s. z.B. Buchstabe f) oben) umfasst vorzugsweise mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10, 15, 20, 25, 30, 40 oder 50, besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80, 90 oder mindestens 100 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID
10 NO: 4. Der Sequenzabschnitt der SEQ ID NO: 4 (s. z.B. Buchstabe g) oben) umfasst bevorzugt mindestens 50, 60, 70, 80 oder 90, weiter bevorzugt mindestens 100, 120, 150, 200 oder 250 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NO: 4. Die erforderliche oder sinnvolle Länge der Teilsequenz der Nucleinsäure oder des Proteins oder des Sequenzabschnitts kann der Fachmann mit Hilfe seines allgemeinen Fachkönnens und gegebenenfalls unter Durchführung von
15 Routineversuchen anhand des gewählten Ansatzes und der beabsichtigten Wirkung feststellen, ohne dass es hierzu einer erfinderischen Tätigkeit bedürfte.

Die erfindungsgemäße Nucleinsäure ist vorzugsweise zu mindestens 85%, bevorzugt mindestens 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99%, besonders bevorzugt mindestens 99,5%, 99,6%,
20 99,7%, 99,8% oder 99,9% zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 identisch.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer oder mehrerer der erfindungsgemäßen Nucleinsäuren zur Inhibierung des Schossens und Blühens einer Zuckerrübenpflanze. Wie bereits oben angegeben, kann eine erfindungsgemäße Nucleinsäure
25 beispielsweise in Antisinnorientierung in eine Zuckerrübenpflanze eingebracht werden, um dadurch für eine Inhibierung der für die Induktion des Schossens und Blühens verantwortlichen Gene zu sorgen. Verfahren, die zur Einführung einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure in eine Zuckerrübenzelle geeignet sind, sind dem Fachmann grundsätzlich bekannt, und umfassen beispielsweise die Agrobakterien-vermittelte Transformation. Das Einbringen einer Nucleinsäure
30 in Antisinnorientierung in eine Pflanze ist allerdings nur eine der dem Fachmann bekannten Verfahren zur Hemmung oder Unterdrückung einer Genaktivität. Die erfindungsgemäßen Nuk-

leinsäuren sind auch im Rahmen anderer Verfahren, oder Mechanismen, die eine Hemmung bzw. Unterdrückung des Schossens/Blühens bewirken können, vorteilhaft einsetzbar.

Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren auch als Sonde zur Ermittlung
5 weiterer Faktoren, Gene bzw. Genprodukte verwendet werden, mit deren Hilfe das Blühen und Schossen von Zuckerrübenpflanzen gehemmt und/oder unterdrückt werden kann.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Protein mit einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die einen Sequenzabschnitt der SEQ ID NO: 4, vorzugsweise mindestens 50, 60, 70, 80 oder 90, bevorzugt mindestens 100, 120, 150, 200 oder mindestens 250 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NO: 4, umfasst, oder ein zu dem Protein mit der Aminosäuresequenz oder einem Sequenzabschnitt der SEQ ID NO: 4 homologes Protein aus *Beta vulgaris*. Das Protein oder ein beliebiger Teil davon, bzw. die entsprechenden Aminosäuresequenzen, kann/können beispielsweise
15 als Sonde auf Aminosäureebene zur Ermittlung weiterer Faktoren, Gene bzw. Genprodukte verwendet werden, mit deren Hilfe das Blühen und Schossen von Zuckerrübenpflanzen gehemmt und/oder unterdrückt werden kann.

In noch einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Zuckerrübenpflanze, umfassend die Schritte (a) des Transformierens
20 einer Zuckerrübenzelle mit einer oder mehreren erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und (b) des Heranziehens einer Zuckerrübenpflanze aus der transformierten Zuckerrübenzelle. Die Transformation der Zuckerrübenzelle kann beispielsweise mit Hilfe bekannter Vektoren, z.B. eines Ti-Plasmids, erfolgen, und ist dem Fachmann grundsätzlich bekannt. Die erfindungsgemäßen
25 Nukleinsäuren können in einem solchen Vektor vorteilhaft unter die Kontrolle eines geeigneten Promotors gestellt sein.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor oder ein mobiles genetisches Element, das eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren umfasst. Vektoren und mobile genetische Elemente
30 sind dem Fachmann bekannt und umfassen zum Beispiel Plasmide wie das Ti-Plasmid. Der Vektor bzw. das mobile genetische Element kann vorteilhaft Kontrollelemente, z.B. einen Promotor, enthalten.

Darüber hinaus betrifft die Erfindung auch eine Zuckerrübenpflanze, die eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren, vorzugsweise unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, umfasst, und bei der das Schossen und Blühen inhibiert ist, sowie Samen und/oder Teile
5 einer erfindungsgemäßen Zuckerrübenpflanze, die mit einer oder mehreren erfindungsgemäßen Nukleinsäuren transformiert sind.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und der beigefügten Figuren rein zu Veranschaulichungszwecken näher erläutert.

10

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 Schematischer Vergleich (BLAST) der jeweiligen Lage der PHD-, FNIII- und VID-Domänen in BvVIL, AtVIL1 und AtVIN3. Angegeben ist auch der Anteil identischer bzw.
15 ähnlicher Nukleotide („identities“/„positives“, in %). VIN3_Ath = AtVIN3, VIL1_Ath = AtVIL1, VIL_Bv = BvVIL

Fig. 2 Schoss- und blühresistente Zuckerrübe. Links: Schossresistente BvVIL-Transformante WB4-7 (im Bild links) im Vergleich mit schossender Kontrolle (im Bild rechts); Rechts:
20 BvVIL-Transformante WB4-7, mehrere Monate alt

Fig. 3 Schematische Darstellung zum Aufbau der verwendeten RNAi-Kassette.

Fig. 4-6 Schematische Darstellung der zur Erstellung des pRNAi-Vektors verwendeten Fragmente Sal-SMA-775>1077 (Fig. 4), Sal-SMA-779>1197 (Fig. 5) und Sal-SMA-971>1466
25 (Fig. 6).

Fig. 7–9 Schematische Darstellung der zur Herstellung von RNAi-Konstrukten verwendeten Vektoren pRNAi-bvvil-775>1077sas (Fig. 7), pRNAi-bvvil-779>1197sas (Fig. 8) und pRNAi-bvvil-971>1466sas (Fig. 9).
30

Fig. 10–12 Schematische Darstellung der für die Agrobakterien-vermittelte Transformation eingesetzten binären Ti-Plasmide pLHRNAi-bvvil-775-1077sas (Fig. 10), pLHRNAi-bvvil-779-1197sas (Fig. 11) und pLHRNAi-bvvil_971-1446sas (Fig. 12).

- 5 Fig. 13 Schematische Darstellung der Intron-Exon-Struktur der genomischen DNA von BvVIL, mit Angabe von Restriktionsschnittstellen.

Fig. 14 Struktur der BvVIL-cDNA-Sequenz

10 Ausführungsbeispiele

Identifizierung/Isolierung einer vollständigen cDNA der Zuckerrübe für das Unterbinden des Schossens und Blühens

- 15 Durch Analysen einer eigens hierfür erstellten proprietären Zuckerrüben-EST-Datenbank wurde eine 1499bp lange, unvollständige cDNA (SEQ ID NO:3) identifiziert. Ausgehend von diesem unvollständigen cDNA-Bank-Klon wurde diese Sequenz vervollständigt. Die erhaltene Sequenz der c-DNA (SEQ ID NO:2) umfasste 1962bp (2285bp einschließlich 3'UTR). Das daraus resultierende Protein umfasst 653 Aminosäuren (SEQ ID NO:4). Die zugehörige genomische DNA-Sequenz (SEQ ID NO:1) umfasst 2366bp.
- 20

Ein Alignment der genomischen DNA mit cDNA zeigt den Aufbau der gesamten DNA, die aus 4 Exons und 3 Introns besteht (Fig. 13). Eine schematische Darstellung der cDNA ist in Fig. 14 zu finden.

Charakterisierung/Annotierung der Sequenz

Ein Vergleich (BLAST) des erhaltenen Volllängen-Klons bzw. der übersetzten Protein-Sequenz zeigt eine nur geringe Sequenzähnlichkeit mit Arabidopsis-„Blüh-Genen“ (z.B. At-VIL- und AtVIN-Familie). Dazu gehören die Gene VIN3 (VRN7), VIL1 (VRN5), VIL2 (VEL1), VIL3 (VEL2) und VIL4 (VEL3). Die höchste Ähnlichkeit über die gesamte Sequenzlänge besteht zu AtVIL1 mit 57,2% (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Sequenzvergleich von Bv-VIL mit Arabidopsis-thaliana(At)-VIL-Kandidaten auf DNA-Ebene. Der Vergleich erfolgte bei At-VIN3 über eine Länge von 2343 bp, bei At-VIL1 über eine Länge von 2163 bp, bei At-VIL2 über eine Länge von 2555 bp, bei At-VIL3 über eine Länge von 1700 bp, und bei At-VIL4 über eine Länge von 1251 bp mit Hilfe des Programms AlignX (ClustalW).

	AtVIN3	AtVIL1	AtVIL2	AtVIL3	AtVIL4
BvVIL	46,0%	57,2%	51,5%	49,8%	45,9%

Auch der Vergleich der Sequenzen auf Proteinebene mit der AtVIL- und -VIN-Genfamilie sowohl über die gesamte Sequenz als auch fokussiert auf die verschiedenen Domänen (charakteristisch für die VIL- und VIN-Genfamilie sind die PHD-, die FNIII- und die VID-Domänen) und die Bereiche zwischen den Domänen zeigt ebenfalls eine geringe Homologie (s. Tabelle. 2).

Tabelle 2: BvVIL-Sequenzvergleich auf Proteinebene mit VIL-Genen aus Arabidopsis (Vergleich mit der Gesamt-Sequenzen und einzelnen Domänen). At = Arabidopsis thaliana, Bv = Beta vulgaris, Anm. = Anmerkung, AS = Aminosäuren, ident. = identisch („identities“), pos. = ähnlich („positives“), Kons.-L. AS = Konsensus-Länge AS, gaps = Lücken

	Gesamt			Domänenvergleiche												
	ident. %	pos. %	Kons.-L. AS	Prä-PHD		PHD-Domäne		Inter-PHD-FN3		FN3		Inter-FN3-VID		VID		
	ident. %	pos. %	Kons.-L. AS	ident. %	pos. %	ident. %	pos. %	ident. %	pos. %	ident. %	pos. %	ident. %	pos. %	Anm	ident. %	pos. %
AtVIL1	46,1	57,3	641	28,8	48,5	66,7	78,8	58,9	67,9	44,7	62,4	34,9	41,3		49,6	61,7
AtVIL2	30,9	42,8	688	34,7	43,2	50,8	62,3	39,4	53,8	24,7	43,5	13	21,9		41,6	58,4
AtVIL3	23,4	33,6	692	16,4	25,9	55,2	65,7	36,3	46	20,7	42,5	3,6	8,3	gaps	44	55
AtVIN3	28,6	39,2	696	27,6	30,1	50	62,1	46,4	67,9	21,2	40	11,9	18	gaps	40,2	54,9

– 15 –

Ein Vergleich (BLAST) der einzelnen Domänen zeigt, dass es sich bei der neuen Sequenz um eine VIL-ähnliche Sequenz handelt. (Fig. 1). Die Sequenz (SEQ ID NO: 1) wird hier deshalb als BvVIL (Beta vulgaris vernalisation vin3-like) bezeichnet.

- 5 Ein Sequenzvergleich BvVIL mit AtVIL-Kandidaten auf Gesamt-DNA-Ebene zeigt jedoch nur eine maximale Homologie von 57,2 % mit AtVIL1. Mit anderen At-Genen der VIL-Familie zeigt sich eine noch geringere Sequenzähnlichkeit.

10 Eine Analyse nichttransgener Zuckerrüben auf Transkription von BvVIL vor, während und nach Vernalisation ergab, dass das Gen nicht nur nach Vernalisation transkribiert wird, sondern bereits vor, während und nach der Vernalisation konstitutiv aktiv ist. Im Gegensatz dazu wird beispielsweise VIN3 erst durch eine lang anhaltende Vernalisation aktiviert.

Herstellung von RNAi-Konstrukten

15

Für die Herstellung von RNAi Konstrukten wurden drei Bereiche innerhalb der SEQ ID NO:3 verwendet:

Nukleotide 775 bis 1077 (SEQ ID NO: 5)

20 Nukleotide 779 bis 1197 (SEQ ID NO: 6)

Nukleotide 971 bis 1446 (SEQ ID NO: 7)

Die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 5 wurde mittels des Primerpaares F_PLT3~1:775U27, CTgggATACTTgggTgTTggAAAAgC (SEQ ID NO: 8) und F_PLT3~1:1050L28, TAgA-
25 AACATTggCgAgCCATTCATTAgC (SEQ ID NO: 9) über PCR amplifiziert.

Die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 6 wurde mittels des Primerpaares F_PLT3~1:779U24, gA-TACTTgggTgTTggAAAAgCA (SEQ ID NO: 10), und F_PLT3~1:1175L23 AATCAgT-CATTggTgTggggATA (SEQ ID NO: 11) über PCR amplifiziert.

30

– 16 –

Die Sequenz gemäß SEQ ID NO 7 wurde mittels des Primerpaares F_PLT3~1:971U21, CAA-gATggCCA gAggTATTgT (SEQ ID NO: 12) und F_PLT3~1:1426L21, CTCCTTTTCAgCCC ACTg (SEQ ID NO: 13) über PCR amplifiziert.

- 5 Die PCR wurde unter Verwendung von 10 ng genomischer Zuckerrüben-DNA, einer Primerkonzentration von 0,2 µM bei einer „Annealing“-Temperatur von 55 °C in einem Multicycler PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden jeweils in den Vektor pRTRNAi (Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W. (2006) Arabidopsis LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular
- 10 Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll Plant Cell. 18(8):1931-46) in einer Inverted-Repeat-Struktur integriert. Der Vektor basiert auf dem Plasmid pRT100 und ist konstruiert für die Herstellung von „intronspliced“ Hairpinstrukturen. Der Vektor enthält den 35S-Promoter für eine konstitutive Expression (Odell, J. T. Nagy, F., und Chua, N.-H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S
- 15 promoter, Nature 313, 810-812), das ATAAP6-Intron aus Arabidopsis und einen PolyA-Terminator. Das ATAAP6-Intron ist flankiert von den Schnittstellen Xho1/Ecl 136II am 5'-Ende bzw. von den Restriktionsschnittstellen Sma1/Sal1 am 3'-Ende. Dies ermöglicht die Integration von identischen Fragmenten „in sense“ und „antisense“, wenn diese Fragmente die kompatiblen Restriktionsschnittstellen Xho1 oder Sal1 besitzen, bzw. am anderen Ende stumpf („blunt end“) sind. Hierfür wurden die ursprünglichen PCR-Produkte mit neuen um diese Restriktionsschnittstellen verlängerten PCR-Primern reamplifiziert: Sal-SMA-775>1077 gagagcagctcgacctgggatacttgggtg (SEQ ID NO: 14) und cccccgggtagaaacattggcgagc (SEQ ID NO: 15), SAL-SMA-779>1197 gagaggacgtcgacgatacttgggtgttg (SEQ ID NO: 16) und cccccgggaatcagtcattgtgtgggata (SEQ ID NO: 17), XHO-SMA-971>1446 gagaggacctcgacaagatggccagaggt (SEQ ID NO: 18) und gtcgacccccgggcttcctttt (SEQ ID NO: 19). Zur weiteren Verwendung wurden die PCR Fragmente in den TA-Klonierungsvektor pCR2.1 (TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA)) kloniert und in E. coli transformiert. Eine Blau-Weiss Selektion ermöglichte die Identifizierung rekombinanter Plasmide (Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T, 1989, In Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Bei den weißen Kolonien ist durch ein Insert die Expression der ss-Galaktosidase unterdrückt, was zu weißen Kolonien führt, weil das dem Medium zugefügte Enzymsubstrat nicht mehr gespalten wird. Eine anschließende Sequenzierung
- 20
- 25
- 30

mit M13-fwd/rev-Primern wurde bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Analyse und das Alignment der Sequenzdaten erfolgte über das Programm Vektor NTI (Invitrogen, Carlsbad, USA).

- 5 Die Fragmente Sal-SMA-775>1077, SAL-SMA-779>1197 und XHO-SMA-971>1446 (s. Fig. 4-6) wurden jeweils mittels Sal1/Sma1 bzw. Xho1/Sma1 aus dem Topovektor herausgeschnitten und anschließend zuerst in den mit Sal1/Sma1 bzw. Xho1/Ecl 136II aufgeschnittenen pRTRNAi Vektor „in sense“ ligiert. Anschließend wurden die gleichen Fragmente ein zweites Mal in „antisense“ in die kompatiblen Xho1/Ecl 136II bzw. Sal1/Sma1 religiert. Die Klonierungen resultierten in den Vektoren pRNAi-bvvil-775-1077sas, pRNAi-bvvil-779-1197sas und
10 pRNAi-bvvil_971-1446sas (Fig. 3, 7-9).

Herstellung von Transformationskonstrukten

- 15 Für die Herstellung von Transformationskonstrukten wurde der binäre Transformationsvektor pLH9000 (Hausmann, L. und Töpfer, R. (1999) Entwicklung von Plasmid-Vektoren. Vorträge zur Pflanzenzüchtung: Bioengineering für Rapssorten nach Maß 45: 155-172) (NCBI-Zugriffsnr.: AF458478) verwendet. Die Expressionskassetten wurden nach Restriktion der pRNAi-Plasmide mit HindIII isoliert, in den binären Vektor pLH9000 kloniert, und die resultierenden Plasmide wurden mit pLHRNAi-bvvil-775-1077sas, pLHRNAi-bvvil-779-1197sas,
20 und pLHRNAi-bvvil-971-1446sas bezeichnet.

Zuckerrüben-Transformation und Überprüfung der Transgenität

- 25 Für die Pflanzentransformation fanden die binären Vektoren pLHRNAi-bvvil-775-1077sas, pLHRNAi-bvvil-779-1197sas und pLHRNAi-bvvil-971-1446sas Verwendung. Die binären Vektoren wurden in den Agrobacterium-tumefaciens-Stamm C58C1 mit dem residenten Plasmid pGV3101 durch ein direktes DNA-Transformationsverfahren (An, G. (1987), Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis, Methods Enzymol. 153, 292-305)
30 transformiert. Die Selektion rekombinanter A.-tumefaciens-Klone erfolgte unter Verwendung des Antibiotikums Streptomycin (50 mg/l). Die Transformation der Zuckerrüben erfolgte nach Lindsey et al. (1991) unter Verwendung des Antibiotikums Kanamycin (Lindsey, K., Gallois,

P., Eady, C. (1991), Regeneration and transformation of sugar beet by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Tissue Culture Manual B7: 1-13; Kluwer Academic Publishers). Die Transgenität der Pflanzen wurde durch PCR überprüft. Die Verwendung der Primer GTGGA-GAGGCTATTCGGTA (SEQ ID NO: 20) und CCACCATGATATTCGGCAAG (SEQ ID NO: 21) führte zu der Amplifikation eines 553 bp großen DNA-Fragments aus dem nptII-Gen. Die PCR wurde unter Verwendung von 10 ng genomischer DNA, einer Primerkonzentration von 0,2 µM bei einer Annealingtemperatur von 55 °C in einem Multicycler PTC-200 (MJ Research, Watertown, USA) durchgeführt.

10 Überprüfung des Blüh- und Schossverhaltens der Transformanten

Ca. 40 unabhängige Transformanten nebst nichttransgener isogener Kontrollen wurden in vitro vermehrt und ins Gewächshaus überführt. Nach einer Anpassungsphase wurden die Transformanten für 3 Monate bei 8°C in der Kühlkammer einer Vernalisation unterzogen (Simulation Winter). Anschließend wurden die Transformanten zusammen mit identisch behandelten nichttransgenen Kontrollpflanzen wieder zurück ins Gewächshaus (25 °C) überführt. Kurz nach Überführung, nach 10 Tagen bereits, begannen die Kontrollpflanzen zu schossen. Nach ca. 4 Wochen begannen die Kontrollpflanzen zu blühen. Im Gegensatz dazu zeigten 10 der 40 Transformanten (25%) überraschenderweise keine Reaktion auf die vorgenommene Schoss- und Blühinduktion mittels Vernalisation.

Es konnten von Transformanten aller drei verwendeten Konstrukte nichtschossende/nichtblühende Pflanzen erhalten werden. Die Lage der verwendeten Sequenz auf dem Gen war nicht entscheidend für die Funktion. Die erhaltenen Transformanten verhielten sich wie nicht vernalisierte Zuckerrüben. Sie begannen weder zu schossen noch zu blühen. Es wurden für jede unabhängige Transformante 30 Pflanzen getestet. Alle Pflanzen waren ohne Ausnahme schoss- und blühresistent. Keine der Pflanzen zeigte Abweichungen vom normalen Phänotyp. Die Pflanzen wurden weiter kultiviert, sie entwickelten sich weiter zu normalen Rüben mit normalem Rübenkörper. Die Schoss- und Blühresistenz hielt über den gesamten Prüfzeitraum von über 4 Monaten an (s. Fig. 2).

Ein Teil der Pflanzen wurde ein zweites Mal für nochmals 3 Monate vernalisiert. Auch nach dieser zweiten Vernalisation konnten diese Pflanzen nach Rücküberführung ins Gewächshaus bei 25 °C nicht zum Schossen oder Blühen gebracht werden.

- 5 Überraschenderweise kann somit mittels des erfindungsgemäßen transgenen Ansatzes bei Zuckerrüben die Vernalisation bzw. deren Wirkung, nämlich das Schossen und Blühen, vollständig blockiert bzw. rückgängig gemacht werden.

10 **Nachweis der Reprimierung von BvVIL in Zuckerrübe durch RNAi-Ansatz mittels Expressionsanalysen von Pflanzen während und nach Vernalisation.**

Aus sieben Wochen alten Gewächshauspflanzen der Zuckerrübenlinien 3DC4156-wb5-1, 3DC4156-wb4-1, 3DC4156-wb4-14, 3DC4156-wb4-5, 3DC4156-wb5-18, 3DC4156-wb4-9, 3DC4156-wb4-7, 3DC4156-wb3-4, 3DC4156-wb3-4, 3DC4156-wb7-1, 3DC4156-wb18-1 und
15 einer nicht transgenen 3DC4156, die sich die drei letzten Wochen in der Vernalisation befanden, wurde RNA mit TRI-Reagenz (Sigma, St. Louis, USA) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

Die für die cDNA-Synthese eingesetzte RNA wurde per PCR auf eine Verunreinigung mit genomischer DNA überprüft, gleichzeitig wurde parallel das Ergebnis der cDNA-Synthese untersucht. Dabei wurde die FIREPol-DNA-Polymerase (Solis Biodyne, Tartu, Estland) nach den
20 Angaben des Herstellers eingesetzt. Als Kontrolle diente Gesamt-DNA. Das PCR-Programm wurde für eine Fragmentgröße von 369 bp berechnet. Die Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

25

Tabelle 3: Primer zur Analyse der RNA/cDNA

vin3fwd1994 tgacctaaatgtagtttcagttcc (SEQ ID NO: 22)

vin3rev2317 tcaaagttaccgtctagagaacc (SEQ ID NO: 23)

30

Gesamt-DNA wurde aus vier Wochen alten Gewächshauspflanzen der Zuckerrübenlinie 3DC4156 mit dem DNeasy-Plant-Mini-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll

– 20 –

des Herstellers isoliert. Das RevertAid-first-strand-cDNA-Synthes-Kit von Fermentas (Vilnius, Litauen) diente zur Synthese von cDNA, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden.

Die cDNA wurde als 1:10-Verdünnung für qPCR-Analysen mit einer ABI-StepOnePlus-Real-Time-PCR-Maschine verwendet, es wurde eine SYBR-green-basierende qPCR durchgeführt.
 5 Der POWER-SYBR-green-PCR-Mix von ABI (Foster City, USA) wurde als Reaktionspuffer eingesetzt. Beim Ansetzen der Reaktionsansätze wurden die Angaben des Herstellers befolgt, es wurden jeweils drei Wiederholungen durchgeführt. Die Primer für die qPCR wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 4 aufgeführt.
 10 Das Primerpaar nlosreal1 und nlosreal2 diente dabei zur Normalisierung.

Tabelle 4: Primer zur qPCR-Analyse

nlosreal1	GAGGAACTAGACATGGGGATACAT (SEQ ID NO: 24)
15 nlosreal2	GCGATACAAAGTAGACATTAGAACTC (SEQ ID NO: 25)
vin3real1	TAGGAAGCAAAGCAGGAAGGGA (SEQ ID NO: 26)
vin3real2	CCTCCGACAGAACGCATCATCT (SEQ ID NO: 27)

Die qPCR wurde durchgeführt wie in Tabelle 5 dargestellt.

20

Tabelle 5: qPCR/Programm

95°C	10 min
95°C	15 s
25 58°C	30 s
72°C	30 s
95°C	15 s
60°C	1 min
+0,5°C/s bis 95°C	Schmelzpunktbestimmung

30

Die Schritte 2-4 wurden 40x wiederholt, Messungen fanden nach Schritt 4 und jedem Schritt der Schmelzpunktbestimmung statt.

Aus der qPCR-Analyse wurden relative Expressionsstärken für BvVIL ermittelt. Die Expressionsstärke der nicht/transgenen Kontrolle wurde dabei als 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 für die Pflanzen aus der Vernalisation gezeigt.

5

Tabelle 6: Relative Expression von BvVIL in vernalisierten wb-Linien

Linie	relative Expressionsstärke
wb k 5121	0,154
10 wb k 411	0,191
wb k 4141	0,21
wb k 451	0,238
wb k 5181	0,269
wb k 491	0,289
15 wb k 472	0,384
wb k 341	0,423
wb k 716	0,529
wb k 1811	0,673
3DC WT	1

20

RNA wurde ebenfalls aus mehrere Monate alten Gewächshauspflanzen der Zuckerrübenlinien 3DC4156-wb5-1, 3DC4156-wb4-1, 3DC4156-wb4-14, 3DC4156-wb4-5, 3DC4156-wb5-18, 3DC4156-wb4-9, 3DC4156-wb4-7, 3DC4156-wb3-4, 3DC4156-wb3-4, 3DC4156-wb7-1, die nach mehreren Vernalisationen nicht-schossend und -blühend blieben, und einer nicht transgenen 3DC4156, die für vier Wochen im Gewächshaus angezogen worden war, mit TRI-Reagent (Sigma, St. Louis, USA) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Bei der cDNA-Synthese wurde so verfahren, wie bereits oben für die vernalisierten Pflanzen angegeben.

25

Für die bereits mehrmals vernalisierten, nicht schossenden und nicht blühenden Pflanzen aus dem Gewächshaus wurde eine qPCR-Analyse nach dem gleichen Muster durchgeführt. Aus dieser qPCR-Analyse wurden ebenfalls relative Expressionsstärken für BvVIL ermittelt. Die

30

Expressionsstärke der nicht-transgenen Kontrolle wurde dabei als 1 gesetzt. Die Ergebnisse für diese Pflanzen sind in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7: Relative Expression von BvVIL in nicht blühenden und nicht schossenden wb-Linien

5

Linie	relative Expressionsstärke
wb k 5122	0.11
wb k 4142	0.15
wb k 5183	0.17
10 wb k 496	0.21
wb k 412	0.24
wb k 451	0.24
wb k 711	0.35
wb k 471	0.36
15 wb k 342	0.44
3DC WT	1

In beiden Ansätzen korreliert eine deutliche Reduktion des BvVIL-Transkriptes mit der Neigung zum Schossen und Blühen, und zwar derart, dass eine Reduktion des BvVIL Transkriptes auf unter 60% zu einer vollständigen Unterdrückung des Schossens und Blühens auszureichen scheint.

20

Eine Übersicht über die in der Anmeldung aufgeführten Sequenzen ist in der folgenden Tabelle 8 enthalten:

25

Tabelle 8: Sequenzübersicht

SEQ ID NO:	Anmerkung
1	BvVIL, genomische DNA, 2366 nt
30 2	BvVIL, cDNA, einschließlich 3'-UTR, 2285 (3'-UTR = nt 1963-2285)
3	BvVIL, unvollständige cDNA, 1499 nt
4	BvVIL, Proteinsequenz, 653 AS

- 5 nt 775-1077 von SEQ ID NO 3, 303 nt
- 6 nt 779-1197 von SEQ ID NO 3, 419 nt
- 7 nt 971-1446 von SEQ ID NO 3, 476 nt
- 8-27 Primer

5

Sequenzprotokoll – freier Text

Primer

- 10 Der Ausdruck „Artificial sequence“ im Sequenzprotokoll bedeutet „künstliche Sequenz“.

Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäure zur Inhibierung des Schossens und Blühens einer Zuckerrüben-
pflanze, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine Nukleotidsequenz umfasst,
5 die
- a) eine Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 aufweist, oder
 - b) zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 komplementär ist, oder
 - c) eine Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 oder eine dazu komplementäre
10 Sequenz in Antisinn-Richtung aufweist, oder
 - d) zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 homolog ist, oder
 - e) mit einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 zu mindestens 80% iden-
tisch ist, oder
 - f) für ein Protein oder einen Teil des Proteins mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID
NO: 4 kodiert, oder
 - 15 g) für ein Protein mit einer Aminosäuresequenz aus *Beta vulgaris* kodiert, die zu der Se-
quenz der SEQ ID NO: 4 oder einem Sequenzabschnitt der SEQ ID NO: 4 homolog
ist, oder
 - h) mit einer Sequenz oder Teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 1-3 oder einer dazu komple-
mentären Nukleotidsequenz oder einer dazu in Antisinn-Richtung orientierten Nukleo-
20 tidsequenz unter stringenten Bedingungen hybridisiert.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Teilsequenz mindes-
tens 15, vorzugsweise mindestens 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 oder mindes-
tens 100 aufeinander folgende Nukleotide, besonders bevorzugt mindestens 150, 200,
25 250, 300, 350, 400 oder 450 aufeinander folgende Nukleotide der SEQ ID NO: 1-3 um-
fasst, und/oder der Teil des Proteins mindestens 5, vorzugsweise mindestens 10, 15, 20,
25, 30, 40 oder 50, besonders bevorzugt mindestens 60, 70, 80, 90 oder mindestens 100
aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NO: 4, und/oder der Sequenzabschnitt
mindestens 50, 60, 70, 80 oder 90, bevorzugt mindestens 100, 120, 150, 200 oder 250
30 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NO: 4, umfasst.

- 25 -

3. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure zu mindestens 85%, bevorzugt mindestens 90%, 95%, 96%, 97%, 98% oder 99%, besonders bevorzugt mindestens 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% oder 99,9% zu einer Sequenz oder Teilsequenz der SEQ ID NO: 1-3 identisch ist.
5
4. Nukleinsäure nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure eine der Sequenzen der SEQ ID NO: 5, 6 oder 7, bevorzugt in Antisinnorientierung, umfasst.
- 10 5. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Inhibierung des Schossens und Blühens einer Zuckerrübenpflanze.
6. Protein mit einer Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 4 oder Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 50, 60, 70, 80 oder 90, bevorzugt mindestens 100, 120,
15 150, 200 oder 250 aufeinander folgende Aminosäuren der SEQ ID NO: 4, umfasst, oder ein hierzu homologes Protein aus *Beta vulgaris*.
7. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Zuckerrübenpflanze, bei der das Schossen und Blühen nach Vernalisation inhibiert ist, umfassend die Schritte (a) des Transformierens einer Zuckerrübenzelle mit einer oder mehreren Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 und (b) des Heranziehens einer Zuckerrübenpflanze aus der transformierten Zuckerrübenzelle.
20
8. Vektor oder mobiles genetisches Element, umfassend eine oder mehrere Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
25
9. Transgene Zuckerrübenpflanze, umfassend eine oder mehrere Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei der das Schossen und Blühen inhibiert ist.
- 30 10. Samen oder Teile einer transgenen Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 9, die mit einer oder mehreren Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 transformiert sind.

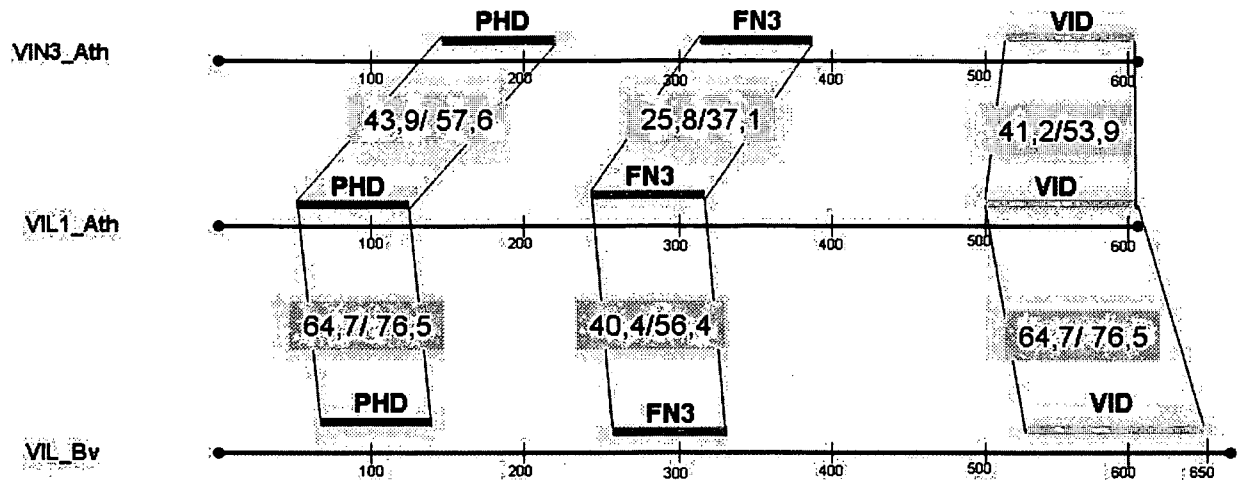


Fig. 1

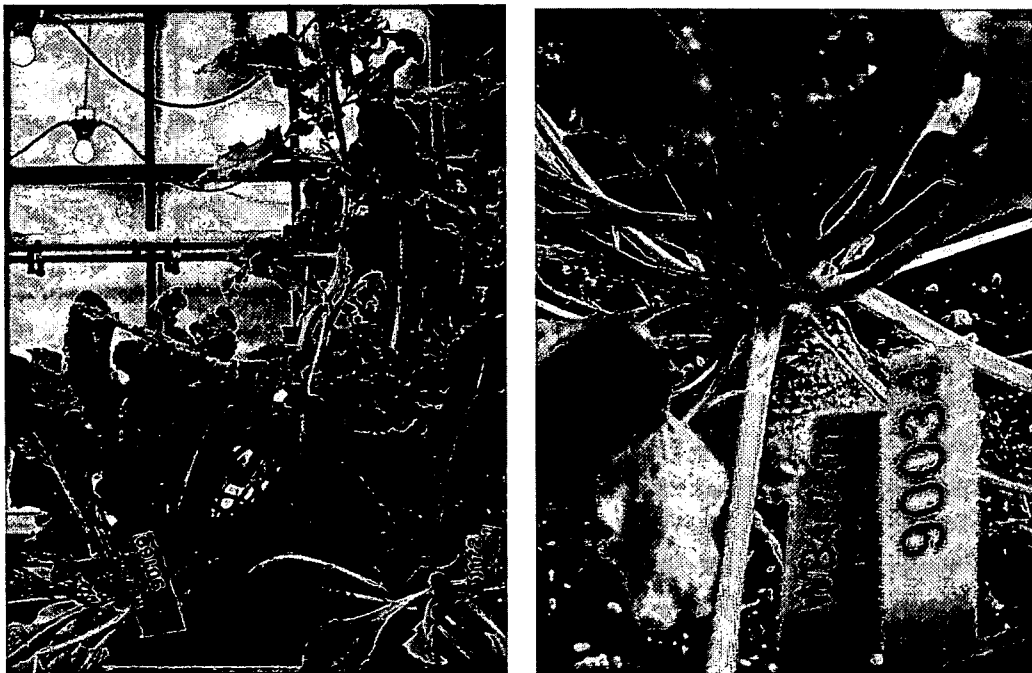


Fig. 2



Fig. 3

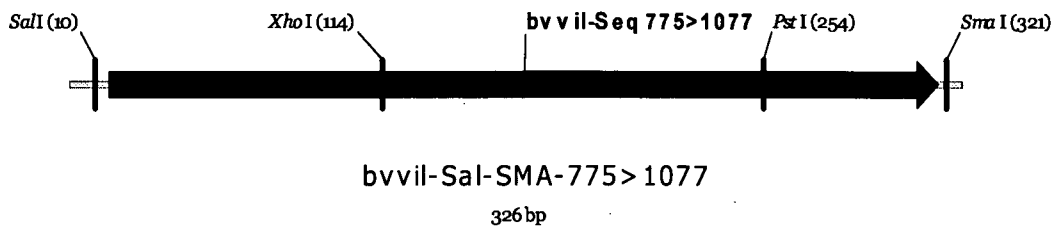


Fig. 4

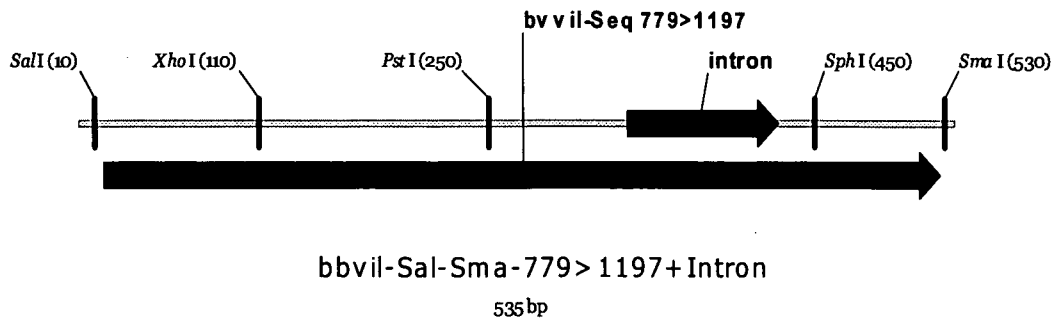


Fig. 5

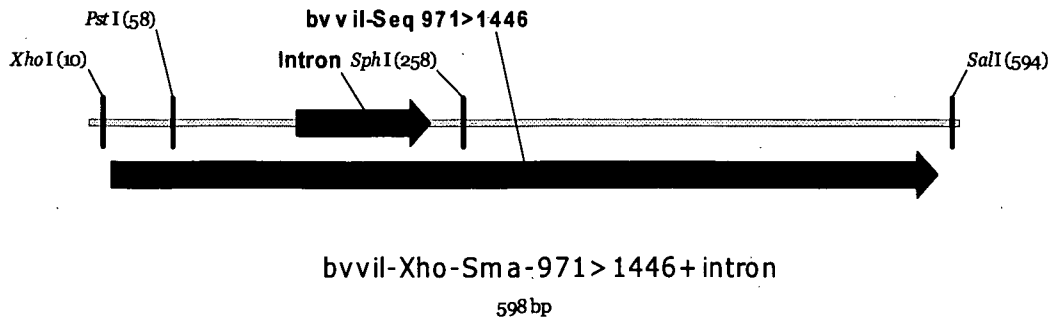


Fig. 6

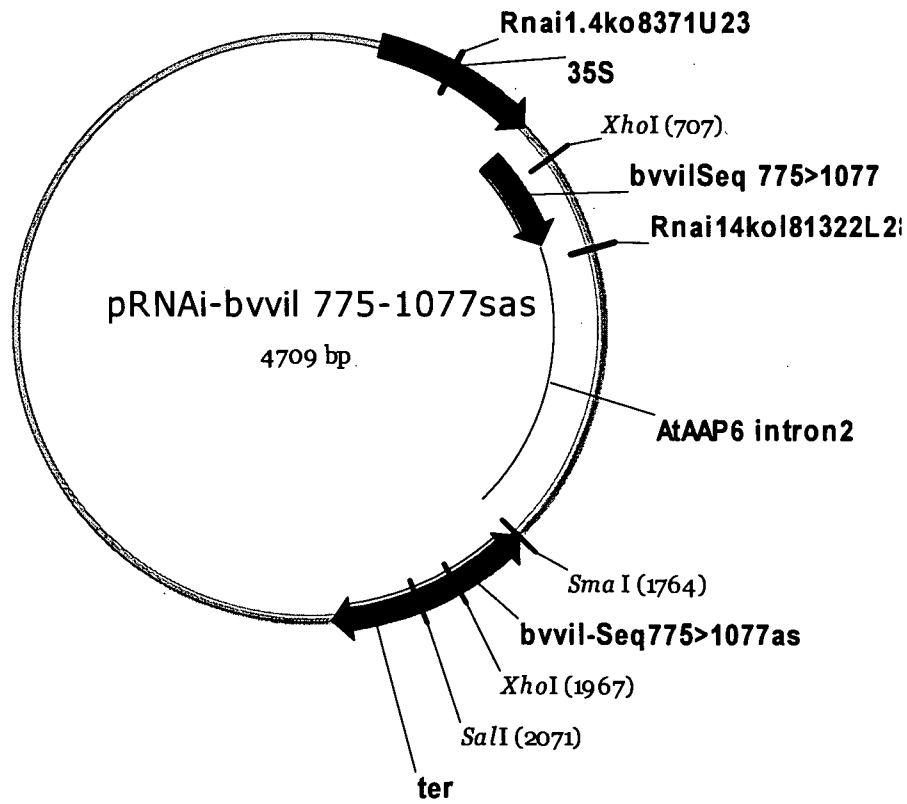


Fig. 7

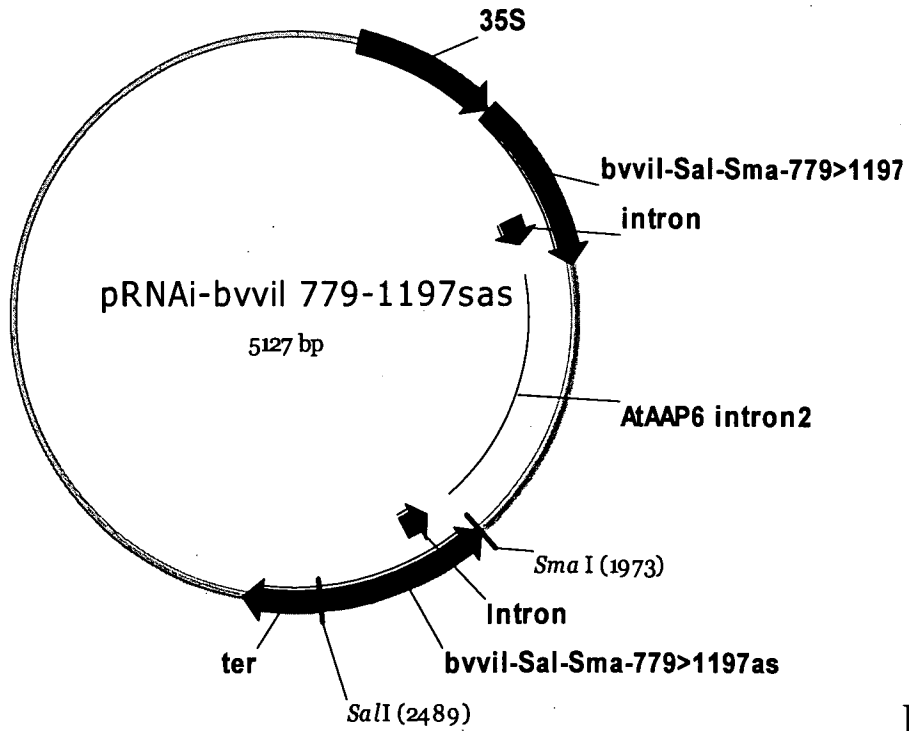


Fig. 8

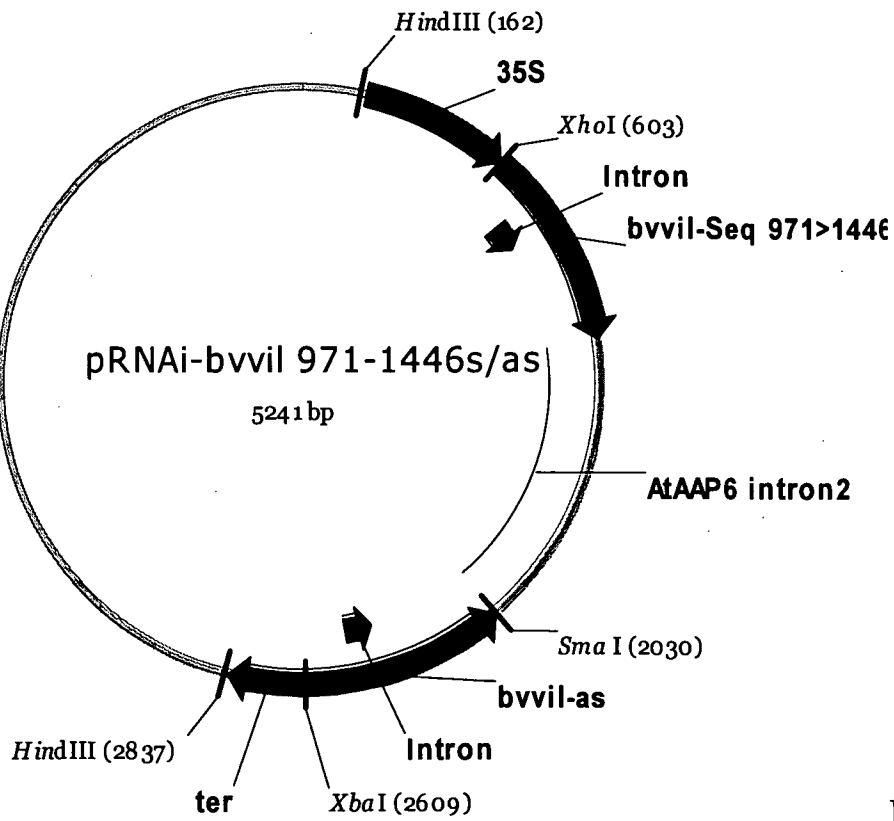


Fig. 9

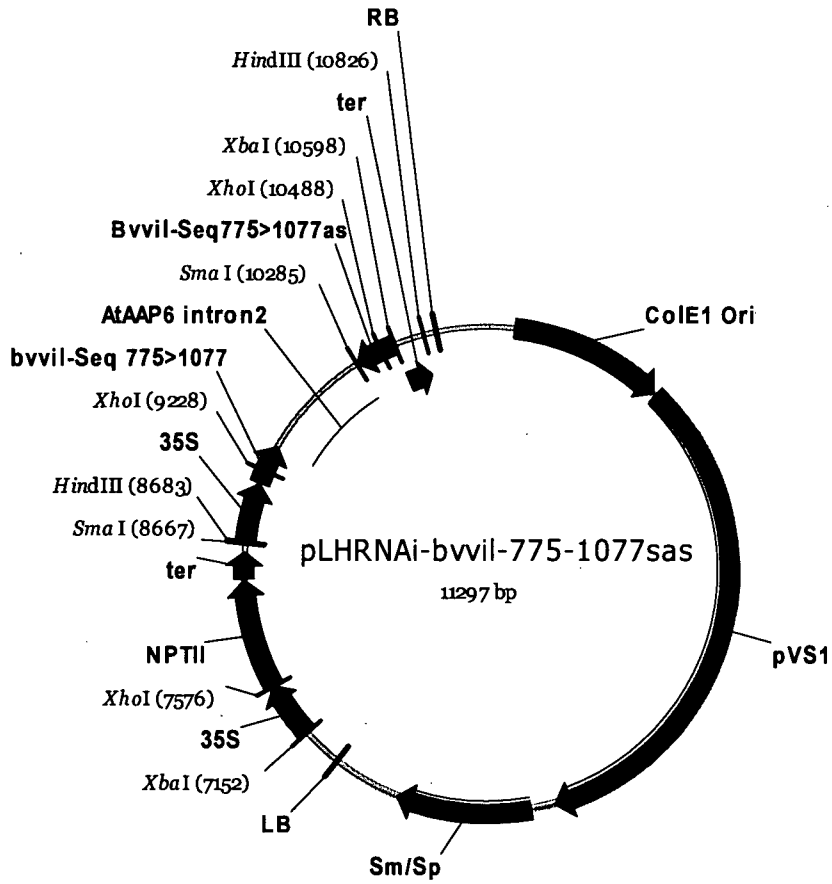


Fig. 10

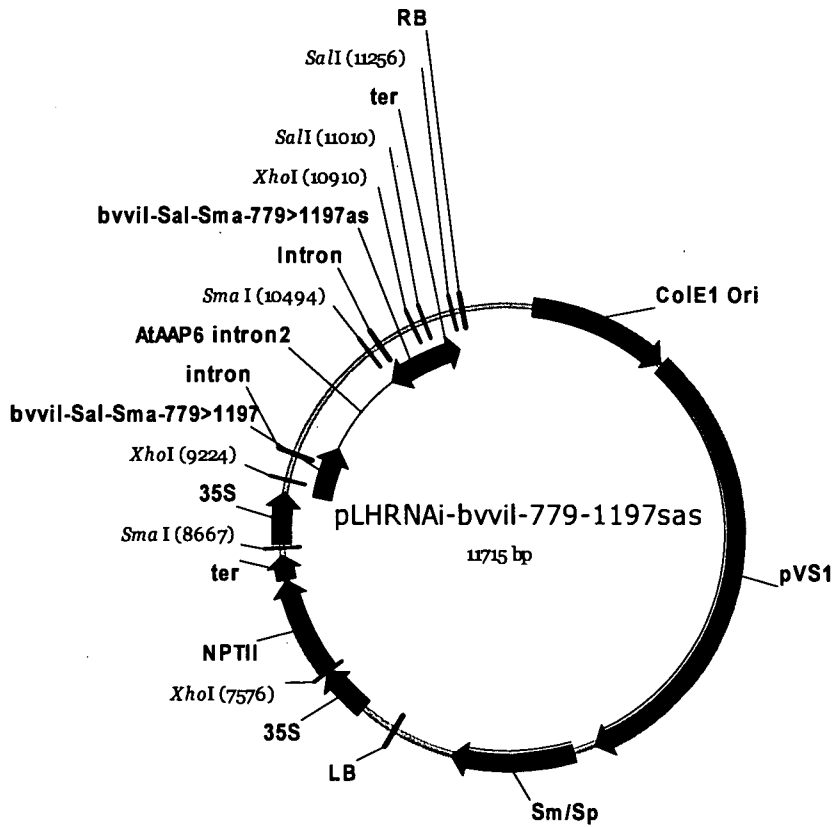


Fig. 11

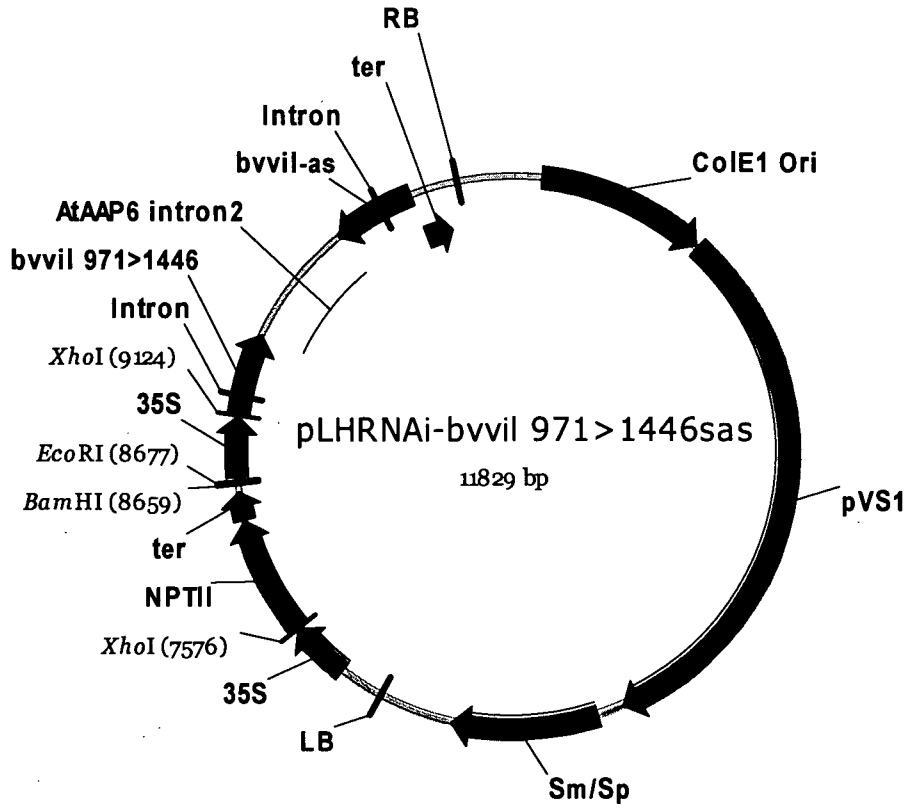


Fig. 12

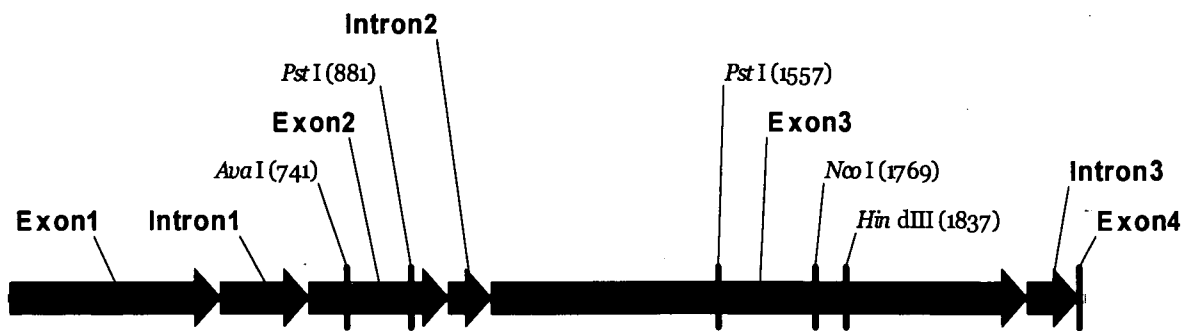


Fig. 13

- 7/7 -

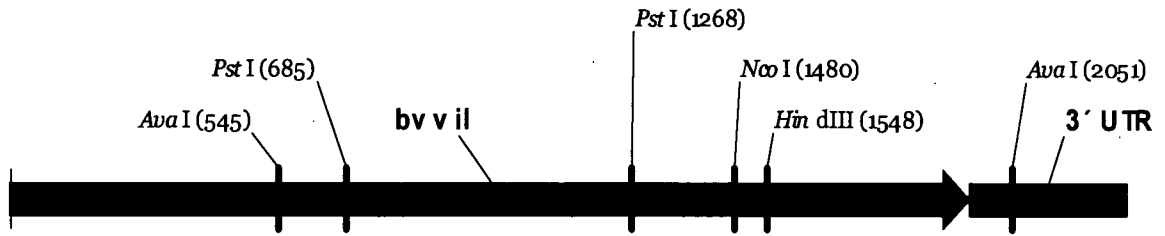


Fig. 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DE2010/001081

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K14/415 C12N15/82
 ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
 EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUNG SIBUM ET AL: "A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis", GENES & DEVELOPMENT, vol. 20, no. 23, December 2006 (2006-12), pages 3244-3248, XP002616054, ISSN: 0890-9369 page 3244 - page 3245; figures 1D, 1C -----	1-10
X	WO 2007/122086 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; GIELEN JOHANNES JACOBUS LUDGER [FR];) 1 November 2007 (2007-11-01) page 3; claims 1, 32, 33, 42; example 7; table 1 ----- -/--	1,5-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">11 January 2011</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">27/01/2011</p>
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center;">Krüger, Julia</p>
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DE2010/001081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2009/141446 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; GIELEN JOHANNES JACOBUS LUDGER [FR];) 26 November 2009 (2009-11-26) page 2 - page 7; claim 18; examples 2,3 -----	1,5-10
X,P	WO 2010/025888 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; VAN ROGGEN PETRA PETRONELLA MA [SE];) 11 March 2010 (2010-03-11) page 4, paragraph 4; example 5; table 3 -----	1,5-10
T	JUNG C ET AL: "Flowering time control and applications in plant breeding", TRENDS IN PLANT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 14, no. 10, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 563-573, XP026668259, ISSN: 1360-1385, DOI: DOI:10.1016/J.TPLANTS.2009.07.005 [retrieved on 2009-08-27] page 3; claims 29, 32, 33,42; example 7; table 1 -----	1-10
X	DATABASE EMBL [Online] ----- 1 January 2008 (2008-01-01), "UFL_192_45 Cotton fiber 0-10 day post anthesis Gossypium hirsutum cDNA, mRNA sequence.", XP002616055, retrieved from EBI accession no. EMBL:ES815074 Database accession no. ES815074 the whole document -----	1
X	DATABASE Geneseq [Online] ----- 18 October 2007 (2007-10-18), "Glycine max cDNA SEQ ID NO:128994.", XP002616056, retrieved from EBI accession no. GSN:AFP37816 Database accession no. AFP37816 the whole document & US 2004/031072 A1 (LA ROSA THOMAS J [US] ET AL) 12 February 2004 (2004-02-12) sequence 128994 ----- -/--	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DE2010/001081

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 24 March 2009 (2009-03-24), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002616057, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:B9RPB3 Database accession no. B9RPB3 the whole document -----	1

SUPPLEMENTARY INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE2010/001081

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the supplementary international search was carried out on the basis of:

a. type of material

a sequence listing

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

on paper

in electronic form

c. time of filing/furnishing

contained in the international application as filed

filed together with the international application in electronic form

furnished subsequently to this Authority for the purposes of supplementary international search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DE2010/001081

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007122086 A1	01-11-2007	CA 2648499 A1 EA 200870457 A1 EP 2013350 A1 JP 2009534019 T US 2009205073 A1	01-11-2007 28-04-2009 14-01-2009 24-09-2009 13-08-2009

WO 2009141446 A1	26-11-2009	NONE	

WO 2010025888 A2	11-03-2010	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2010/001081

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C07K14/415 C12N15/82 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07K C12N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SUNG SIBUM ET AL: "A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis", GENES & DEVELOPMENT, Bd. 20, Nr. 23, Dezember 2006 (2006-12), Seiten 3244-3248, XP002616054, ISSN: 0890-9369 Seite 3244 - Seite 3245; Abbildungen 1D, 1C	1-10
X	----- WO 2007/122086 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; GIELEN JOHANNES JACOBUS LUDGER [FR];) 1. November 2007 (2007-11-01) Seite 3; Ansprüche 1, 32, 33, 42; Beispiel 7; Tabelle 1 ----- -/--	1,5-10
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. Januar 2011		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 27/01/2011
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Krüger, Julia

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2010/001081

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	WO 2009/141446 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; GIELEN JOHANNES JACOBUS LUDGER [FR];) 26. November 2009 (2009-11-26) Seite 2 - Seite 7; Anspruch 18; Beispiele 2,3 -----	1,5-10
X,P	WO 2010/025888 A2 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG [CH]; VAN ROGGEN PETRA PETRONELLA MA [SE];) 11. März 2010 (2010-03-11) Seite 4, Absatz 4; Beispiel 5; Tabelle 3 -----	1,5-10
T	JUNG C ET AL: "Flowering time control and applications in plant breeding", TRENDS IN PLANT SCIENCE, ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, Bd. 14, Nr. 10, 1. Oktober 2009 (2009-10-01), Seiten 563-573, XP026668259, ISSN: 1360-1385, DOI: DOI:10.1016/J.TPLANTS.2009.07.005 [gefunden am 2009-08-27] Seite 3; Ansprüche 29, 32, 33,42; Beispiel 7; Tabelle 1 -----	1-10
X	DATABASE EMBL [Online] 1. Januar 2008 (2008-01-01), "UFL_192_45 Cotton fiber 0-10 day post anthesis Gossypium hirsutum cDNA, mRNA sequence.", XP002616055, gefunden im EBI accession no. EMBL:ES815074 Database accession no. ES815074 das ganze Dokument -----	1
X	DATABASE Geneseq [Online] 18. Oktober 2007 (2007-10-18), "Glycine max cDNA SEQ ID NO:128994.", XP002616056, gefunden im EBI accession no. GSN:AFP37816 Database accession no. AFP37816 das ganze Dokument & US 2004/031072 A1 (LA ROSA THOMAS J [US] ET AL) 12. Februar 2004 (2004-02-12) Sequenz 128994 ----- -/--	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE2010/001081

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE UniProt [Online]</p> <p>24. März 2009 (2009-03-24), "SubName: Full=Putative uncharacterized protein;", XP002616057, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:B9RPB3 Database accession no. B9RPB3 das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2010/001081

Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz**, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:
 - a. (Form)
 - in Papierform
 - in elektronischer Form
 - b. (Zeitpunkt)
 - in der eingereichten internationalen Anmeldung
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in elektronischer Form
 - bei dieser Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht wurde.
2. Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, dass die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.
3. Zusätzliche Bemerkungen:

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2010/001081

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2007122086 A1	01-11-2007	CA 2648499 A1	01-11-2007
		EA 200870457 A1	28-04-2009
		EP 2013350 A1	14-01-2009
		JP 2009534019 T	24-09-2009
		US 2009205073 A1	13-08-2009

WO 2009141446 A1	26-11-2009	KEINE	

WO 2010025888 A2	11-03-2010	KEINE	
