



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 11 2008 000 747 T5** 2010.01.28

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
 (87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2008/116829**
 in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
 (21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2008 000 747.0**
 (86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2008/053382**
 (86) PCT-Anmeldetag: **20.03.2008**
 (87) PCT-Veröffentlichungstag: **02.10.2008**
 (43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
 in deutscher Übersetzung: **28.01.2010**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/82** (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

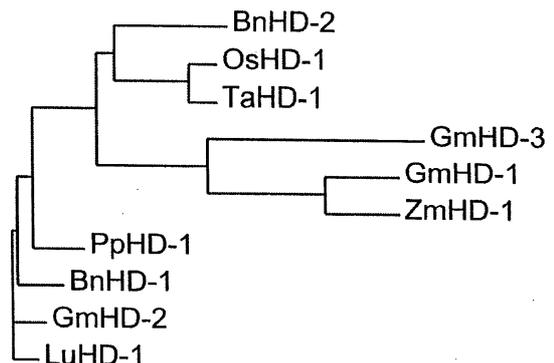
(30) Unionspriorität:
60/896,505 **23.03.2007** **US**

(72) Erfinder:
**Shirley, Amber, Dr., Durham, N.C., US; Allen,
 Damian, Urbana, Ill., US; McKersie, Bryan,
 Raleigh, N.C., US**

(71) Anmelder:
**BASF Plant Science GmbH, 67063 Ludwigshafen,
 DE**

(54) Bezeichnung: **Transgene Pflanzen mit erhöhter Stresstoleranz und erhöhtem Ertrag**

(57) Hauptanspruch: Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine tRNA 2'-Phosphotransferase kodiert, transformiert ist.



Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein transgene Pflanzen, die Nukleinsäuresequenzen überexprimieren, welche für Polypeptide kodieren, die fähig sind, unter normalen Bedingungen oder unter abiotischen Streßbedingungen erhöhte Streßtoleranz und daher erhöhtes Pflanzenwachstum und erhöhten Kulturpflanzenertrag zu vermitteln. Weiterhin betrifft die Erfindung neue isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide kodieren, die einer Pflanze unter abiotischen Streßbedingungen erhöhte Toleranz und/oder unter normalen Bedingungen oder unter abiotischen Streßbedingungen erhöhtes Pflanzenwachstum und erhöhten Ertrag vermitteln.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Abiotische Umweltstreßfaktoren wie Trockenheit, Versalzung, Hitze und Kälte sind wichtige limitierende Faktoren des Pflanzenwachstums und des Kulturpflanzenertrags. Der Kulturpflanzenertrag wird im vorliegenden Text als Anzahl Bushel des entsprechenden Agrarprodukts (wie Korn, Feldfutter oder Samen), das pro Acre geerntet wird, definiert. Kulturpflanzenverluste und Kulturpflanzenertragsverluste von Hauptkulturen wie Sojabohne, Reis, Mais, Baumwolle und Weizen, die von diesen Streßfaktoren verursacht werden, stellen einen wesentlichen ökonomischen und politischen Faktor dar und führen in vielen unterentwickelten Ländern zu Nahrungsmittelknappheit.

[0003] Die Verfügbarkeit von Wasser ist ein wichtiger Aspekt der abiotischen Streßfaktoren und ihrer Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum. Sind die Pflanzen ständig Trockenheitsbedingungen ausgesetzt, so führt dies zu wesentlichen Veränderungen in ihrem Stoffwechsel, die letztendlich zum Zelltod und daher zu Ertragsverlusten führen. Da ein hoher Salzgehalt in manchen Böden dazu führt, daß weniger Wasser für die Aufnahme durch die Zelle verfügbar ist, hat eine hohe Salzkonzentration eine Auswirkung auf die Pflanzen, die der Auswirkung der Trockenheit auf Pflanzen ähnelt. Außerdem verlieren die Pflanzenzellen bei Temperaturen unter Null Wasser aufgrund von Eisbildung innerhalb der Pflanze. Die Kulturpflanzenschädigung durch Trockenheits-, Hitze-, Salz- und Kältestreß beruht daher in erster Linie auf Dehydratation.

[0004] Da die Pflanzen während ihres Lebenszyklus typischerweise Bedingungen mit verringerter Wasserverfügbarkeit ausgesetzt sind, haben die Pflanzen während ihrer Evolution Schutzmaßnahmen gegen Austrocknung durch abiotische Streßfaktoren entwickelt. Wenn jedoch die Schwere und Dauer dieser Austrocknungsbedingungen übermäßig sind, so sind die Auswirkungen auf die Entwicklung, das Wachstum, die Pflanzengröße und den Ertrag der meisten Kulturpflanzen stark. Die Entwicklung von Pflanzen mit effizienter Wassernutzung ist daher eine Strategie, die die Möglichkeit eröffnet, das Leben der Menschen auf der ganzen Welt wesentlich zu verbessern.

[0005] Klassische Strategien der Pflanzenzüchtung sind relativ langsam, und man benötigt dabei Ausgangslinien mit abiotischer Streßtoleranz, die mit anderem genetischem Material gekreuzt werden, um neue Linien mit abiotischer Streßresistenz zu entwickeln. Dadurch, daß für solche Ausgangslinien genetisches Material nur begrenzt zur Verfügung steht und daß bei Kreuzungen zwischen entfernt verwandten Pflanzenarten Inkompatibilität auftritt, ergeben sich wesentliche Probleme bei der konventionellen Züchtung. Züchtung auf Toleranz ist weitgehend erfolglos geblieben.

[0006] In vielen landwirtschaftlichen Biotechnologiefirmen wurde beim Versuch, transgene Kulturpflanzen mit abiotischer Streßtoleranz zu entwickeln, versucht, Gene zu identifizieren, die eine Toleranz gegenüber abiotischen Streßreaktionen vermitteln könnten. Obwohl einige Gene, die an Streßreaktionen oder Wasserverwertungseffizienz bei Pflanzen beteiligt sind, charakterisiert wurden, so ist und bleibt die Charakterisierung und Clonierung von Pflanzengenen, die Streßtoleranz und/oder Wasserverwertungseffizienz vermitteln, größtenteils unvollständig und aufgespalten. Bis zum heutigen Tag ist der Erfolg bei der Entwicklung von transgenen Kulturpflanzen mit abiotischer Streßtoleranz beschränkt geblieben und keine solche Pflanzen sind auf dem Markt gebracht worden.

[0007] Um transgene Kulturpflanzen mit abiotischer Streßtoleranz zu entwickeln, muß man mehrere Parameter in Modellpflanzensystemen, in Gewächshausstudien von Kulturpflanzen und in Feldversuchen prüfen. So ist zum Beispiel die Wassernutzungseffizienz (WUE) ein Parameter, der häufig mit Trockenheitstoleranz korreliert ist. Untersuchungen der Reaktion einer Pflanze auf Austrocknung, osmotischen Schock und Temperaturextreme werden auch dazu verwendet, um die Toleranz oder Resistenz der Pflanze gegen abiotische Streß-

faktoren zu bestimmen. Testet man auf die Auswirkung des Vorhandenseins eines Transgens auf die Streßtoleranz einer Pflanze, so ist die Fähigkeit, die Bodeneigenschaften, die Temperatur, die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen und die Lichtintensität zu standardisieren, ein intrinsischer Vorteil von Gewächshaus- oder Pflanzenwuchskammerumwelten im Vergleich zum Feld.

[0008] Die WUE wurde auf verschiedene Art und Weise definiert und bestimmt. Ein Ansatz besteht darin, das Verhältnis der Gesamtpflanzentrockengewichts zu dem Wassergewicht, das von der Pflanze während ihres Lebens aufgenommen wird, zu berechnen. Eine andere Variation besteht darin, ein kürzeres Zeitintervall zu verwenden, wenn Biomasseakkumulation und Wassernutzung gemessen werden. Ein weiterer Ansatz wiederum ist die Verwendung von Messungen von eingeschränkten Teilen der Pflanze, zum Beispiel die ausschließliche Messung des oberirdischen Wachstums und der Wassernutzung. Die WUE wurde auch als Verhältnis der CO₂-Aufnahme zu dem Wasserdampfverlust von einem Blatt oder von einem Teil eines Blatts definiert, was häufig über einen sehr kurzen Zeitraum (z. B. Sekunden/Minuten) gemessen wurde. Das Verhältnis des im Pflanzengewebe fixierten ¹³C/¹²C, das mit einem Isotopen Verhältnis-Massenspektrometer gemessen wird, wurde ebenfalls für die Schätzung der WUE in Pflanzen, bei denen C₃-Photosynthese stattfindet, verwendet.

[0009] Eine erhöhte WUE bietet Informationen über die relativ verbesserte Wachstumseffizienz bzw. den relativ verbesserten Wasserverbrauch, diese Information allein gibt jedoch nicht an, ob sich einer dieser beiden Vorgänge verändert hat oder ob sich beide verändert haben. Bei der Selektion von Merkmalen für die Verbesserung von Kulturpflanzen hätte eine erhöhte WUE aufgrund einer verringerten Wassernutzung ohne Veränderung des Wachstums besonders bei einem bewässerten Agrarsystem, wo die Kosten des Betriebsmittels Wasser hoch sind, einen Vorteil. Eine erhöhte WUE, die in erster Linie auf einem erhöhtem Wachstum ohne entsprechendem starkem Ansteigen der Wassernutzung beruht, wäre auf alle Agrarsysteme anwendbar. Bei vielen Agrarsystemen, wo die Wasserversorgung nicht limitierend ist, könnte ein erhöhtes Wachstum auch dann den Ertrag erhöhen, wenn dies auf Kosten einer Erhöhung der Wassernutzung erfolgte (d. h. keine veränderte WUE). Um die landwirtschaftliche Produktivität zu verbessern, sind daher neue Verfahren zur Erhöhung nicht nur der WUE, sondern auch der Biomasseakkumulation, erforderlich.

[0010] Mit Messungen von Parametern, die mit abiotischer Streßtoleranz korrelieren, gehen Messungen von Parametern, die die potentielle Auswirkung eines Transgens auf den Kulturpflanzenenertrag angeben, einher. Bei Futterkulturen wie Luzerne, Silomais und Heu korreliert die pflanzliche Biomasse mit dem Gesamtertrag. Bei Kornfrüchten wurden jedoch andere Parameter eingesetzt, um den Ertrag zu schätzen, wie zum Beispiel die Pflanzengröße, die über Gesamtpflanzentrockengewicht, Trockengewicht der oberirdischen Pflanzenteile, Frischgewicht der oberirdischen Pflanzenteile, Blattfläche, Stengelvolumen, Pflanzenhöhe, Rosettendurchmesser, Blattlänge, Wurzellänge, Wurzelmasse, Anzahl der Bestockungstriebe und Anzahl Blätter bestimmt wird. Die Pflanzengröße in einem frühen Entwicklungsstadium wird typischerweise mit der Pflanzengröße in einem späteren Entwicklungsstadium korrelieren. Eine größere Pflanze mit einer größeren Blattfläche kann typischerweise mehr Licht und Kohlendioxid als eine kleinere Pflanze absorbieren und es ist daher wahrscheinlich, daß sie über denselben Zeitraum mehr an Gewicht zunimmt. Dies kommt zu der möglichen Fortsetzung des Mikroumweltvorteils bzw. des genetischen Vorteils, den die Pflanze hatte, um ihre größere Größe ursprünglich zu erreichen, noch dazu. Bei der Pflanzengröße und der Wachstumsrate besteht eine starke genetische Komponente, und die Pflanzengröße unter ein und derselben Umweltbedingung wird für eine Reihe von verschiedenen Genotypen vermutlich mit der Größe unter einer anderen Umweltbedingung korrelieren. Auf diese Weise verwendet man eine Standardumwelt, um die verschiedenen und dynamischen Umwelten, die von den Kulturpflanzen im Feld an verschiedenen Standorten und zu verschiedenen Zeiten angetroffen werden, ungefähr wiederzugeben.

[0011] Der Harvest Index, das Verhältnis zwischen Kornertrag zu dem Trockengewicht der oberirdischen Pflanzenteile, ist unter vielen Umweltbedingungen relativ stabil und ermöglicht so eine robuste Korrelation zwischen Pflanzengröße und Kornertrag. Pflanzengröße und Kornertrag sind intrinsisch miteinander verbunden, da der Großteil der Kornbiomasse von der gegenwärtigen oder gespeicherten Photosyntheseproduktivität der Blätter und des Stengels der Pflanze abhängt. Eine Selektion auf Pflanzengröße, auch schon in frühen Entwicklungsstadien, wurde daher eingesetzt, um auf Pflanzen zu screenen, die in Feldversuchen einen erhöhten Ertrag zeigen könnten. Wie bei der abiotischen Streßtoleranz sind Messungen der Pflanzengröße während der frühen Entwicklung unter standardisierten Bedingungen in einer Wachstumskammer oder im Gewächshaus Standardmethoden, um mögliche Ertragsvorteile, die durch das Vorhandensein eines Transgens vermittelt werden, zu messen.

[0012] Es besteht daher ein Bedarf daran, zusätzliche Gene, die in streßtoleranten Pflanzen und/oder in Pflanzen mit effizienter Wassernutzung exprimiert werden, und die über die Fähigkeit verfügen, der Wirtspflan-

ze und anderen Pflanzenarten Streßtoleranz und/oder verbesserte Wassernutzungseffizienz zu vermitteln, zu identifizieren. Neu erzeugte streßtolerante Pflanzen und/oder Pflanzen mit erhöhter Wassernutzungseffizienz werden viele Vorteile aufweisen, wie ein erweitertes Anbauspektrum dieser Nutzpflanzen, zum Beispiel dadurch, daß der Wasserbedarf einer Pflanzenart verringert wird. Zu anderen wünschenswerten Vorteilen zählt die Resistenz gegen das Lagern, dem Umbiegen der Sprosse oder Stengel als Reaktion auf Wind, Regen, Schädlinge oder Krankheiten.

DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben entdeckt, daß das Transformieren einer Pflanze mit gewissen Polynukleotiden zu der Verbesserung des Wachstums und/oder der Reaktion der Pflanze auf Umweltstreß führt, und der Ertrag der Agrarprodukte der Pflanze ist daher erhöht, wenn die Polynukleotide in der Pflanze in Form von Transgenen vorliegen. Die Polynukleotide, die fähig sind, solche Verbesserungen zu vermitteln, wurden aus *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Zea mays*, *Linum usitatissimum*, *Oryza sativa*, *Glycine max* oder *Triticum aestivum* isoliert und sind in Tabelle 1 aufgelistet, und ihre Sequenzen sind in der Sequenzbeschreibung wie in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1

Bezeichnung des Gens	Gen-ID	Organismus	Polynukleotid SEQ ID NO	Aminosäure SEQ ID NO
PpTPT-1	E+ST 214	<i>P. patens</i>	1	2
PpCDC2-1	EST 280	<i>P. patens</i>	3	4
PpLRP-1	EST 298a	<i>P. patens</i>	5	6
	EST 298b	<i>P. patens</i>	55	56
	EST 298c	<i>P. patens</i>	57	58
PpRBP-1	EST 300	<i>P. patens</i>	7	8
PpPD-1	EST 362	<i>P. patens</i>	9	10
PpMSC-1	EST 378	<i>P. patens</i>	11	12
PpMBP-1	EST 398	<i>P. patens</i>	13	14
PpAK-1	EST 407	<i>P. patens</i>	15	16
PpZF-6	EST 458	<i>P. patens</i>	17	18
PpCDK-1	EST 479	<i>P. patens</i>	19	20
PpZF-7	EST 520	<i>P. patens</i>	21	22
PpMFP-1	EST 544	<i>P. patens</i>	23	24
PpLRP-2	EST 545	<i>P. patens</i>	25	26
PpPPK-1	EST 549	<i>P. patens</i>	27	28
PpSRP-1	EST 554	<i>P. patens</i>	29	30
PpCBL-1	EST 321	<i>P. patens</i>	31	32
PpCBL-2	EST 416	<i>P. patens</i>	33	34
PpHD-1	EST 468	<i>P. patens</i>	35	36
BnHD-1	BN51361834	<i>B. napus</i>	37	38
BnHD-2	BN50000854	<i>B. napus</i>	39	40
ZmHD-1	ZM59324542	<i>Z. mays</i>	41	42
LuHD-1	LU61552369	<i>L. usitatissimum</i>	43	44
OsHD-1	OS34631911	<i>O. sativa</i>	45	46
GmHD-1	GM59700314	<i>G. max</i>	47	48
GmHD-2	GM49753757	<i>G. max</i>	49	50
GmHD-3	GM50270592	<i>G. max</i>	51	52
TaHD-1	TA60089198	<i>T. aestivum</i>	53	54

[0014] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine tRNA-2'-Phosphotransferase kodiert, transformiert ist, bereit.

[0015] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine Zellteilungskontrolle-Proteinkinase kodiert, transformiert ist, bereit.

[0016] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein mit leucinreichen Repeats kodiert, transformiert ist, bereit.

[0017] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Ran-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Plastiden-Teilungsprotein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Mitochondrien-Substrat-Trägerprotein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0020] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MADS-box-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Adenosinkinase-1-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Zinkfinger-6-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein einer regulatorischen Untereinheit einer cyclinabhängigen Kinase kodiert, transformiert ist, bereit.

[0024] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Zinkfinger-7-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MAR-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0026] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Rezeptorprotein mit leucinreichen Repeats kodiert, transformiert ist, bereit.

[0027] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Phytochrom-Proteinkinase-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0028] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Synaptobrevin-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0029] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Synaptobrevin-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

onskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Calcineurin-B-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0030] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Caleosin-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0031] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Histon-Deacetylase-Protein kodiert, transformiert ist, bereit.

[0032] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Samen, der von der erfindungsgemäßen transgenen Pflanze erzeugt wird, wobei der Samen für ein Transgen umfassend das oben beschriebene Polynukleotid reinerbig ist. Pflanzen, die sich aus den erfindungsgemäßen Samen entwickeln, weisen im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze unter normalen Bedingungen oder unter Streßbedingungen eine erhöhte Toleranz gegenüber einem Umweltstreß und/oder ein erhöhtes Pflanzenwachstum und/oder einen erhöhten Ertrag auf.

[0033] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Produkte aus oder von den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen, ihren Pflanzenteilen oder ihren Samen, wie ein Nahrungsmittel, ein Futtermittel, ein Nahrungsergänzungsmittel, ein Futterergänzungsmittel, ein Kosmetikum oder ein Pharmazeutikum.

[0034] Die Erfindung stellt weiterhin die in Tabelle 1 oder Tabelle 2 unten identifizierten isolierten Polynukleotide und die in Tabelle 1 identifizierten Polypeptide bereit. Eine Ausführungsform der Erfindung ist auch ein rekombinanter Vektor, der ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid umfaßt.

[0035] In einer weiteren Ausführungsform wiederum betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der genannten transgenen Pflanze, wobei das Verfahren umfaßt, daß man eine Pflanzenzelle mit einem Expressionsvektor umfassend ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid transformiert, und aus der Pflanzenzelle eine transgene Pflanze erzeugt, die das von dem Polynukleotid kodierte Polypeptid exprimiert. Die Expression des Polypeptids in der Pflanze führt im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze unter normalen Bedingungen und/oder unter Streßbedingungen zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß und/oder zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag.

[0036] In einer weiteren Ausführungsform wiederum stellt die Erfindung ein Verfahren zur Erhöhung der Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Umweltstreß und/oder zur Erhöhung des Wachstums und/oder des Ertrags einer Pflanze bereit. Das Verfahren umfaßt die Schritte Transformieren einer Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette umfassend ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid, und Erzeugen einer transgenen Pflanze aus der Pflanzenzelle, wobei die transgene Pflanze das Polynukleotid umfaßt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0037] [Fig. 1](#) ist ein Diagramm, das die phylogenetische Verwandtschaft zwischen den beschriebenen Aminosäuresequenzen PpHD-1 (SEQ ID NO: 36), BnHD-1 (SEQ ID NO: 38), BnHD-2 (SEQ ID NO: 40), ZmHD-1 (SEQ ID NO: 42), LuHD-1 (SEQ ID NO: 44), OsHD-1 (SEQ ID NO: 46), GmHD-1 (SEQ ID NO: 48), GmHD-2 (SEQ ID NO: 50), GmHD-3 (SEQ ID NO: 52) und TaHD-1 (SEQ ID NO: 54) erläutert. Das Diagramm wurde unter Verwendung von Align X von Vector NTI erzeugt.

[0038] [Fig. 2](#) zeigt ein Alignment der beschriebenen Aminosäuresequenzen: PpHD-1 (SEQ ID NO: 36), BnHD-1 (SEQ ID NO: 38), BnHD-2 (SEQ ID NO: 40), ZmHD-1 (SEQ ID NO: 42), LuHD-1 (SEQ ID NO: 44), OsHD-1 (SEQ ID NO: 46), GmHD-1 (SEQ ID NO: 48), GmHD-2 (SEQ ID NO: 50), GmHD-3 (SEQ ID NO: 52) und TaHD-1 (SEQ ID NO: 54). Das Alignment wurde unter Verwendung von Align X von Vector NTI erzeugt.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0039] In der gesamten vorliegenden Anmeldung wird auf verschiedene Veröffentlichungen Bezug genommen. Die Beschreibungen von all diesen Veröffentlichungen und den Literaturangaben, die innerhalb dieser Veröffentlichungen zitiert werden, werden hiermit vollständig durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung aufgenommen, um den Stand der Technik, auf den sich die vorliegende Erfindung bezieht, vollständiger zu beschreiben. Die im vorliegenden Zusammenhang verwendete Terminologie dient lediglich der Beschreibung von bestimmten Ausführungsformen und ist nicht als einschränkend zu verstehen. Im vorliegenden Zusammenhang kann „ein/e“ ein/e oder mehr bedeuten, je nach dem Zusammenhang, in dem dieses Wort ver-

wendet wird. So kann zum Beispiel, wenn „eine Zelle“ erwähnt wird, dies bedeuten, daß mindestens eine Zelle verwendet werden kann.

[0040] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze, die ein in Tabelle 1 identifiziertes isoliertes Polynukleotid oder ein Homolog davon überexprimiert, bereit. Die erfindungsgemäße transgene Pflanze weist im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze eine erhöhte Toleranz gegenüber einem Umweltstreß auf. Die Überexpression von solchen isolierten Nukleinsäuren in der Pflanze kann unter normalen Bedingungen oder unter Streßbedingungen im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze gegebenenfalls zu einem erhöhten Pflanzenwachstum oder einem erhöhten Ertrag von damit in Zusammenhang stehenden Agrarprodukten führen. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, wird angenommen, daß die erhöhte Toleranz gegenüber einem Umweltstreß das erhöhte Wachstum und/oder der erhöhte Ertrag einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze das Ergebnis einer erhöhten Wassernutzungseffizienz der Pflanze ist.

[0041] Wie im vorliegenden Text definiert versteht man unter einer „transgenen Pflanze“ eine Pflanze, die unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechnik dahingehend verändert wurde, daß sie eine isolierte Nukleinsäure enthält, die sonst in der Pflanze nicht vorliegen würde. Im vorliegenden Zusammenhang beinhaltet der Ausdruck „Pflanze“ eine ganz Pflanze, Pflanzenzellen und Pflanzenteile. Zu Pflanzenteilen zählen, jedoch nicht einschränkend, Stengel, Wurzeln, Ovula, Stabblätter, Blätter, Embryonen, meristematische Regionen, Kallusgewebe, Gametophyten, Sporophyten, Pollen, Mikrosporen und dergleichen. Die erfindungsgemäße transgene Pflanze kann pollensteril oder pollenfertil sein und kann weiterhin Transgene beinhalten, bei denen es sich nicht um diejenigen, die die im vorliegenden Text beschriebenen isolierten Polynukleotid beinhalten, handelt.

[0042] Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Sorte“ auf eine Gruppe von Pflanzen innerhalb einer Art, denen konstante Charakteristika gemeinsam sind, die sie von der typischen Form und von anderen möglichen Sorten innerhalb dieser Art unterscheiden. Eine Sorte weist nicht nur mindestens ein unterscheidbares Merkmal auf, sondern ist auch durch ein gewisses Ausmaß an Variation zwischen den Einzelorganismen innerhalb der Sorte gekennzeichnet, und zwar in erster Linie auf Grundlage der mendelschen Aufspaltung der Merkmale unter der Nachkommenschaft von aufeinanderfolgenden Generationen. Eine Sorte gilt als „reinerbig“ für ein bestimmtes Merkmal, wenn sie genetisch für dieses Merkmal so stark homozygot ist, daß, wenn die reinerbige Sorte selbstbestäubt wird, kein wesentliches Ausmaß an unabhängiger Aufspaltung dieses Merkmals innerhalb der Nachkommenschaft beobachtet wird. Bei der vorliegenden Erfindung entsteht das Merkmal aufgrund der transgenen Expression von einer oder mehreren isolierten Polynukleotide, die in eine Pflanzensorte eingeführt werden. Ebenso im vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Begriff „Wildtypsorte“ eine Gruppe von Pflanzen, die aus Vergleichszwecken als Kontrollpflanze analysiert werden, wobei die Pflanze der Wildtypsorte mit der transgenen Pflanze (Pflanze, die mit einem erfindungsgemäßen isolierten Polynukleotid transformiert wurde) mit der Ausnahme, daß die Pflanze der Wildtypsorte nicht dahingehend transformiert wurde, daß sie ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid enthält, identisch ist.

[0043] Wie im vorliegenden Zusammenhang definiert sind die Begriffe „Nukleinsäure“ und „Polynukleotid“ austauschbar und beziehen sich auf RNA oder DNA, die geradkettig oder verzweigt, einzel- oder doppelsträngig oder ein Hybrid davon ist. Der Begriff umfaßt auch RNA/DNA-Hybride. Ein „isoliertes“ Nukleinsäuremolekül ist eines, das von den anderen Nukleinsäuremolekülen, die in dem natürlichen Ausgangsmaterial der Nukleinsäure vorliegen (d. h. Sequenzen, die für andere Polypeptide kodieren), im wesentlichen getrennt ist. So zum Beispiel wird eine clonierte Nukleinsäure als isoliert betrachtet. Eine Nukleinsäure wird auch dann als isoliert betrachtet, wenn sie durch das Eingreifen des Menschen verändert wurde oder an einem Locus oder einer Stelle plaziert wurde, bei dem/der es sich nicht um ihren natürlichen Ort handelt, oder wenn sie durch Transformation in eine Zelle eingeführt wurde. Weiterhin kann ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, frei von einem Teil des sonstigen Zellmaterials, mit dem es auf natürliche Weise assoziiert ist, bzw. von dem Kulturmedium, wenn es mittels Rekombinationstechniken hergestellt wurde, oder chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wurde, sein. Obwohl es gegebenenfalls eine untranslatierte Sequenz, die sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende der Kodierregion eines Gens vorliegen kann, umfassen kann, kann es bevorzugt sein, die Sequenzen, die die Kodierregion in ihrem natürlich vorkommenden Replikon auf natürliche Weise flankieren, zu entfernen.

[0044] Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Umweltstreß“ auf eine suboptimale Bedingung, die mit Salzstreß, Trockenheitsstreß, Stickstoffstreß, Temperaturstreß, Metallstreß, chemischem Streß, pathogen bedingtem Streß oder oxidativem Streß oder einer beliebigen Kombination davon einhergeht. Die Begriffe „Wassernutzungseffizienz“ und „WUE“ beziehen sich auf die Menge organischer Substanz, die von einer Pflanze erzeugt wird, dividiert durch die Menge Wasser, die von der Pflanze bei deren Erzeugung ver-

wendet wird, d. h. das Trockengewicht einer Pflanze in Relation zu der Wassernutzung der Pflanze. Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Trockengewicht“ auf alles in der Pflanze außer Wasser und er beinhaltet zum Beispiel Kohlenhydrate, Proteine, Öle und mineralische Nährstoffe.

[0045] Zur Erzeugung einer erfindungsgemäßen transgenen Pflanze kann jede beliebige Pflanzenart transformiert werden. Bei der erfindungsgemäßen transgenen Pflanze kann es sich um eine dikotyle Pflanze oder eine monokotyle Pflanze handeln. Beispielhaft und nicht einschränkend können erfindungsgemäße transgene Pflanzen von jeder beliebigen der folgenden dikotylen Pflanzenfamilien abstammen: Leguminosae, darunter Pflanzen wie Erbse, Luzerne und Sojabohne; Umbelliferae, darunter Pflanzen wie Karotte und Sellerie; Solanaceae, darunter Pflanzen wie Tomate, Kartoffel, Aubergine, Tabak und Paprika; Cruciferae, insbesondere die Gattung Brassica, die Pflanzen wie Raps, Rübe, Kohl, Blumenkohl und Brokkoli beinhaltet; und Arabidopsis thaliana; Compositae, darunter Pflanzen wie Salat; Malvaceae, darunter Baumwolle; Fabaceae, darunter Pflanzen wie Erdnuß und dergleichen. Erfindungsgemäße transgene Pflanzen können von monokotylen Pflanzen abstammen, wie zum Beispiel Weizen, Gerste, Sorghumhirse, Millethirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Hafer, Rutenhirse, Miscanthus und Zuckerrohr. Erfindungsgemäße transgene Pflanzen können auch Bäume wie Apfel, Birne, Quitte, Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Papaya, Mango und andere Gehölzarten, darunter Koniferen und laubabwerfende Bäume wie Pappel, Kiefer, Sequoia, Zeder, Eiche, Weide und dergleichen sein. Besonders bevorzugt sind Arabidopsis thaliana, Nicotiana tabacum, Raps, Sojabohne, Mais, Weizen, Lein, Kartoffel und Tagetes.

[0046] Wie in Tabelle 1 dargestellt handelt es sich bei einer Ausführungsform der Erfindung um eine transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein tRNA-2'-Phosphotransferase-Polypeptid kodiert, transformiert ist. In der Hefe ist das RNA-2'-Phosphotransferase-Tpt1-Protein ein essentielles Protein, das den abschließenden Schritt des tRNA-Spleißens katalysiert. Obwohl diese Proteinfamilie in Eukaryonten, Bakterien und Archaea konserviert ist, ist ihre Funktion nur in der Hefe gut charakterisiert worden. Das tRNA-Spleißen ist in allen drei Hauptreichen konserviert, die Mechanismen und Enzyme, die daran beteiligt sind, sind jedoch unterschiedlich. Diese Unterschiede bewirken, daß die präzise Funktion von RNA-2'-Phosphotransferase-Proteinen in Pflanzen nach wie vor unklar ist, obwohl die enzymatische Aktivität in Extrakten aus Tabak-Zellkernen nachgewiesen wurde. Alle Mitglieder der RNA-2'-Phosphotransferase-Familie enthalten eine konservierte Kerndomäne, für die die Aminosäuren 98 bis 287 von SEQ ID NO: 2 als Beispiele dienen, und Vertreter von Escherichia coli Arabidopsis thaliana, Schizosaccharomyces pombe und Homo sapiens sind fähig, die Saccharomyces-cerevisiae-tpt1-Mutante zu komplementieren, was eine Funktionsähnlichkeit anzeigt.

[0047] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid, das für eine tRNA-2'-Phosphotransferase kodiert, umfassen. Vorzugsweise umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für eine tRNA-2'-Phosphotransferase mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 98 bis 287 von SEQ ID NO: 2 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für eine tRNA-2'-Phosphotransferase mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 323 von SEQ ID NO: 2 kodiert.

[0048] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine CDC2-Proteinkinase (Cell Division Control 2) kodiert, transformiert ist. Die CDC2-Proteine gehören zu einer bestimmten Familie der cyclinabhängigen Kinasen (CDKs) in Pflanzen, die allgemein als CDKA-Familie bezeichnet wird. Alle CDKA-Proteine enthalten eine stark konservierte Kernkinasendomäne mit einem PSTAIRE-Motiv, das die Hauptstelle für die Cyclininteraktion für die Bildung von aktiven CDK-Cyclin-Komplexen darstellt. Ein Beispiel für ein PSTAIRE-Motiv ist als Aminosäuren 4 bis 287 von SEQ ID NO: 4 dargestellt. Bei dem CDKA-Proteinen wird auch eine posttranslationelle Modifikation durchgeführt. Eine Phosphorylierung der konservierten Threonin-14- und Tyrosin-15-Positionen inaktiviert die CDKA, und eine Phosphorylierung der konservierten Threonin-161-Position aktiviert die CDKA. Bei der Hefe sind diese CDKs spezifisch an der G1/S- und G2/M-Kontrolle beteiligt. Bei Pflanzen wurde vorgeschlagen, daß die CDKAs beim Voranschreiten sowohl der S- als auch der M-Phase eine Funktion ausüben und bei der Zellproliferation und Aufrechterhaltung der Zellteilungskompetenz in sich differenzierenden Geweben beteiligt sind. Bei Arabidopsis thaliana zum Beispiel führt eine Mutation des CDKA1-Gens zu Letalität des männlichen Gametophyten und stört die Samenentwicklung durch Verringerung der Samengröße.

[0049] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid, das für eine CDC2-Proteinkinase kodiert, umfassen. Vorzugsweise umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein CDKA-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 4 bis 287 von SEQ ID NO: 4 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid,

das für ein CDKA-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 294 von SEQ ID NO: 4 kodiert.

[0050] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein mit leucinreichen Repeats (LRR-Protein) kodiert, transformiert ist. LRRs finden sich typischerweise in Proteinen als Repeats von 20 bis 29 Aminosäuren, die jeweils eine 11 Aminosäuren große konservierte Region mit der Konsensussequenz LXX-LXLXXN/CXL enthalten, wobei X eine beliebige Aminosäure bedeutet und L Valin, Leucin oder Phenylalanin bedeutet. Das LRR-Protein der vorliegenden Erfindung enthält ein LRR, das von den Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 6 dargestellt wird. Die allgemein akzeptierte Hauptfunktion von LRRs besteht darin, ein Strukturgerüst für die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen bereitzustellen. Es ist bekannt, daß LRR-enthaltende Proteine an Hormon-Rezeptor-Interaktionen, an der Enzymhemmung, an der Zelladhäsion, am Zelltransport, an der Krankheitsresistenz von Pflanzen und an der Virulenz von Bakterien beteiligt sind.

[0051] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 6 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 646 von SEQ ID NO: 6 kodiert.

[0052] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Ran-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist. Die Ran-GTPase-Proteine (RanGTP) gehören zu einer Unterfamilie von kleinen GTP-bindenden Proteinen, die am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind und die an der Kontrolle von Zellkernfunktionen während des gesamten Zellzyklus beteiligt sind. Die Ran-Bindungsproteine 1 (RanBP1s) sind zytoplasmatische Proteine, die mit der GTP-Form von RanGTP einen Komplex bilden. Die Bindungsdomäne von RanBP1, die mit RanGTP interagiert, ist identifiziert worden und wird durch die Aminosäuren 51 bis 172 von SEQ ID NO: 8 dargestellt. Die Bildung dieses RanGTP-RanBP1-Komplexes ist für die Förderung des Beginns der Dissoziation von RanGTP von Transportfaktoren, die vom Zellkern in das Zytoplasma exportiert werden, von entscheidender Bedeutung.

[0053] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein RanBP1-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 51 bis 172 von SEQ ID NO: 8 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein RanBP1-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 213 von SEQ ID NO: 8 kodiert.

[0054] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Plastidenteilungsprotein kodiert, transformiert ist. Die FtsZ-Plastidenteilungsproteine sind durch Domänen charakterisiert, die durch die Aminosäuren 139 bis 332 von SEQ ID NO: 10 dargestellt werden. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Plastidenteilungsprotein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 139 bis 332 von SEQ ID NO: 10 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Plastidenteilungsprotein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 490 von SEQ ID NO: 10 kodiert.

[0055] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Mitochondriensubstrat-Träger-Protein kodiert, transformiert ist. Die Mitochondriensubstrat-Träger-Proteine sind durch Domänen charakterisiert, die durch die Aminosäuren 1 bis 98 von SEQ ID NO: 12 dargestellt werden. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Mitochondriensubstrat-Träger-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 98 von SEQ ID NO: 12 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Mitochondriensubstrat-Träger-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 297 von SEQ ID NO: 12 kodiert.

[0056] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MADS-box-Protein kodiert, transformiert ist. Die DNA-Bindungsdomäne und die Dimerisierungsdomänen von Transkriptionsfaktoren des SRF-Typs umfassen die MADS-box-Domänen, die durch die Aminosäuren 9 bis 59 von SEQ ID NO: 14 dargestellt sind. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Transkriptionsfaktorprotein des SRF-Typs umfassend eine MADS-box-Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 9 bis 59 von SEQ ID NO: 14 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein MADS-box-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1

bis 187 von SEQ ID NO: 14 kodiert.

[0057] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Adenosinkinase-1-Protein (ADK1-Protein) kodiert, transformiert ist. Die pfkB-Familie der Kohlenhydratkinasen mit der Bezeichnung ADK-1 umfaßt Domänen, die durch die Aminosäuren 23 bis 339 von SEQ ID NO: 16 dargestellt sind. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein ADK-1-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 23 bis 339 von SEQ ID NO: 16 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein ADK-1-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 343 von SEQ ID NO: 16 kodiert.

[0058] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für Zinkfinger-6-Protein (ZF-6) kodiert, transformiert ist. Diese Proteine umfassen eine IBR-Domäne, die von den Aminosäuren 210 bis 272 von SEQ ID NO: 18 dargestellt wird. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein ZF-6-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 210 bis 272 von SEQ ID NO: 18 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein ZF-6-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 594 von SEQ ID NO: 18 kodiert.

[0059] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein einer regulatorischen Untereinheit der cyclinabhängigen Kinase (CDK) kodiert, transformiert ist. Diese Proteine umfassen eine Domäne, die von den Aminosäuren 1 bis 72 von SEQ ID NO: 20 dargestellt werden. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein CDK-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 72 von SEQ ID NO: 20 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein CDK-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 91 von SEQ ID NO: 20 kodiert.

[0060] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für Zinkfinger-7-Protein (ZF-7) kodiert, transformiert ist. Diese Proteine umfassen eine C3HC4-Typ-Domäne, die von den Aminosäuren 20 bis 60 von SEQ ID NO: 22 dargestellt wird. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein ZF-7-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 20 bis 60 von SEQ ID NO: 22 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein ZF-7-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 347 von SEQ ID NO: 22 kodiert.

[0061] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MAR-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform umfaßt ein Polynukleotid, das für ein MAR-Bindungsprotein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 814 von SEQ ID NO: 24 kodiert.

[0062] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für eine Rezeptorproteinkinase mit leucinreichen Repeats kodiert, transformiert ist. Das LRP-2-Protein der vorliegenden Erfindung enthält mehrere LRRs, die von den Aminosäuren 111 bis 133 von SEQ ID NO: 26, den Aminosäuren 135 bis 158 von SEQ ID NO: 26, den Aminosäuren 160 bis 182 von SEQ ID NO: 26 und den Aminosäuren 184 bis 207 von SEQ ID NO: 26 dargestellt sind. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein LRP-2-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 111 bis 133 von SEQ ID NO: 26, die Aminosäuren 135 bis 158 von SEQ ID NO: 26, die Aminosäuren 160 bis 182 von SEQ ID NO: 26 und die Aminosäuren 184 bis 207 von SEQ ID NO: 26 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 251 von SEQ ID NO: 26 kodiert.

[0063] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Phytochromproteinkinase-Protein kodiert, transformiert ist. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform umfaßt ein Polynukleotid, das für ein Phytochromproteinkinase-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 689 of SEQ ID NO: 28 kodiert.

[0064] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Synaptobrevin-Related-Protein kodiert, transformiert ist. Diese Proteine umfassen eine Synaptobrevin-Domäne, die von den Aminosäuren 127 bis 215 von SEQ ID NO: 30 dargestellt sind. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Synaptobrevin-Related-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 127 bis 215 von SEQ ID NO: 30 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Synaptobrevin-Related-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 222 von SEQ ID NO: 30 kodiert.

[0065] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Calcineurin-B-Protein kodiert, transformiert ist. Bei Pflanzen wurde eine Proteinfamilie gefunden, bei der es sich um Calciumsensorproteine mit einer Ähnlichkeit sowohl zu der Calcineurin-Regulationsuntereinheit B als auch zu den neuronalen Calciumsensoren von Tieren handelt. Diese Proteine wurden Calcineurin-B-artige Proteine (CBL) genannt. Diese CBL-Proteine enthalten EF-Hand-Motive, die strukturell für die Calciumbindung wichtig sind und die spezifisch mit einer Gruppe von Ser/Thr-Proteinkinasen mit der Bezeichnung „CBL-Interacting Protein Kinases“ (CIPK) spezifisch interagieren. Die CIPKs stellen höchstwahrscheinlich Angriffspunkte für Calcium, das von den CBL-Proteinen wahrgenommen und transduziert wird.

[0066] Jede EF-Hand besteht aus einem Loop von 12 Aminosäuren, die von zwei Alpha-Helices flankiert werden, wodurch ein einzelnes Calciumion über die Loop-Domäne gebunden wird. Es wurde auch gefunden, daß diese Proteine Magnesiumionen binden. Proteine mit vier EF-Hand-Motiven weisen üblicherweise zwei Strukturdomänen auf, die jeweils durch ein Paar EF-Hand-Motive, die durch einen flexiblen Linker getrennt sind, gebildet werden. Die Bindung des Metallions an das EF-Hand-Protein führt zu einer Konformationsänderung, die eine hydrophobe Oberfläche freilegt, welche an eine Zielsequenz bindet. Viele Proteine, die eine EF-Hand enthalten, enthalten auch eine Myristoylierungsstelle am N-terminalen Ende mit der Konsensus-Sequenz MGXXS/T, wobei X eine beliebige Aminosäure darstellt. Die Myristoylierung an dieser Stelle fördert die Protein-Protein- oder Protein-Membran-Interaktion. Diese Myristoylierungsstelle ist an der EST321-Sequenz (SEQ ID NO: 32) nicht vorhanden, was möglicherweise anzeigt, daß das EST321-Protein zu einer unterschiedlichen Klasse von Proteinen, die eine EF-Hand-Domäne enthalten, gehört.

[0067] Das erfindungsgemäße Protein der Calcineurin-Untereinheit B enthält mehrere EF-Hand-Motive, die von den Aminosäuren 37 bis 65 von SEQ ID NO: 32, den Aminosäuren 106 bis 134 von SEQ ID NO: 32 und den Aminosäuren 142 bis 170 von SEQ ID NO: 32 dargestellt werden. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Protein der Calcineurin-Untereinheit B mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 37 bis 65 von SEQ ID NO: 32, die Aminosäuren 106 bis 134 von SEQ ID NO: 32 und die Aminosäuren 142 bis 170 von SEQ ID NO: 32 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Protein der Calcineurin-Untereinheit B mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 182 von SEQ ID NO: 32 kodiert.

[0068] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein mit Caleosin verwandtes Protein kodiert, transformiert ist. Bei den Caleosinen handelt es sich um eine Proteinfamilien, die vermutlich durch Calciumbindung und dem Phosphorylierungsstatus moduliert werden und von denen angenommen wird, daß sie an der Fusion von Membranen und Ölkörperchen beteiligt sind. Diese Proteine enthalten mehrere Domänen, eine N-terminale Region mit einem einmal vorkommenden calciumionenbindenden EF-Hand-Motiv, eine zentrale hydrophobe Region mit einem potentiellen Membrananker und eine C-terminale Region mit konservierten Proteinkinasephosphorylierungsstellen. Das Vorhandensein von einem nur einmal vorkommenden EF-Hand-Motiv ist für die meisten EF-Hand-enthaltenden Proteine ungewöhnlich. Es wurde postuliert, daß diese einmal vorkommende EF-Hand-Domäne mit der Membranoberfläche von einem anderen Protein interagieren könnte, um die in den meisten anderen EF-Hand-Proteinen auftretende koordinierte Doppel-EF-Hand-Domäneninteraktion zu bilden.

[0069] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein mit Caleosin verwandtes Protein kodiert, transformiert ist. Diese Proteine umfassen eine Caleosin-Domäne, die von den Aminosäuren 26 bis 229 von SEQ ID NO: 34 dargestellt wird. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Caleosin-Related-Protein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 26 bis 229 von SEQ ID NO: 34 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Caleosin-Related-Protein mit einer Sequenz umfassend die Ami-

nosäuren 1 bis 239 von SEQ ID NO: 34 kodiert.

[0070] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Histondeacetylaseprotein kodiert, transformiert ist. Die Nukleosomen bestehen aus Histonen und DNA, die für die Verpackung der DNA zu Chromosomen essentiell sind. Lysin an den N-terminalen Enden von Kernhistonen sind die vorherrschenden Stellen für die Acetylierung und Methylierung, und die Histondeacetylasen katalysieren die Entfernung der Acetylgruppe von diesen Lysinseitenketten. Aktive Gene werden bevorzugt mit hochacetylierten Histonen assoziiert, und inaktive Gene werden mit hypoacetylierten Histonen assoziiert. Die Acetylierung führt zu einer Ladungsneutralisierung der Histone und schwächt die Histon/DNA-Kontakte. Bei Pflanzen ist eine Hyperacetylierung der Histone mit Genaktivität korreliert.

[0071] Es wurde gefunden, daß die Histone mit großen Komplexen mit mehreren Untereinheiten assoziiert sind. Bei Pflanzen finden sich drei unterschiedliche Familien von Histondeacetylasen, nämlich die RPD3/HDA-Familie, die SIR2-Familie und die für Pflanzen spezifische HD2-Familie. Die RPD3/HDA1-Familie findet sich bei allen eukaryontischen Organismen, und ihre Vertreter weisen eine vollständige Histondeacetylasedomäne auf. Manche Histondeacetylaseproteine verfügen über einmal vorkommende Regionen außerhalb der Histondeacetylasedomäne, die für die Funktion und/oder Spezifität dieser Proteine wichtig sein könnten.

[0072] Die Histondeacetylasen der vorliegenden Erfindung sind durch die folgenden Domänen charakterisiert: von Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 36; von Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 38; von Aminosäure 20 bis 332 von SEQ ID NO: 40; von Aminosäure 8 bis 322 von SEQ ID NO: 42; von Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 44; von Aminosäure 23 bis 333 von SEQ ID NO: 46; von Aminosäure 8 bis 321 von SEQ ID NO: 48; von Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 50; von Aminosäure 56 bis 382 von SEQ ID NO: 52 und von Aminosäure 23 bis 333 von SEQ ID NO: 54.

[0073] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Histondeacetylaseprotein kodiert, transformiert ist. Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein Histondeacetylaseprotein umfassend eine Domäne mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 36; Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 38; Aminosäure 20 bis 332 von SEQ ID NO: 40; Aminosäure 8 bis 322 von SEQ ID NO: 42; Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 44; Aminosäure 23 bis 333 von SEQ ID NO: 46; Aminosäure 8 bis 321 von SEQ ID NO: 48; Aminosäure 6 bis 318 von SEQ ID NO: 50; Aminosäure 56 bis 382 von SEQ ID NO: 52 und Aminosäure 23 bis 333 von SEQ ID NO: 54 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein Histondeacetylaseprotein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 431 von SEQ ID NO: 36; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 426 von SEQ ID NO: 38; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 470 von SEQ ID NO: 40; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 363 von SEQ ID NO: 42; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 429 von SEQ ID NO: 44; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 518 von SEQ ID NO: 46; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 334 von SEQ ID NO: 48; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 429 von SEQ ID NO: 50; Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 417 von SEQ ID NO: 52; und Protein mit der Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 519 von SEQ ID NO: 54 kodiert.

[0074] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein mit leucinreichen Repeats (LRR-Protein) kodiert, transformiert ist. LRRs finden sich typischerweise in Proteinen als Repeats von 20 bis 29 Aminosäuren, die jeweils eine 11 Aminosäuren große konservierte Region mit der Konsensussequenz LXX-LXLXXN/CXL enthalten, wobei X eine beliebige Aminosäure bedeutet und L Valin, Leucin oder Phenylalanin bedeutet. Das LRR-Protein der vorliegenden Erfindung enthält ein LRR, das von den Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 56 dargestellt wird. Die allgemein akzeptierte Hauptfunktion von LLRs besteht darin, ein Strukturgerüst für die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen bereitzustellen. Es ist bekannt, daß LRR-enthaltende Proteine an Hormon-Rezeptor-Interaktionen, an der Enzymhemmung, an der Zelladhäsion, am Zelltransport, an der Krankheitsresistenz von Pflanzen und an der Virulenz von Bakterien beteiligt sind.

[0075] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 56 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein LRR-Pro-

tein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 698 von SEQ ID NO: 56 kodiert.

[0076] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein mit leucinreichen Repeats (LRR-Protein) kodiert, transformiert ist. LRRs finden sich typischerweise in Proteinen als Repeats von 20 bis 29 Aminosäuren, die jeweils eine 11 Aminosäuren große konservierte Region mit der Konsensussequenz LXX-LXLXXN/CXL enthalten, wobei X eine beliebige Aminosäure bedeutet und L Valin, Leucin oder Phenylalanin bedeutet. Das LRR-Protein der vorliegenden Erfindung enthält ein LRR, das von den Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 58 dargestellt wird. Die allgemein akzeptierte Hauptfunktion von LLRs besteht darin, ein Strukturgerüst für die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen bereitzustellen. Es ist bekannt, daß LRR-enthaltende Proteine an Hormon-Rezeptor-Interaktionen, an der Enzymhemmung, an der Zelladhäsion, am Zelltransport, an der Krankheitsresistenz von Pflanzen und an der Virulenz von Bakterien beteiligt sind.

[0077] Die transgene Pflanze dieser Ausführungsform kann ein beliebiges Polynukleotid umfassen, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 422 bis 441 von SEQ ID NO: 58 kodiert. Stärker bevorzugt umfaßt die transgene Pflanze dieser Ausführungsform ein Polynukleotid, das für ein LRR-Protein mit einer Sequenz umfassend die Aminosäuren 1 bis 665 von SEQ ID NO: 58 kodiert.

[0078] Die Erfindung stellt weiterhin einen Samen bereit, der von einer transgenen Pflanze, die ein in Tabelle 1 angeführtes Polynukleotid exprimiert, erzeugt wird, wobei der Samen das Polynukleotid enthält, und wobei die Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze für erhöhtes Wachstum und/oder erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen und/oder unter Streßbedingungen und/oder für erhöhte Toleranz gegenüber einem Umweltstreß reinerbig ist.

[0079] Die Erfindung stellt auch ein Produkt bereit, das von oder aus den transgenen Pflanzen, die das Polynukleotid exprimieren, ihren Pflanzenteilen oder ihren Samen erzeugt wurde. Das Produkt kann unter Verwendung von verschiedenen fachlich gut bekannten Verfahren erhalten werden. Im vorliegenden Zusammenhang beinhaltet das Wort „Produkt“ ein Nahrungsmittel, ein Futtermittel, einen Nahrungsmittelergänzungstoff, einen Futtermittelergänzungstoff, ein Kosmetikum oder ein Pharmazeutikum, ist jedoch nicht hierauf beschränkt. Unter Nahrungsmittel versteht man Zusammensetzungen, die für die Ernährung oder für die Ergänzung der Ernährung bestimmt sind. Insbesondere werden Tierfuttermittel und Tierfuttermittelzusatzstoffe als Nahrungsmittel erachtet. Die Erfindung stellt weiterhin ein Agrarprodukt bereit, das von einer beliebigen der transgenen Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzensamen erzeugt wurde. Zu Agrarprodukten zählen Pflanzenextrakte, Proteine, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fette, Öle, Polymere, Vitamine und dergleichen, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0080] In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid ein Polynukleotid mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Polynukleotidsequenzen, die in Tabelle 1 angeführt sind. Diese Polynukleotide können Sequenzen der Kodierregion sowie 5'-nichttranslatierte Sequenzen und 3'-nichttranslatierte Sequenzen umfassen. In Tabelle 2 sind mögliche Start- und Endpositionen der Kodierregionen der erfindungsgemäßen Polynukleotide aus P. patens sowie alternative offene Leseraster, die in den sense- oder antisense-Strängen dieser Polynukleotide vorliegen können, beschrieben. Alternativ dazu können die erfindungsgemäßen Polynukleotide nur die Kodierregion der in Tabelle 1 angeführten Nukleotidsequenzen aufweisen, wie in Tabelle 2 angeführt, oder die Polynukleotide können ganze Genomfragmente, die aus genomischer DNA isoliert wurden, enthalten. Eine Ausführungsform der Erfindung ist daher auch ein isoliertes Polynukleotid mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Sequenzen.

Tabelle 2

Bez. d. Gens	GEN-ID	SEQ ID NO	OR Fs	Orf-Nummer	Strang	Startposition	Endposition
PpTPT-1	EST 214	1	1	1	sense	113	1104
PpCDC2-1	EST 280	3	2	1	sense	37	921
PpCDC2-1	EST 280	3	2	2	antisense	380	42
PpLRP-1	EST 298a	5	1	1	sense	144	2084
	EST 298b	55	1	1	sense	143	2236
	EST 298c	57	1	1	sense	1	1998
PpRBP-1	EST 300	7	1	1	sense	55	696
PpPD-1	EST 362	9	2	1	sense	47	1519
PpPD-1	EST 362	9	2	2	antisense	1197	604
PpMSC-1	EST 378	11	2	1	sense	453	1346
PpMSC-1	EST 378	11	2	2	antisense	1314	1027
PpMBP-1	EST 398	13	1	1	sense	33	878
PpAK-1	EST 407	15	3	1	sense	25	1056
PpAK-1	EST 407	15	3	2	sense	381	632
PpAK-1	EST 407	15	3	3	antisense	506	270
PpZF-6	EST 458	17	1	1	sense	126	1910
PpCDK-1	EST 479	19	2	1	sense	248	523
PpCDK-1	EST 479	19	2	2	antisense	304	104
PpZF-7	EST 520	21	2	1	sense	276	1319
PpZF-7	EST 520	21	2	2	sense	583	813
PpMFP-1	EST 544	23	1	1	sense	127	2571
PpLRP-2	EST 545	25	3	1	sense	225	980
PpLRP-2	EST 545	25	3	2	sense	416	694
PpLRP-2	EST 545	25	3	3	antisense	469	167
PpPPK-1	EST 549	27	1	1	sense	145	2214
PpSRP-1	EST 554	29	1	1	sense	20	688
PpCBL-1	EST 321	31	2	1	sense	43	591
PpCBL-1	EST 321	31	2	2	sense	803	1171
PpCBL-2	EST 416	33	1	1	sense	16	735
PpHD-1	EST 468	35	2	1	sense	166	1461
PpHD-1	EST 468	35	2	2	antisense	420	175

[0081] Ein erfindungsgemäßes Polynukleotid kann unter Verwendung von Standardmethoden der Molekularbiologie und der im vorliegenden Text bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. So wurden zum Beispiel erfindungsgemäße *P. patens*-cDNAs aus einer *P. patens*-Bibliothek unter Verwendung eines Abschnitts der im vorliegenden Text veröffentlichten Sequenz isoliert. Synthetische Oligonukleotid-Primer für die Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion können aufgrund der in Tabelle 1 gezeigten Nukleotidsequenz entwickelt werden. Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann unter Verwendung von cDNA oder alternativ dazu von genomischer DNA als Matrize und von entsprechenden Oligonukleotid-Primern nach Standardverfahren der PCR-Amplifikation amplifiziert werden. Das so amplifizierte Nukleinsäuremolekül kann in einen entsprechenden Vektor cloniert und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Weiterhin können Oligonukleotide, die den in Tabelle 1 angeführten Nukleotidsequenzen entsprechen, mittels standardmäßiger Synthesetechniken hergestellt werden, z. B. unter Verwendung eines automatisierten DNA-Synthesegeräts.

[0082] „Homologe“ werden im vorliegenden Text als zwei Nukleinsäuren oder Polypeptide mit ähnlichen oder

im wesentlichen identischen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen definiert. Homologe beinhalten Allelvarianten, Analoge und Orthologe, wie sie im folgenden definiert sind. Im folgenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Analoge“ auf zwei Nukleinsäuren, die dieselbe oder eine ähnliche Funktion ausüben, die jedoch getrennt in nichtverwandten Organismen im Lauf der Evolution entstanden sind. Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Orthologe“ auf zwei Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Arten, die jedoch im Lauf der Evolution aus einem gemeinsamen Vorfahren durch Artbildung entstanden sind. Der Begriff Homolog umfaßt weiterhin Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in Tabelle 1 gezeigten Nukleotidsequenzen aufgrund der Degeneration des genetischen Codes unterscheiden und die so für dasselbe Polypeptid kodieren. Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet ein „natürlich vorkommendes“ Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (z. B. die für ein natürliches Polypeptid kodiert).

[0083] Zur Bestimmung des Prozentsatzes der Identität von zwei Aminosäuresequenzen (z. B. einer der Polypeptidsequenzen aus Tabelle 1 und ein Homolog davon) werden die Sequenzen für optimale Vergleichszwecke als Alignment untereinander geschrieben (z. B. können für ein optimales Alignment mit dem anderen Polypeptid bzw. der anderen Nukleinsäure „Gaps“ in die Sequenz eines Polypeptids eingeführt werden). Die Aminosäurereste an entsprechenden Aminosäurepositionen werden dann miteinander verglichen. Wird eine Position in einer Sequenz von demselben Aminosäurerest wie die entsprechende Position in der anderen Sequenz eingenommen, dann sind die Moleküle an dieser Position identisch. Dieselbe Art von Vergleich kann zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angestellt werden.

[0084] Vorzugsweise sind die isolierten Aminosäurehomologe, -analoge und -orthologe der Polypeptide der vorliegenden Erfindung mindestens ungefähr 50–60%, vorzugsweise mindestens ungefähr 60–70% und stärker bevorzugt mindestens ungefähr 70–75%, 75–80%, 80–85%, 85–90% oder 90–95% und am stärksten bevorzugt mindestens ungefähr 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr zu einer gesamten in Tabelle 1 identifizierten Aminosäuresequenz identisch. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein isoliertes Nukleinsäurehomolog der Erfindung eine Nukleotidsequenz, die mindestens ungefähr 40–60%, vorzugsweise mindestens ungefähr 60–70%, stärker bevorzugt mindestens 70–75%, 75–80%, 80–85%, 85–90% oder 90–95% und noch stärker bevorzugt mindestens ungefähr 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder mehr zu einer in Tabelle 1 oder Tabelle 2 gezeigten Nukleotidsequenz identisch sind.

[0085] Für die Zwecke der Erfindung wird der Prozentsatz der Identität zwischen zwei Nukleinsäure- oder Polypeptidsequenzen unter Verwendung des Software-Pakets Vector NTI 9.0 (PC) (Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad, CA92008) bestimmt. Für die Bestimmung des Prozentsatzes der Identität von zwei Nukleinsäuren werden eine „gap opening penalty“ von 15 und eine „gap extension penalty“ von 6,66 verwendet. Für die Bestimmung des Prozentsatzes der Identität von zwei Polypeptiden werden eine „gap opening penalty“ von 10 und eine „gap extension penalty“ von 0,1 verwendet. Alle anderen Parameter werden in der Default-Einstellung vorgegeben. Für ein multiples Alignment (Clustal W algorithm) beträgt mit der blosum62-Matrix die „gap opening penalty“ 10 und die „gap extension penalty“ 0,05. Es ist klar, daß beim Vergleich einer DNA-Sequenz mit einer RNA-Sequenz zwecks Bestimmung der Sequenzidentität ein Thymidinnukleotid einem Uracilnukleotid entspricht.

[0086] Nukleinsäuremoleküle, die Homologen, Analogen und Orthologen der in Tabelle 1 angeführten Polypeptiden entsprechen, können aufgrund ihrer Identität zu diesen Polypeptiden isoliert werden, und zwar unter Verwendung der Polynukleotide, die für die entsprechenden Polypeptide kodieren, oder hierauf beruhenden Primern als Hybridisierungssonden gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen. Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Begriff „stringente Bedingungen“ im Bezug auf die Hybridisierung für DNA an einem DNA-Blot eine Hybridisierung über Nacht bei 60°C in 10X Denhart's-Lösung, 6X SSC, 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA. Die Blots werden der Reihe nach bei 62°C jeweils 30 Minuten mit 3X SSC/0,1% SDS und anschließend 1X SSC/0,1% SDS, und abschließend 0,1X SSC/0,1% SDS gewaschen. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet die Wendung „stringente Bedingungen“ ebenfalls im vorliegenden Zusammenhang eine Hybridisierung in einer 6X SSC-Lösung bei 65°C. In einer anderen Ausführungsform bezieht sich „hochstringente Bedingungen“ auf eine Hybridisierung über Nacht bei 65°C in 10X Denhart's-Lösung, 6X SSC, 0,5% SDS und 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA. Die Blots werden der Reihe nach bei 65°C jeweils 30 Minuten mit 3X SSC/0,1% SDS und anschließend 1X SSC/0,1% SDS und abschließend 0,1X SSC/0,1% SDS gewaschen. Verfahren für Nukleinsäurehybridisierungen sind bei Meinkoth und Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138: 267–284; beschrieben, gut fachbekannt (siehe zum Beispiel, Current Protocols in Molecular Biology, Kapitel 2, Ausubel et al., Hrsg., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995; und Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Teil I, Kapitel 2, Elsevier, New York,

1993). Vorzugsweise entspricht ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten oder hochstringenten Bedingungen mit einer in Tabelle 1 angeführten Nukleotidsequenz hybridisiert, einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül.

[0087] Es gibt verschiedene Verfahren, mit denen Bibliotheken von potentiellen Homologen aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz erzeugt werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem automatischen DNA-Synthesegerät erfolgen, und das synthetische Gen wird dann in einen entsprechenden Expressionsvektor ligiert. Mit einem degenerierten Satz Gene kann man in einer Mischung alle Sequenzen, die für den gewünschten Satz potentieller Sequenzen kodieren, bereitstellen. Verfahren für die Synthese von degenerierten Oligonukleotiden sind in der Fachwelt bekannt (siehe z. B. Narang, 1983, *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al., 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al., 1984, *Science* 198: 1056; Ike et al., 1983, *Nucleic Acid Res.* 11: 477).

[0088] Außerdem können optimierte Nukleinsäuren erzeugt werden. Vorzugsweise kodiert eine optimierte Nukleinsäure für ein Polypeptid mit einer Funktion, die derjenigen der in Tabelle 1 angeführten Polypeptide ähnlich ist, und/oder moduliert Wachstum und/oder Ertrag einer Pflanze unter normalen Bedingungen und/oder unter Wasserlimitierungsbedingungen und/oder moduliert die Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Umweltstreß, stärker bevorzugt erhöht sie Wachstum und/oder Ertrag einer Pflanze unter normalen Bedingungen und/oder unter Wasserlimitierungsbedingungen und/oder erhöht sie die Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Umweltstreß, wenn sie in der Pflanze überexprimiert wird. Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet „optimiert“ eine Nukleinsäure, die genetisch dahingehend verändert wurde, daß ihre Expression in einer bestimmten Pflanze oder einem bestimmten Tier erhöht wird. Zur Bereitstellung von für Pflanzen optimierten Nukleinsäuren kann die DNA-Sequenz des Gens dahingehend modifiziert werden, daß: 1) sie von stark exprimierten Pflanzengenen bevorzugte Codons umfaßt; 2) sie einen A + T-Gehalt der Nukleotidbasenzusammensetzung umfaßt, der im wesentlichen in Pflanzen angetroffen wird; 3) sie eine Pflanzeninitiationssequenz bildet; 4) Sequenzen, die Destabilisierung, unerwünschte Polyadenylierung, Abbau und Termination der RNA verursachen, oder die Sekundärstruktur-„Hairpins“ oder RNA-Spleißstellen bilden, eliminiert werden; oder 5) antisense-orientierte offene Leseraster eliminiert werden. Die erhöhte Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen kann dadurch erzielt werden, daß man die Verteilungshäufigkeit des Codon Usage bei Pflanzen im allgemeinen oder in einer bestimmten Pflanze verwendet. Verfahren für die Optimierung der Nukleinsäureexpression in Pflanzen finden sich in EPA 0359472; EPA 0385962; PCT-Anmeldung Nr. WO 91/16432; US-Patent Nr. 5,380,831; US-Patent Nr. 5,436,391; Perlack et al., 1991, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 88: 3324–3328; und Murray et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 477–498.

[0089] Ein erfindungsgemäßes isoliertes Polynukleotid kann dahingehend optimiert werden, daß seine Verteilungsfrequenz des Codon Usage vorzugsweise nicht mehr als 25% von demjenigen von stark exprimierten Pflanzengenen abweicht, stärker bevorzugt nicht mehr als ungefähr 10%. Zusätzlich wird der Prozentsatz des G + C-Gehalts der degenerierten dritten Base in Betracht gezogen (es scheint, daß monokotyle Pflanzen G + C in dieser Position bevorzugen, während dies bei dikotylen Pflanzen nicht der Fall ist). Es ist auch anerkannt, daß das XCG-Nukleotid (wobei X A, T, C oder G bedeutet) bei dikotylen Pflanzen das am wenigsten bevorzugte Codon ist, während das XTA-Codon sowohl bei monokotylen als auch bei dikotylen Pflanzen vermieden wird. Die optimierten erfindungsgemäßen Nukleinsäuren weisen weiterhin auch vorzugsweise CG- und TA-Dublett-Vermeidungsindizes auf, die denjenigen der gewählten Wirtspflanze stark entsprechen. Stärker bevorzugt weichen diese Indizes von denjenigen des Wirts um nicht mehr als ungefähr 10–15% ab.

[0090] Die Erfindung stellt weiterhin einen isolierten Rekombinationsvektor bereit, der ein wie oben beschriebenes Polynukleotid umfaßt, wobei die Expression des Vektors in einer Wirtszelle in der Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Wirtszelle bei dieser Pflanze zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß führt. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich für die Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen beinhalten, die aufgrund der für die Expression verwendeten Wirtszellen ausgewählt und operativ mit der zu exprimierenden Nukleinsäure verknüpft ist/sind. Im vorliegenden Zusammenhang soll im Bezug auf einen rekombinanten Expressionsvektor „operativ verknüpft“ bedeuten, daß die interessierende Nukleotidsequenz mit der Regulationssequenz bzw. den Regulationssequenzen so verknüpft ist, daß eine Expression der Nukleotidsequenz ermöglicht wird (z. B. in einer bakteriellen oder pflanzlichen Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingeführt wird). Der Begriff „Regulationssequenz“ soll Promoter, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z. B. Polyadenylierungssignale) beinhalten. Solche Regulationssequenzen sind in der Fachwelt gut bekannt. Regulationssequenzen beinhalten solche, die die konstitutive Expression einer Nu-

kleotidsequenz in vielen Arten von Wirtszellen dirigieren, und solche, die die Expression der Nukleotidsequenz nur in gewissen Wirtszellen oder unter gewissen Umständen dirigieren. Dem Fachmann wird klar sein, daß das Design des Expressionsvektors von Faktoren wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem gewünschten Expressionsniveau des Polypeptids usw. abhängen kann. Die Expressionsvektoren der Erfindung können in Wirtszellen eingeführt werden, um so von im vorliegenden Text beschriebenen Nukleinsäuren kodierte Polypeptide zu erzeugen.

[0091] Die pflanzliche Genexpression sollte mit einem entsprechenden Promoter, der die Genexpression auf zeitspezifische, zellspezifische oder gewebespezifische Weise vermittelt, operativ verknüpft sein. Zu den Promotern, die sich bei den erfindungsgemäßen Expressionskassetten eignen, zählt jeder Promoter, der fähig ist, die Transkription in einer Pflanzenzelle zu initiieren. Solche Promoter beinhalten diejenigen, die von Pflanzen, Pflanzenviren und Bakterien, welche Gene enthalten, die in Pflanzen exprimiert werden, erhältlich sind, wie *Agrobacterium* und *Rhizobium*, sind jedoch nicht hierauf beschränkt.

[0092] Der Promoter kann konstitutiv, induzierbar, entwicklungsstadiumspräferentiell, zelltyppräferentiell, gewebepräferentiell oder organpräferentiell sein. Konstitutive Promoter sind unter den meisten Bedingungen aktiv. Zu Beispielen von konstitutiven Promotern zählen der CaMV 19S- und der CaMV-35S-Promoter (Odell et al., 1985, *Nature* 313: 810–812), der sX CaMV 35S-Promoter (Kay et al., 1987, *Science* 236: 1299–1302), der Sep1-Promoter, der Reis-Actin-Promoter (McElroy et al., 1990, *Plant Cell* 2: 163–171), der Arabidopsis-Actin-Promoter, der Ubiquitin-Promoter (Christensen et al., 1989, *Plant Molec. Biol.* 18: 675–689), pEmu (Last et al., 1991, *Theor. Appl. Genet.* 81: 581–588), der Figwort Mosaic Virus 35S-Promoter, der Smas-Promoter (Velten et al., 1984, *EMBO J.* 3: 2723–2730), der „super“-Promoter (US-Patent Nr. 15, 955,646), der GRP1-8-Promoter, der Promoter der Cinnamylalkoholdehydrogenase (US-Patent Nr. 5,683,439), Promoter aus der T-DNA von *Agrobacterium*, wie der Mannopinsynthase, der Nopalinsynthase und der Octopinsynthase, der Promoter der kleinen Ribulosebisphosphatcarboxylase-Untereinheit (ssuRUBISCO) und dergleichen.

[0093] Induzierbare Promoter sind vorzugsweise unter gewissen Umweltbedingungen aktiv, wie bei Vorhandensein oder Fehlen eines Nährstoffs oder eines Stoffwechselprodukts, Hitze oder Kälte, Licht, Angriff durch Pathogene, anaerobe Bedingungen und dergleichen. So wird zum Beispiel der hsp80-Promoter aus *Brassica* durch Hitzeschock induziert; der PPK-Promoter wird durch Licht induziert; die PR1-Promoter aus Tabak, Arabidopsis und Mais sind durch Infektion mit einem Pathogen induzierbar; und der Adh1-Promoter wird durch Sauerstoffmangelbedingungen und Kältestreß induziert. Die Expression von Pflanzengenen kann auch durch einen induzierbaren Promoter vermittelt werden (für einen Übersichtsartikel siehe Gatz, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 89–108). Chemisch induzierbare Promoter eignen sich besonders dann, wenn man wünscht, daß die Genexpression auf zeitspezifische Art und Weise erfolgt. Beispiele für solche Promoter sind ein salicylsäureinduzierbarer Promoter (PCT-Anmeldung Nr. WO 95/19443), ein tetracyclininduzierbarer Promoter (Gatz et al., 1992, *Plant J.* 2: 397–404) und ein ethanolinduzierbarer Promoter (PCT-Anmeldung Nr. WO 93/21334).

[0094] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der induzierbare Promoter ein streßinduzierbarer Promoter. Für den Zweck der Erfindung sind streßinduzierbare Promoter vorzugsweise bei einem oder mehreren der folgenden Stresse aktiv: suboptimale Bedingungen, die mit Salzstreß, Trockenheitsstreß, Stickstoffstreß, Temperaturstreß, Metallstreß, chemischem Streß, pathogen bedingtem Streß und oxidativem Streß. Zu den streßinduzierbaren Promotern zählen die folgenden, was jedoch keine Einschränkung darstellt: Cor78 (Chak et al., 2000, *Planta* 210: 875–883; Hovath et al., 1993, *Plant Physiol.* 103: 1047–1053), Cor15a (Anus et al., 1996, *PNAS* 93(23): 13404–09), Rci2A (Medina et al., 2001, *Plant Physiol.* 125: 1655–66; Nylander et al., 2001, *Plant Mol. Biol.* 45: 341–52; Navarre und Goffeau, 2000, *EMBO J.* 19: 2515–24; Capel et al., 1997, *Plant Physiol.* 115: 569–76), Rd22 (Xiong et al., 2001, *Plant Cell* 13: 2063–83; Abe et al., 1997, *Plant Cell* 9: 1859–68; Iwasaki et al., 1995, *Mol. Gen. Genet.* 247: 391–8), cDet6 (Lang und Palve, 1992, *Plant Mol. Biol.* 20: 951–62), ADH1 (Hoeren et al., 1998, *Genetics* 149: 479–90), KATZ (Nakamura et al., 1995, *Plant Physiol.* 109: 371–4), KST1 (Müller-Röber et al., 1995, *EMBO J.* 14: 2409–16), Rha1 (Terry et al., 1993, *Plant Cell* 5: 1761–9; Terry et al., 1992, *FEBS Lett.* 299(3): 287–90), ARSK1 (Atkinson et al., 1997, GenBank-Zugangsnummer 122302 und PCT-Anmeldung Nr. WO 97/20057), PtxA (Plesch et al., GenBank-Zugangsnummer X67427), SbHRGP3 (Ahn et al., 1996, *Plant Cell* 8: 1477–90), GH3 (Liu et al., 1994, *Plant Cell* 6: 645–57), der pathogeninduzierbare PRP1-Gen-Promoter (Ward et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 361–366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promoter aus der Tomate (US-Patent Nr. 5187267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase-Promoter aus der Kartoffel (PCT-Anmeldung Nr. WO 96/12814) oder der wundinduzierbare pinII-Promoter (Europäisches Patent Nr. 375091). Für weitere Beispiele für trockenheits-, kälte- und salzinduzierbare Promoter, wie dem RD29A-Promoter, siehe Yamaguchi-Shinozaki et al., 1993, *Mol. Gen. Genet.* 236: 331–340.

[0095] Entwicklungsstadium-bevorzugte Promoter werden präferentiell zu gewissen Entwicklungsstadien exprimiert. Zu gewebe- und organbevorzugten Promotern zählen diejenigen, die präferentiell in gewissen Geweben oder Organen, wie Blättern, Wurzeln, Samen oder Xylem exprimiert werden. Zu Beispielen für gewebebevorzugte und organbevorzugte Promoter zählen, jedoch nicht einschränkend, fruchtbevorzugte, ovulabevorzugte, in männlichem Gewebe bevorzugte, samenbevorzugte, integumentbevorzugte, knollenbevorzugte, stengelbevorzugte, pericarpbevorzugte, blattbevorzugte, stigmabevorzugte, pollenbevorzugte, antherenbevorzugte, petalenbevorzugte, sepalenbevorzugte, pedicellumbevorzugte, siliquabevorzugte, stammbevorzugte, wurzelbevorzugte Promoter und dergleichen. Samenbevorzugte Promoter werden präferentiell während der Samenentwicklung und/oder -keimung exprimiert. So können samenbevorzugte Promoter zum Beispiel embryobevorzugt, endospermbevorzugt und samenhüllenbevorzugt sein (siehe Thompson et al., 1989, Bio-Essays 10: 108). Zu Beispielen für samenbevorzugte Promoter zählen, jedoch ohne Einschränkung, Cellulosesynthase (celA), Cim1, gamma-Zein, Globulin-1, Mais-19kD-zein (cZ19B1) und dergleichen.

[0096] Zu weiteren geeigneten gewebebevorzugten oder organbevorzugten Promotern zählen der Napin-Gen-Promoter aus Raps (US-Patent Nr. 5,608,152), Der USP-Promoter aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225(3): 459–67), der Oleosin-Promoter aus *Arabidopsis* (PCT-Anmeldung Nr. WO 98/45461), der Phaseolin-Promoter aus *Phaseolus vulgaris* (US-Patent Nr. 5,504,200), der Bce4-Promoter aus *Brassica* (PCT-Anmeldung Nr. WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promoter (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2): 233–9) sowie Promoter, die eine samenspezifische Expression in monokotylen Pflanzen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. vermitteln. Erwähnenswerte geeignete Promoter sind der Ipt2- oder der Ipt1-Gen-Promoter aus der Gerste (PCT-Anmeldung Nr. WO 95/15389 und PCT-Anmeldung Nr. WO 95/23230), oder diejenigen, die in der PCT-Anmeldung Nr. WO 99/16890 beschrieben sind (Promoter des Gerste-Hordein-Gens, des Reis-Glutelin-Gens, des Reis-Oryzin-Gens, des Reis-Prolamin-Gens, des Weizen-Gliadin-Gens, des Weizen-Glutelin-Gens, des Hafer-Glutelin-Gens, des Sorghum-Kasirin-Gens und des Roggen-Secalin-Gens).

[0097] Zu weiteren Promotern, die bei den erfindungsgemäßen Expressionskassetten nützlich sind, zählen, jedoch ohne Einschränkung, der Promoter des „major chlorophyll a/b binding“-Proteins, Histon-Promoter, der Ap3-Promoter, der β -Conglycin-Promoter, der Napin-Promoter, der Sojabohnen-Lectin-Promoter, der Mais-15kD-Zein-Promoter, der 22kD-Zein-Promoter, der 27kD-Zein-Promoter, der g-Zein-Promoter, die „waxy“-, „shrunkn 1“-, „shrunkn 2“-, und „bronze“-Promoter, der Zm13-Promoter (US-Patent Nr. 5,086,169), die Mais-Polygalacturonase-Promoter (PG) (US-Patent Nr. 5,412,085 und 5,545,546) und der SGB6-Promoter (US-Patent Nr. 5,470,359) sowie synthetische und sonstige natürliche Promoter.

[0098] Eine zusätzliche Flexibilität bei der Kontrolle der heterologen Genexpression in Pflanzen kann dadurch erzielt werden, daß man DNA-Bindungsdomänen und -Response-Elemente aus heterologen Quellen verwendet (d. h. DNA-Bindungsdomänen aus nichtpflanzlichem Ursprungsmaterial). Ein Beispiel für solch eine heterologe DNA-Bindungsdomäne ist die LexA-DNA-Bindungsdomäne (Brent und Ptashne, 1985, Cell 43: 729–736).

[0099] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die in Tabelle 1 angeführten Polynukleotide in Pflanzenzellen von höheren Pflanzen (z. B. den Spermatophyten, wie Kulturpflanzen) exprimiert. Ein Polynukleotid kann auf unterschiedliche Art und Weise in eine Pflanze „eingeführt“ werden, darunter Transfektion, Transformation oder Transduktion, Elektroporation, Beschuss mit der Genkanone, Agroinfektion und dergleichen. Geeignete Verfahren für die Transformation oder Transfektion von Pflanzenzellen sind zum Beispiel unter der Verwendung der Genkanone gemäß US-Patent Nr. 4,945,050; 5,036,006; 5,100,792; 5,302,523; 5,464,765; 5,120,657; 6,084,154 und dergleichen beschrieben. Stärker bevorzugt kann der erfindungsgemäße transgene Maissamen unter Verwendung der Agrobacterium-Transformation wie in US-Pat. Nr. 5,591,616; 5,731,179; 5,981,840; 5,990,387; 6,162,965; 6,420,630, der US-Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer 2002/0104132 und dergleichen beschrieben erzeugt werden. Die Transformation von Soja kann zum Beispiel unter Verwendung einer Technik durchgeführt werden, die in dem europäischen Patent Nr. EP 0424047, dem US-Patent Nr. 5,322,783, dem europäischen Patent Nr. EP 0397 687, dem US-Patent Nr. 5,376,543 oder dem US-Patent Nr. 5,169,770 beschrieben wird. Ein spezifisches Beispiel für die Weizenransformation findet sich in der PCT-Anmeldung Nr. WO 93/07256. Baumwolle kann unter Verwendung der in den US-Patenten Nr. 5,004,863; 5,159,135; 5,846,797 und dergleichen beschriebenen Verfahren transformiert werden. Reis kann unter Verwendung der in den US-Patenten Nr. 4,666,844; 5,350,688; 6,153,813; 6,333,449; 6,288,312; 6,365,807; 6,329,571 und dergleichen beschriebenen Verfahren transformiert werden. Andere Verfahren für die Transformation von Pflanzen werden zum Beispiel in den US-Patenten Nr. 5,932,782; 6,153,811; 6,140,553; 5,969,213; 6,020,539 und dergleichen beschrieben. Für die Insertion eines Transgens in eine bestimmte Pflanze kann erfindungsgemäß jegliches geeignetes Verfahren für die Transformation von Pflanzen

verwendet werden.

[0100] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das eingeführte Polynukleotid in der Pflanzenzelle stabil aufrechterhalten werden, wenn es in ein nichtchromosomales autonomes Replikon eingebaut wird oder wenn es in die pflanzlichen Chromosomen integriert wird. Alternativ dazu kann das eingeführte Polynukleotid auf einem extrachromosomalen nichtreplizierenden Vektor vorliegen und kann transient exprimiert werden oder transient aktiv sein.

[0101] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes Polypeptid mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in Tabelle 1 angeführten Polypeptidsequenzen. Ein „isoliertes“ oder „aufgereinigtes“ Polypeptid ist, wenn es mit DNA-Rekombinationstechniken hergestellt wird, frei von einem Teil des Zellmaterials bzw., wenn es chemisch synthetisiert wird, frei von chemischen Vorstufen oder sonstigen Chemikalien. Die Bezeichnung „im wesentlichen frei von Zellmaterial“ beinhaltet Präparate eines Polypeptids, in denen das Polypeptid von einigen der Zellkomponenten der Zelle, in der es natürlich oder rekombinant hergestellt wird, getrennt vorliegt. In einer Ausführungsform beinhaltet der Begriff „im wesentlichen frei von Zellmaterial“ Präparate eines erfindungsgemäßen Polypeptids mit weniger als ungefähr 30% (in Bezug auf das Trockengewicht) kontaminierende Polypeptide, stärker bevorzugt weniger als ungefähr 20% kontaminierende Polypeptide, noch stärker bevorzugt weniger als ungefähr 10% kontaminierende Polypeptide und am stärksten bevorzugt weniger als ungefähr 5% kontaminierende Polypeptide.

[0102] Die Bestimmung der Aktivitäten und der kinetischen Parameter von Enzymen ist in der Fachwelt gut bekannt. Versuche zur Bestimmung der Aktivität eines beliebigen veränderten Enzyms müssen bei der spezifischen Aktivität des Wildtyp-Enzyms angepaßt werden, was für den Fachmann kein Problem darstellt. Übersichtsliteratur über Enzyme im allgemeinen sowie spezifische Details in Bezug auf ihre Struktur, Kinetik, Prinzipien, Methoden, Anwendungen und Beispiele für die Bestimmung von vielen Enzymaktivitäten sind ausreichend vorhanden und dem Fachmann gut bekannt.

[0103] Eine Ausführungsform der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze umfassend mindestens ein in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführtes Polynukleotid, wobei die Expression des Polynukleotids in der Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze bei dieser Pflanze zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß führt, umfassend die folgenden Schritte:

- (a) Einführen eines Expressionsvektors umfassend mindestens ein Polynukleotid nach einem der Ansprüche 1 oder 2 in eine Pflanzenzelle, und
- (b) Erzeugen einer transgenen Pflanze, die das Polynukleotid exprimiert, aus der Pflanzenzelle, wobei die Expression des Polynukleotids in der transgenen Pflanze zu einem im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze bei dieser Pflanze zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß führt. Bei der Pflanzenzelle kann es sich um einen Protoplasten, eine gametenproduzierende Zelle bzw. eine Zelle, die sich zu einer ganzen Pflanze regeneriert, handeln, was jedoch keine Einschränkung darstellen soll. Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „transgen“ auf eine beliebige Pflanze, eine beliebige Pflanzenzelle, einen beliebigen Kallus, ein beliebiges Pflanzengewebe oder einen beliebigen Pflanzenteil, der/die/das mindestens ein in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführtes rekombinantes Polynukleotid enthält. In vielen Fällen ist das rekombinante Polynukleotid stabil in ein Chromosom oder ein stabiles extrachromosomales Element eingebaut, so daß es an Folgegenerationen vererbt wird.

[0104] Die vorliegende Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Erhöhung des Wachstums und/oder des Ertrags einer Pflanze unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zum Erhöhen der Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Umweltstreß, umfassend die Schritte des Erhöehens der Expression von mindestens einem in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführtes Polynukleotid in der Pflanze bereit. Die Expression eines in Tabelle 1 oder Tabelle 2 angeführten Polynukleotids kann nach einem beliebigen Verfahren, das dem Fachmann bekannt ist, erhöht werden.

[0105] Die Auswirkung der genetischen Modifikation auf das Wachstum und/oder den Ertrag und/oder die Streßtoleranz der Pflanze kann dadurch beurteilt werden, daß man die modifizierte Pflanze unter normalen und/oder suboptimalen Bedingungen heranzieht und dann die Wachstumseigenschaften und/oder den Stoffwechsel der Pflanze analysiert. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann gut bekannt; dazu zählen Trockengewicht, Feuchtgewicht, Polypeptidsynthese, Kohlenhydratsynthese, Lipidsynthese, Evapotranspirationsraten, allgemeiner Pflanzen- und/oder Kulturpflanzenertrag, Blüte, Reproduktion, Samenansatz, Wurzel-

wachstum, Respirationsraten, Photosyntheseraten, Stoffwechselproduktzusammensetzung usw., und zwar unter Verwendung von Verfahren, mit denen der Biotechnologiefachmann vertraut ist.

[0106] Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Beispiele erläutert, die jedoch nicht als den Erfindungsumfang einschränkend anzusehen sind.

BEISPIEL 1 – Identifikation von offenen Leserastern aus *P. patens*

[0107] cDNA-Bibliotheken, die aus Pflanzen der Art *P. patens* (Hedw.) B. S. G. aus der Sammlung der Genetikabteilung der Universität Hamburg erzeugt wurden, wurden nach Standardmethoden sequenziert. Die Pflanzen stammten von dem von H. L. K. Whitehouse in Gransden Wood, Huntingdonshire (England) gesammelten Stamm 16/14, der von einer Spore von Engel (1968, *Am. J. Bot.* 55: 438–446) subkultiviert worden war.

[0108] Die Sequenzen wurden mit dem Software-Paket EST-MAX, das im Handel von Bio-Max (München, Deutschland) verfügbar ist, verarbeitet und annotiert. Das Programm verwendet praktisch alle für die Funktions- und Strukturcharakterisierung von Proteinsequenzen wichtige Methoden der Bioinformatik. Einzelheiten finden sich auf der Website bei pedant.mips.biochem.mpg.de. Bei den wichtigsten Algorithmen, die bei EST-MAX verwendet werden, handelt es sich um: FASTA (sehr empfindliche Sequenzdatenbanksuchen mit statistisch signifikanten Schätzern; Pearson, 1990, *Methods Enzymol.* 183: 63–98); BLAST (sehr empfindliche Sequenzdatenbanksuchen mit statistisch signifikanten Schätzern; Altschul et al., 1990, *Journal of Molecular Biology* 215: 403–10); PREDATOR (hochpräzise Vorhersage der Sekundärstruktur aufgrund von einzelnen und multiplen Sequenzen; Frishman und Argos, 1997, *Proteins* 27: 329–335); CLUSTALW (multiples Sequenz-Alignment; Thompson et al., 1994, *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680); TMAP (Vorhersage der Transmembranregionen aufgrund von Sequenzen in multiplen Alignment; Persson und Argos, 1994, *J. Mol. Biol.* 237: 182–192); ALOM2 (Vorhersage der Transmembranregionen aufgrund von Einzelsequenzen; Klein et al., 1984, *Biochim. Biophys. Acta* 787: 221–226. Version 2 von Dr. K. Nakai); PROSEARCH (Nachweis von PROSITE-Proteinsequenzmustern; Kolakowski et al., 1992, *Biotechniques* 13, 919–921); BLIMPS (Ähnlichkeitssuchen im Vergleich zu einer Datei von Blöcken ohne Gaps, Wallace und Henikoff, 1992, *Comput. Appl. Biosci.* 8(3): 249–54); PATMAT (Such- und Filterprogramm für Sequenz-, Muster- und Blockabfragen und -dateien, CABIOS 8: 249–254. Geschrieben von Bill Alford).

[0109] Partial-cDNAs (ESTs) von *P. patens* wurden unter Verwendung des EST-MAX-Programms mittels BLAST-Analyse in dem *P. patens*-EST-Sequenzierprogramm identifiziert. Die Vollängen-Nukleotid-cDNA-Sequenzen wurden unter Verwendung von bekannten Verfahren bestimmt. Identität und Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen der beschriebenen Polypeptidsequenzen zu bekannten Proteinsequenzen sind in den Tabellen 2–19 dargestellt (es wurde der „paarweise Vergleich“ verwendet: „gap penalty“: 10; „gap extension penalty“: 0,1; „score matrix“: blosum 62).

Tabelle 3

Vergleich von PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2) mit bekannten RNA 2'-Phosphotransferasen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
XP_550615	<i>O. sativa</i>	45,4	56,2
NP_197750	<i>A. thaliana</i>	34,1	43,0
NP_182058	<i>A. thaliana</i>	39,6	48,9
NP_594515	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21,3	29,1
NP_788477	<i>Drosophila melanogaster</i>	25,5	34,7

Tabelle 4

Vergleich von PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4) mit dem bekannten Zellteilungskontrollprotein 2

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
S42049	<i>Picea abies</i>	92,9	96,3
Q40790	<i>Pinus contorta</i>	92,5	96,3
CDC2_CHERU	<i>Chenopodium rubrum</i>	91,5	95,9
Q9AUH4	<i>Populus tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>	90,5	95,9
Q8W2D3	<i>Helianthus annuus</i>	89,5	95,2

Tabelle 5

Vergleich von PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6) mit bekannten Familien von Proteinen mit leucinreichen Repeats

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
NP_912570	<i>O. sativa</i>	27,6	42,1
NP_921136	<i>O. sativa</i>	27,2	40,3
AAF71805	<i>A. thaliana</i>	24,4	33,6
NP_177947	<i>A. thaliana</i>	28,1	38,5
G96811	<i>A. thaliana</i>	28,8	40,3

Tabelle 6

Vergleich von PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8) mit dem bekannten Ran-Bindungsprotein 1

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q94K24	<i>Lycopersicon esculentum</i>	50,7	63,3
Q9LUZ8	<i>A. thaliana</i>	39,4	51,9
NP_200667	<i>A. thaliana</i>	44,3	58,3
O04149	<i>A. thaliana</i>	44,1	55,1
NP_172194	<i>A thaliana</i>	44,4	55,1

Tabelle 7

Vergleich von PpPD-1 (SEQ ID NO: 10) mit bekannten Plastidenteilungs-ftsZ-Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q70ZZ6	<i>P. patens</i>	100	100
Q75ZR3	<i>Nannochloris bacillaris</i>	42,6	53,0
ZP_00177632	<i>Crocospaera watsonii</i>	41,3	51,8
NP_440816	<i>Synechocystis</i> sp.	41,0	52,1
T51092	<i>Synechocystis</i> sp.	40,0	51,5

Tabelle 8

Vergleich von PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12) mit bekannten Mitochondriensubstrat-Trägerproteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
NP_194188	<i>A. thaliana</i>	56,6	70,0
T05577	<i>A. thaliana</i>	56,7	69,8
Q66PX4	<i>Saccharum officinarum</i>	55,4	69,9
NP_179836	<i>A. thaliana</i>	54,3	71,4
D84613	<i>A. thaliana</i>	54,5	71,2

Tabelle 9

Vergleich von PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14) mit bekannten MADS-Box-Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q8LPA5	<i>P. patens</i>	63,0	63,0
Q6QAF0	<i>P. patens</i>	62,6	62,6
Q9FE71	<i>P. patens</i>	53,4	55,8
Q9FE89	<i>P. patens</i>	49,1	53,7
Q8LLC8	<i>Lycopodium annotinum</i>	46,1	59,5

Tabelle 10:

Vergleich von PpAK-1 (SEQ ID NO: 16) mit bekannten Adenosinkinase-Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
ADK_PHYPA	<i>P. patens</i>	100	100
NP_195950	<i>A. thaliana</i>	66,3	77,8
XP_466836	<i>O. sativa</i>	68,2	77,6
Q84P58	<i>O. sativa</i>	62,9	71,5
NP_187593	<i>A. thaliana</i>	64,7	76,6

Tabelle 11

Vergleich von PpZF-6 (SEQ ID NO: 18) mit bekannten Zinkfingerproteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
NP_180709	<i>A. thaliana</i>	61,1	71,0
XP_472997	<i>O. sativa</i>	63,4	72,1
NP_176722	<i>A. thaliana</i>	61,8	72,4
T02366	<i>A. thaliana</i>	54,7	64,1
NP_172080	<i>A. thaliana</i>	58,9	69,0

Tabelle 12

Vergleich von PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20) mit bekannten regulatorischen Untereinheiten der cyclinabhängigen Kinase

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q6JJ57	<i>Ipomoea trifida</i>	76,9	83,5
Q6T300	<i>G. max</i>	79,1	82,4
NP_180364	<i>A. thaliana</i>	74,7	82,4
XP_470214	<i>O. sativa</i>	80,2	84,6
Q8GZU5	<i>Populus tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>	75,8	80,2

Tabelle 13

Vergleich von PpZF-7 (SEQ ID NO: 22) mit bekannten RING-Zinkfingerproteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q6F3A0	<i>O. sativa</i>	34,7	47,3
Q852N7	<i>O. sativa</i>	35,5	48,5
Q7XJ65	<i>O. sativa</i>	33,1	45,9
NP_851050	<i>A. thaliana</i>	35,3	46,2
NP_851051	<i>A. thaliana</i>	35,3	46,2

Tabelle 14

Vergleich von PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24) mit dem bekannten MAR-bindenden filamentartigen Protein 1

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
MFP1_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i>	18,0	30,5
NP_914440	<i>O. sativa</i>	16,8	30,1
MFP1_ARATH	<i>A. thaliana</i>	19,2	30,3
NP_188221	<i>A. thaliana</i>	20,1	31,1
T07111	<i>Lycopersicon esculentum</i>	19,6	31,6

Tabelle 15

Vergleich von PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26) mit bekannten rezeptorartigen Proteinkinasen mit leucinreichen Repeats

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q9XGG1	<i>Sorghum bicolor</i>	9,3	16,1
NP_189183	<i>A. thaliana</i>	9,2	14,6
Q708X5	<i>Cicer arietinum</i>	18,0	28,6
XP_474976	<i>O. sativa</i>	5,9	10,3
Q9LSU7	<i>A. thaliana</i>	9,2	14,0

Tabelle 16

Vergleich von PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28) mit bekannten Lichtsensor-Proteinkinasen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
S27396	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,7	11,4
P93098	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,8	11,5
PHY1_CERPU	<i>Ceratodon purpureus</i>	5,7	11,4
NP_564829	<i>A. thaliana</i>	19,0	32,1
H96666	<i>A. thaliana</i>	19,5	31,6

Tabelle 17

Vergleich von PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30) mit mit Synaptobrevin verwandten Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
NP_180871	<i>A. thaliana</i>	73,0	84,2
Q7X9C5	<i>Pyrus pyrifolia</i>	64,9	75,2
NP_180826	<i>A. thaliana</i>	55,4	63,8
Q681H0	<i>A. thaliana</i>	71,2	83,8

Tabelle 18

Vergleich von PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32) mit bekannten Calcineurin-B-Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
XP_313573	<i>Anopheles gambiae</i>	19,1	36,7
NP_505885	<i>Caenorhabditis elegans</i>	16,6	34,8
Q95P81	<i>Bombyx mori</i>	18,7	36,4
NP_524874	<i>D. melanogaster</i>	17,1	35,3

Tabelle 19

Vergleich von PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34) mit bekannten mit Caleosin verwandten Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q9SQ57	Sesamum indicum	64,9	78,4
T07092	G. max	67,5	74,6
NP_194404	A. thaliana	61,2	74,7
NP_200335	A. thaliana	62,1	72,8
XP_473140	O. sativa	60,2	73,0

Tabelle 20

Vergleich von PpHD-1 (SEQ ID NO: 36) mit bekannten Histondeacetylase-Proteinen

Öffentliche Datenbank-Zugangsnr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
Q8W508	Zea mays	81,9	88,6
NP_190054	A. thaliana	78,7	88,2
T47443	A. thaliana	76,1	85,8
Q6JJ24	Ipomoea trifida	68,2	75,6
Q7XLX3	Oryza sativa	70,1	77,5

BEISPIEL 2 – Klonierung von Vollängen-cDNAs aus anderen Pflanzen

[0110] Canola-, Sojabohnen-, Reis-, Mais-, Lein- und Weizenpflanzen wurden unter verschiedenen Bedingungen und Behandlungen herangezogen, und unterschiedliche Gewebe wurden zu verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet. Die Pflanzenanzucht und -ernte erfolgten auf strategische Art und Weise, so daß die Wahrscheinlichkeit, alle exprimierbaren Gene in mindestens einer oder mehreren der entstandenen Bibliotheken zu ernten, maximiert wird. Von jeder gezogenen Probe wurde die mRNA isoliert, und es wurden cDNA-Bibliotheken konstruiert. Beim Vorgang der Bibliotheksherstellung wurden keine Amplifikationsschritte verwendet, um die Redundanz von Genen innerhalb der Probe zu minimieren und um die Expressionsinformation beizubehalten. Alle Bibliotheken wurden aus mRNA die an oligo-dT-Säulen aufgereinigt worden war, vom 3'-Ende her erzeugt. Kolonien aus der Transformation der cDNA-Bibliothek in *E. coli* wurden zufallsmäßig herausgepickt und in Mikrotiterplatten gegeben.

[0111] Plasmid-DNA wurde aus den *E. coli*-Kolonien isoliert und dann auf Membranen in Form von Flecken aufgetragen. An diesen Membranen wurden der Reihe nach 288 mit ³³P radioaktiv markierte 7-mer-Oligonukleotide hybridisiert. Um den Durchsatz zu erhöhen, wurden die Membranen in zweifacher Wiederholung verarbeitet. Nach jeder Hybridisierung wurde während eines Phosphoimaging-Scanning ein Blot-Image aufgenommen, um für jedes Oligonukleotid ein Hybridisierungsprofil zu erzeugen. Dieses Rohdaten-Image wurde automatisch einem Computer eingegeben. Durch Versehen der Image-Kassette, des Filters und der Orientierung innerhalb der Kassette mit einem Strichcode wurde absolute Identität aufrechterhalten. Die Filter wurden dann unter relativ milden Bedingungen behandelt, um die gebundenen Sonden abzulösen, und für eine weitere Hybridisierungsrunde in die Hybridisierungskammern zurückgegeben. Der Hybridisierungs- und Imaging-Zyklus wurde solange wiederholt, bis der Satz der 288 Oligomere vollständig war.

[0112] Nachdem die Hybridisierungen vollständig waren, wurde für jeden Fleck (die jeweils ein cDNA-Insert darstellen) ein Profil erzeugt, das angab, welches der 288 mit ³³P radioaktiv markierten 7-mer-Oligonukleotide an diesem bestimmten Fleck (cDNA-Insert) band bzw. in welchem Ausmaß dies der Fall war. Dieses Profil wird als Signatur, die von diesem Klon erzeugt wird, definiert. Die Signatur jedes Klons wurde mit allen anderen Signaturen, die von demselben Organismus erzeugt worden waren, verglichen, um Cluster von verwandten Signaturen zu identifizieren. Diese Vorgehensweise „sortiert“ alle Klone eines Organismus vor dem Sequenzie-

ren in Cluster.

[0113] Die Klone wurden aufgrund ihrer identischen oder ähnlichen Hybridisierungssignaturen in verschiedene Cluster sortiert. Ein Cluster sollte die Expression eines einzelnen Gens bzw. einer Genfamilie angeben. Ein Nebenprodukt diese Analyse ist ein Expressionsprofil für die Abundanz jedes Gens in einer bestimmten Bibliothek. Für die Vorhersage der Funktion der einzelnen Klone durch Ähnlichkeits- und Motivsuchen in Sequenzdatenbanken sequenzierte man in eine Richtung vom 5'-Ende her.

[0114] Mit der Vollängen-DNA-Sequenz des *P. patens*-PpHD-1 (SEQ ID NO: 35) wurde eine Blast-Suche im Vergleich zu handelsmäßig verfügbaren Datenbanken von cDNAs aus Canolaraps, Sojabohne, Reis, Mais, Lein und Weizen durchgeführt, und zwar mit einem E-Wert von e^{-10} (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402). Alle Contig-Hits wurden auf mutmaßliche Vollängen-Sequenzen analysiert, und die längsten Klone, die die mutmaßlichen Vollängen-Contigs darstellten, wurden vollständig sequenziert. Es wurden zwei Homologe aus Canolaraps (BnHD-1, SEQ ID NO: 38 und BnHD-2, SEQ ID NO: 40), ein Homolog aus Mais (ZmHD-1, SEQ ID NO: 42), ein Homolog aus Lein (LuHD-1, SEQ ID NO: 44), eine Sequenz aus Reis (OsHD-1, SEQ ID NO: 46), drei Sequenzen aus Sojabohne (GmHD-1, SEQ ID NO: 48, GmHD-2, SEQ ID NO: 50 und GmHD-3, SEQ ID NO: 52) und eine Sequenz aus Weizen (TaHD-1, SEQ ID NO: 54) identifiziert. Das Ausmaß der Aminosäureidentität und -ähnlichkeit dieser Sequenzen zu der nächsten bekannten öffentlichen Sequenz ist in Tabelle 21 angegeben (es wurde der „paarweise Vergleich“ verwendet: „gap penalty“: 10; „gap extension penalty“: 0,1; „score matrix“: blosum62).

Tabelle 21

Ausmaß der Aminosäureidentität und -ähnlichkeit von Histondeacetylasen

Genbezeichnung (SEQ ID NO)	Öffentliche Datenbank Zugangs-Nr.	Art	Sequenzidentität (%)	Sequenzähnlichkeit (%)
BnHD-1 (SEQ ID NO: 38)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	96%	98,1%
BnHD-2 (SEQ ID NO: 40)	NP_201116	<i>A. thaliana</i>	92,6%	95,3%
ZmHD-1 (SEQ ID NO: 42)	NP_563817	<i>A. thaliana</i>	66,4%	77,2%
LuHD-1 (SEQ ID NO: 44)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	87,4%	94,4%
OsHD-1 (SEQ ID NO: 46)	Q7Y0Y8	<i>O. sativa</i>	100%	100%
GmHD-1 (SEQ ID NO: 48)	NP_563817	<i>A. thaliana</i>	63,1%	74%
GmHD-2 (SEQ ID NO: 50)	NP_190054	<i>A. thaliana</i>	85,6%	92,1%
GmHD-2 (SEQ ID NO: 52)	NP_567921	<i>A. thaliana</i>	67,2%	77,4%
TaHD-1 (SEQ ID NO: 54)	Q7Y0Y8	<i>O. sativa</i>	89,4%	93,8%

BEISPIEL 3 – Streßtolerante Arabidopsis-Pflanzen

[0115] Ein Fragment, das das *P. Paten*-Polynukleotid enthielt, wurde in einen binären Vektor, der ein selektierbares Markergen enthielt, ligiert. Der entstandene rekombinante Vektor enthielt das entsprechende in Tabelle 1 angeführte Polynukleotid in sense-Orientierung unter dem konstitutiven Superpromoter. Die rekombinanten Vektoren wurden gemäß Standardbedingungen in *Agrobacterium tumefaciens* C5801 und PMP90-Pflanzen transformiert. *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps C24 wurden gemäß Standardbedingungen herangezogen und transformiert. Die T1-Pflanzen wurden auf Resistenz gegenüber dem Selektionsmittel, die von dem selektierbaren Markergen vermittelt wurde, durchmustert, und die T1-Samen wurden gewonnen.

[0116] Die P. patens-Polynukleotide wurden in A. thaliana unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters überexprimiert. Die T2- und/oder T3-Samen wurden auf Resistenz gegenüber dem Selektionsmittel, die von dem selektierbaren Markergen vermittelt wurde, auf Platten durchmustert, und die positiven Pflanzen wurden in den Boden umgesetzt und 3 Wochen lang in einer Wachstumskammer herangezogen. Während dieser Zeit wurde die Bodenfeuchtigkeit bei ungefähr 50% der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens gehalten.

[0117] Der Gesamtwasserverlust (Transpiration) der Pflanze während dieser Zeit wurde bestimmt. Nach 3 Wochen wurde das gesamte oberirdische Pflanzenmaterial gewonnen, 2 Tage lang bei 65°C getrocknet und dann gewogen. Das Verhältnis zwischen Trockengewicht der oberirdischen Pflanze (TG) zu Wasserverbrauch der Pflanze ist die Wassernutzungseffizienz (WUE). Die Tabellen 22–41 zeigen die WUE und das TG für unabhängige Transformations-Events (Linien) von transgenen Pflanzen, die die P. patens-Polynukleotide überexprimieren. Es sind die LSM-Werte (Least Square Means), die Standardfehler und der Signifikanzwert (P) einer Linie im Vergleich zu Wildtypkontrollen einer Varianzanalyse dargestellt. Die Verbesserung der WUE und des TG in Prozent für jede P. patens-Polynukleotid-Linie im Vergleich zu Wildtypkontrollpflanzen ist ebenfalls dargestellt.

Tabelle 22

A. thaliana-Linien, die PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,136	0,011	-	-
	PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2)	8	0,217	0,025	60	0,0033
		6	0,222	0,028	64	0,0047
		5	0,226	0,032	67	0,0085
		10	0,228	0,025	68	0,0009
		2	0,230	0,032	70	0,0063
WUE	Wildtyp		2,270	0,085	-	-
	PpTPT-1 (SEQ ID NO: 2)	8	2,274	0,190	0	0,9822
		6	2,308	0,212	2	0,8656
		2	2,426	0,245	7	0,5465
		5	2,675	0,245	18	0,1207

Tabelle 23

A. thaliana-Linien, die PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,088	0,009	-	-
	PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4)	4	0,117	0,016	33	0,1147
		1	0,125	0,016	42	0,0473
WUE	Wildtyp		1,446	0,097	-	-
	PpCDC2-1 (SEQ ID NO: 4)	4	1,890	0,186	31	0,036
		1	1,947	0,186	35	0,0183

Tabelle 24

A. thaliana-Linien, die PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,109	0,033	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	Wildtyp		1,782	0,119	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 6)	10	2,205	0,169	24	0,0529

Tabelle 25

A. thaliana-Linie, die PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,088	0,008	-	-
	PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8)	2	0,130	0,017	48	0,0276
WUE	Wildtyp		1,446	0,102	-	-
	PpRBP-1 (SEQ ID NO: 8)	2	2,301	0,214	59	0,0004

Tabelle 26

A. thaliana-Linien, die PpPD-1 (SEQ ID NO: 10) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,114	0,006	-	-
	PpPD-1 (SEQ ID NO: 10)	3	0,171	0,019	50	0,0045
		1	0,171	0,017	50	0,0019
		8	0,174	0,019	53	0,0026
		2	0,182	0,019	60	0,0007
		11	0,191	0,017	67	<, 0001
		5	0,201	0,019	76	<, 0001
		9	0,204	0,017	79	<, 0001
WUE	Wildtyp		1,958	0,058	-	-
	PpPD-1 (SEQ ID NO: 10)	11	2,328	0,165	19	0,0353
		1	2,343	0,165	20	0,0286
		8	2,354	0,180	20	0,0383
		2	2,450	0,180	25	0,0102
		3	2,517	0,180	29	0,0036
		5	2,552	0,180	30	0,002
		9	2,572	0,165	31	0,0006

Tabelle 27

A. thaliana-Linien, die PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,136	0,011	-	-
	PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12)	3	0,227	0,027	68	0,0026
		2	0,240	0,025	77	0,0002
		1	0,247	0,025	82	<, 0001
		4	0,271	0,022	100	<, 0001
WUE	Wildtyp		2,270	0,085	-	-
	PpMSC-1 (SEQ ID NO: 12)	2	2,343	0,191	3	0,7268
		4	2,631	0,174	16	0,0654
		1	2,820	0,191	24	0,0097

Tabelle 28

A. thaliana-Linien, die PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,110	0,005	-	-
	PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14)	1	0,154	0,017	39	0,0146
WUE	Wildtyp		1,620	0,066	-	-
	PpMBP-1 (SEQ ID NO: 14)	1	2,144	0,209	32	0,0182

Tabelle 29

A. thaliana-Linien, die PpAK-1 (SEQ ID NO: 16) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,136	0,011	-	-
	PpAK-1 (SEQ ID NO: 16)	1	0,185	0,022	36	0,049
		5	0,216	0,022	59	0,0014
		3	0,217	0,027	60	0,0063
		7	0,217	0,024	60	0,0026
		8	0,227	0,024	68	0,0008
		4	0,230	0,024	69	0,0006
WUE	Wildtyp		2,270	0,084	-	-
	PpAK-1 (SEQ ID NO: 16)	8	2,285	0,188	1	0,9394
		7	2,358	0,188	4	0,6683
		5	2,374	0,172	5	0,5851
		3	2,377	0,211	5	0,6369
		4	2,403	0,188	6	0,5191

Tabelle 30

A. thaliana-Linien, die PpZF-6 (SEQ ID NO: 18) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,107	0,015	-	-
	PpZF-6 (SEQ ID NO: 18)	4	0,131	0,018	22	0,3091
WUE	Wildtyp		1,897	0,316	-	-
	PpZF-6 (SEQ ID NO: 18)	4	2,026	0,371	7	0,7946

Tabelle 31

A. thaliana-Linien, die PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,088	0,009	-	-
	PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20)	7	0,148	0,017	69	0,0029
WUE	Wildtyp		1,446	0,102	-	-
	PpCDK-1 (SEQ ID NO: 20)	7	1,963	0,195	36	0,0207

Tabelle 32

A. thaliana-Linien, die PpZF-7 (SEQ ID NO: 22) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,114	0,006	-	-
	PpZF-7 (SEQ ID NO: 22)	1	0,151	0,019	32	0,0617
		10	0,153	0,019	35	0,0456
		2	0,159	0,019	39	0,0226
		7	0,160	0,019	40	0,0198
		3	0,163	0,019	43	0,0139
		6	0,175	0,019	54	0,0021
		9	0,176	0,019	55	0,0018
		5	0,177	0,019	56	0,0014
		8	0,196	0,019	72	<, 0001
4	0,217	0,019	90	<, 0001		
WUE	Wildtyp		1,958	0,057	-	-
	PpZF-7 (SEQ ID NO: 22)	2	2,185	0,176	12	0,2224
		10	2,237	0,176	14	0,1331
		7	2,242	0,176	15	0,1262
		9	2,327	0,176	19	0,0479
		3	2,359	0,176	20	0,0318
		6	2,378	0,176	21	0,0245
		1	2,435	0,176	24	0,0108
		5	2,490	0,176	27	0,0045
		8	2,537	0,176	30	0,002
4	2,707	0,176	38	<, 0001		

Tabelle 33

A. thaliana-Linien, die PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,110	0,005	-	-
	PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24)	4	0,128	0,016	16	0,3008
		2	0,130	0,016	18	0,25
		10	0,145	0,016	31	0,0465
		3	0,146	0,016	32	0,0417
		6	0,159	0,016	44	0,0048
		7	0,164	0,016	48	0,0022
		5	0,166	0,016	50	0,0015
		1	0,168	0,016	52	0,0011
8	0,172	0,016	56	0,0004		
WUE	Wildtyp		1,620	0,064	-	-
	PpMFP-1 (SEQ ID NO: 24)	3	1,979	0,203	22	0,0929
		8	2,049	0,203	26	0,0451
		7	2,049	0,203	26	0,0449
		4	2,095	0,203	29	0,0267
		1	2,113	0,203	30	0,0215
		6	2,178	0,203	34	0,0094
		5	2,217	0,203	37	0,0055
		10	2,324	0,203	43	0,0011
2	2,345	0,203	45	0,0008		

Tabelle 34

A. thaliana-Linien, die PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,136	0,011	-	-
	PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26)	4	0,199	0,029	47	0,042
		2	0,206	0,023	52	0,0078
		3	0,224	0,029	65	0,0049
		1	0,227	0,023	67	0,0007
		5	0,235	0,026	74	0,0006
		8	0,266	0,040	96	0,0026
WUE	Wildtyp		2,270	0,090	-	-
	PpLRP-2 (SEQ ID NO: 26)	4	2,360	0,224	4	0,7073
		5	2,402	0,200	6	0,5481
		1	2,404	0,183	6	0,5095
		8	2,471	0,317	9	0,5426

Tabelle 35

A. thaliana-Linien, die PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,108	0,007	-	-
	PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28)	4	0,157	0,020	45	0,023
		2	0,159	0,018	47	0,0097
		10	0,175	0,020	62	0,0018
		9	0,177	0,022	64	0,0037
WUE	Wildtyp		1,951	0,078	-	-
	PpPPK-1 (SEQ ID NO: 28)	4	2,043	0,219	5	0,6913
		9	2,158	0,245	11	0,4225
		2	2,177	0,200	12	0,2948
		10	2,523	0,219	29	0,0149

Tabelle 36

A. thaliana-Linien, die PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,114	0,006	-	-
	PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30)	7	0,152	0,018	33	0,0495
		6	0,159	0,018	39	0,0196
		1	0,162	0,020	42	0,026
		10	0,164	0,017	44	0,0054
		9	0,167	0,015	46	0,0015
		8	0,174	0,018	53	0,0019
		2	0,179	0,018	57	0,0008
WUE	Wildtyp		1,958	0,057	-	-
	PpSRP-1 (SEQ ID NO: 30)	10	2,109	0,161	8	0,3776
		8	2,197	0,177	12	0,1991
		9	2,239	0,149	14	0,0802
		2	2,302	0,177	18	0,0659
		6	2,405	0,177	23	0,017
		1	2,450	0,197	25	0,0178

Tabelle 37

A. thaliana-Linien, die PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,114	0,006	-	-
	PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32)	5	0,156	0,019	37	0,034
		8	0,163	0,019	43	0,0153
		4	0,179	0,019	57	0,0012
		3	0,180	0,019	58	0,0011
		6	0,181	0,017	59	0,0003
		1	0,182	0,017	59	0,0003
		9	0,214	0,017	87	<, 0001
WUE	Wildtyp		1,958	0,057	-	-
	PpCBL-1 (SEQ ID NO: 32)	3	2,109	0,177	8	0,4181
		5	2,152	0,177	10	0,2991
		8	2,158	0,177	10	0,2836
		1	2,298	0,162	17	0,0489
		6	2,306	0,162	18	0,0438
		9	2,319	0,162	18	0,0367
		4	2,440	0,177	25	0,0105

Tabelle 38

A. thaliana-Linien, die PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,114	0,006	-	-
	PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34)	9	0,156	0,017	37	0,0226
		10	0,170	0,017	49	0,0027
		1	0,179	0,017	57	0,0005
		4	0,188	0,017	65	<, 0001
		7	0,188	0,017	65	<, 0001
		3	0,192	0,017	68	<, 0001
		8	0,194	0,017	70	<, 0001
		2	0,203	0,017	78	<, 0001
WUE	Wildtyp		1,958	0,054	-	-
	PpCBL-2 (SEQ ID NO: 34)	9	1,944	0,168	-1	0,9357
		2	2,314	0,168	18	0,0451
		10	2,322	0,168	19	0,0405
		8	2,448	0,168	25	0,0061
		3	2,545	0,168	30	0,0011
		4	2,569	0,168	31	0,0007
		1	2,617	0,168	34	0,0003
		7	2,771	0,168	42	<, 0001

Tabelle 39

A. thaliana-Linien, die PpHD-1 (SEQ ID NO: 36) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		1,620	0,065	-	-
	PpHD-1 (SEQ ID NO: 36)	7	1,976	0,207	22	0,1027
		3	1,985	0,207	23	0,0944
		6	2,144	0,207	32	0,0169
		2	2,374	0,207	47	0,0007
		8	2,444	0,207	51	0,0002
WUE	Wildtyp		0,110	0,005	-	-
	PpHD-1 (SEQ ID NO: 36)	2	0,126	0,016	14	0,3655
		8	0,143	0,016	30	0,0566
		6	0,149	0,016	35	0,0246
		3	0,152	0,016	37	0,0177
		7	0,191	0,016	73	<, 0001

Tabelle 40

A. thaliana-Linien, die PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,109	0,033	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	Wildtyp		1,782	0,119	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 56)	10	2,205	0,169	24	0,0529

Tabelle 41

A. thaliana-Linien, die PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58) überexprimieren

Messung	Genotyp	Linie	LSM	Standardfehler	% Verbesserung	P-Wert
TG	Wildtyp		0,109	0,033	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58)	10	0,161	0,034	48	0,2835
WUE	Wildtyp		1,782	0,119	-	-
	PpLRP-1 (SEQ ID NO: 58)	10	2,205	0,169	24	0,0529

Beispiel 4 – Streßtolerante Raps-/Canola-Pflanzen

[0118] Keimblattpetiolen von 4 Tage alten jungen Canola-Keimpflanzen werden als Explantat für die Gewebekultur verwendet und gemäß EP 1566443 transformiert. Die im Handel erhältliche Sorte Westar (Agriculture Canada) ist die Standardvarietät für Transformationszwecke, es können jedoch auch andere Varietäten verwendet werden. Für die Transformation von Canola wird *A. tumefaciens* GV3101:pMP90RK, das einen binären Vektor enthält, verwendet. Der für Transformationszwecke verwendete binäre Standardvektor ist pSUN (WO 02/00900), es sind jedoch viele verschiedene binäre Vektorsysteme für die Pflanzentransformation beschrieben worden (z. B. An, G. in *Agrobacterium Protocols, Methods in Molecular Biology*, Band 44, S. 47–62, Garland KMA und MR Davey, Hrsg., Humana Press, Totowa, New Jersey). Man verwendet eine Pflanzengenexpressionskassette umfassend ein Selektionsmarkergen und einen Pflanzenpromoter, der die Transkription der cDNA, welche für das Polynukleotid kodiert, reguliert. Es können verschiedene Selektionsmarkergene verwendet werden, darunter das in den US Patenten Nr. 5,767,366 und 6,225,105 beschriebene mutierte Acetohydroxysäuresynthase-(AHAS-)gen. Für die Regulation des Merkmalsgens wird ein geeigneter Promoter verwendet, um zu einer konstitutiven, entwicklungsgesteuerten, gewebe gesteuerten oder umweltgesteuerten Regulation der Gentranskription zu gelangen.

[0119] Canola-Samen werden 2 min in 70%igem Ethanol oberflächensterilisiert, 15 min in Leitungswasser mit einer Temperatur von 55°C und dann 10 Minuten in 1,5%igem Natriumhypochlorit inkubiert und anschließend dreimal mit sterilisiertem destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend werden die Samen auf hormonfreies MS-Medium mit Gamborg-B5-Vitaminen, 3% Saccharose und 0,8% Oxoid-Agar gegeben. Die Samen werden 4 Tage lang bei 24°C unter schwachem Licht (< 50 µMol/m²s, 16 Stunden Licht) keimen gelassen. Die Keimblattpetiolenexplantate werden mit dem anhaftenden Keimblatt von den in-vitro-Samen herauspräpariert, und durch Eintauchen des abgeschnittenen Endes des Petiolenexplantats in die Bakteriensuspension mit Agrobac-

terium inokuliert. Die Explantate werden dann 3 Tage lang auf vitaminhaltigem MS-Medium, das 3,75 mg/l BAP, 3% Saccharose, 0,5 g/l MES, pH 5,2, 0,5 mg/l GA3, 0,8% Oxoid-Agar enthält, bei 24°C und 16 Stunden Licht kultiviert. Nach dreitägiger Cokultivierung mit Agrobacterium werden die Petiolenexplantate auf Regenerationsmedium, das 3,75 mg/l BAP, 0,5 mg/l GA3, 0,5 g/l MES, pH 5,2, 300 mg/l Timentin und Selektionsmittel enthält, umgesetzt, bis sich Sprosse regenerieren. Sobald die Explantate mit der Sproßentwicklung beginnen, werden sie auf Sproßelongationsmedium (A6, das MS-Medium in voller Konzentration mit Vitaminen, 2% Saccharose, 0,5% Oxoid-Agar, 100 mg/l myo-Inosit, 40 mg/l Adeninsulfat, 0,5 g/l MES, pH 5,8, 0,0025 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 300 mg/l Timentin und Selektionsmittel) umgesetzt.

[0120] Stichproben des in-vitro-Materials und des Gewächshausmaterials der transgenen Primärpflanzen (T0) werden mittels gPCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden analysiert, um das Vorhandensein von T-DNA zu bestätigen und die Anzahl der T-DNA-Integrationen zu bestimmen.

[0121] Von den transgenen Primärpflanzen werden durch Selbstbestäubung Samen gewonnen. Die Pflanzen der zweiten Generation werden unter Gewächshausbedingungen herangezogen und selbstbestäubt. Die Pflanzen werden mittels gPCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden analysiert, um das Vorhandensein von T-DNA zu bestätigen und die Anzahl der T-DNA-Integrationen zu bestimmen. Die homozygoten transgenen Pflanzen, die heterozygoten transgenen Pflanzen und die azygoten (null-transgenen) Pflanzen werden zum Beispiel in den in Beispiel 3 beschriebenen Tests auf Streßtoleranz und sowohl in Gewächshausuntersuchungen als auch in Freilanduntersuchungen auf Ertrag verglichen.

Beispiel 5 – Screening auf streßtolerante Reispflanzen

[0122] Transgene Reispflanzen umfassend ein erfindungsgemäßes Polynukleotid werden unter Verwendung von bekannten Verfahren erzeugt. Es werden ungefähr 15 bis 20 unabhängige Transformanten (T0) erzeugt. Für die Anzucht und Ernte von T1-Samen werden die Primärtransformanten von Gewebekulturkammern in ein Gewächshaus umgestellt. Fünf Events der T1-Nachkommenschaft spalteten 3:1 für Vorhandensein/Fehlen des Transgens auf und wurden behalten. Für jedes dieser Events werden 10 T1-Keimlinge, die das Transgen enthalten (Hetero- und Homozygote), sowie 10 T1-Keimlinge, denen das Transgen fehlt (Nullizygote), durch visuelles Marker-Screening selektiert. Die selektierten T1-Pflanzen werden in ein Gewächshaus umgestellt. Jede Pflanze wird mit einem einzigartigen Strichcode-Etikett versehen, um die Phänotyping-Werte eindeutig der entsprechenden Pflanze zuzuordnen. Die selektierten T1-Pflanzen werden in Boden in Töpfen mit 10 cm Durchmesser herangezogen, und zwar unter den folgenden Umweltbedingungen: Photoperiode = 11,5 h, Tageslichtintensität = 30.000 Lux oder mehr, Tagestemperatur = 28°C oder höher, Nachttemperatur = 22°C, relative Feuchte = 60–70%. Die transgenen Pflanzen und die entsprechenden Nullizygoten werden nebeneinander in zufälliger Anordnung herangezogen. Vom Sästadium bis zum Reifestadium stellt man die Pflanzen mehrmals in eine Digital-Imaging-Kammer. Zu jedem Zeitpunkt werden Digitalbilder (2048×1536 Pixel, 16 Millionen Farben) von jeder Pflanze von mindestens 6 verschiedenen Winkeln aufgenommen.

[0123] Die in dem ersten Versuch mit den T1-Pflanzen erhaltenen Werte werden in einem zweiten Versuch mit T2-Pflanzen bestätigt. Linien mit korrektem Expressionsmuster werden für die weitere Analyse selektiert. Samenchargen der positiven Pflanzen (sowohl Hetero- als auch Homozygote) in T1 werden durch Verfolgen der Markerexpression gescreent. Für jedes gewählte Event werden die heterozygoten Samenchargen dann für die T2-Auswertung behalten. Innerhalb jeder Samencharge wird die gleiche Anzahl positiver und negativer Pflanzen im Gewächshaus für die Auswertung herangezogen.

[0124] Die transgenen Pflanzen werden auf ihr verbessertes Wachstum und/oder ihren verbesserten Ertrag und/oder ihre verbesserte Streßtoleranz, und zwar zum Beispiel unter Verwendung der in Beispiel 3 beschriebenen Tests, sowie auf Ertrag gescreent, und zwar sowohl in Gewächshaus- als auch in Freilandstudien.

Beispiel 6 – Streßtolerante Sojapflanzen

[0125] Die Polynukleotide von Tabelle 1 und 2 werden in Soja transformiert, und zwar unter Verwendung der Verfahren der eigenen, gleichzeitig abhängigen internationalen Anmeldung WO 2005/121345, deren Inhalt per Referenz in den folgenden Text aufgenommen wird. Die transgenen Pflanzen werden dann auf verbessertes Wachstum und/oder verbesserten Ertrag unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder auf Toleranz gegenüber Trockenheit, Salinität und/oder Kälte, zum Beispiel wie in den in Beispiel 3 beschriebenen Tests sowie auf Ertrag gescreent, und zwar sowohl in Gewächshaus- als auch in Freilandstudien.

Beispiel 7 – Streßtolerante Weizenpflanzen

[0126] Die Transformation von Weizen erfolgt mit dem von Ishida et al., 1996, Nature Biotech. 14745–50 beschriebenen Verfahren. Unreife Embryonen werden mit *Agrobacterium tumefaciens* mit „superbinären“ Vektoren cokultiviert, und transgene Pflanzen werden durch Organogenese gewonnen. Dieses Verfahren weist eine Transformationseffizienz zwischen 2,5% und 20% auf. Die transgenen Pflanzen werden dann auf verbessertes Wachstum und/oder verbesserten Ertrag unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder auf Streßtoleranz, zum Beispiel wie in den in Beispiel 3 beschriebenen Tests sowie auf Ertrag gescreent, und zwar sowohl in Gewächshaus- als auch in Freilandstudien.

Beispiel 8 – Streßtolerante Maispflanzen

[0127] *Agrobacterium*-Zellen, die die Gene und das Mais-AHAS-Gen auf demselben Plasmid tragen, werden in YP-Medium mit einem Zusatz von entsprechenden Antibiotika 1–3 Tage lang gezüchtet. Eine Öse voll *Agrobacterium*-Zellen wird entnommen und in 1,5 ml M-LS-002-Medium (LS-inf) suspendiert, und das Röhrchen, das die *Agrobacterium*-Zellen enthält, wird 1–4 Stunden bei 1,000 U/min auf einem Schüttler gelassen.

[0128] Maiskolben [Genotyp J553 × (H111A × A188)] werden 7–12 Tage nach der Bestäubung geerntet. Die Kolben werden 15 Minuten lang in einer 20%igen Clorox-Lösung sterilisiert und anschließend gründlich mit sterilem Wasser gewaschen. Unreife Embryonen mit einer Größe von 0,8–2,0 mm werden in das Röhrchen, das die *Agrobacterium*-Zellen in LS-inf-Lösung enthält, präpariert.

[0129] Die Agro-Infektion erfolgt dadurch, daß man das Röhrchen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur horizontal in der Laminar-Flow-Bank aufbewahrt. Eine Mischung der Agroinfektion wird auf eine Platte, die das Cokulturmedium (M-LS-011) enthält, gegossen. Nachdem die flüssige Agro-Lösung herausgeleitet worden ist, werden die Embryonen auf die Oberfläche eines Papierfilters, das auf das Agar-Cokulturmedium gelegt wird, übertragen. Die überschüssige Bakterienlösung, wird abpipettiert. Die Embryonen werden mit der Scutellum-Seite nach oben auf das Cokulturmedium gelegt und im Dunklen 2–4 Tage bei 22°C kultiviert.

[0130] Die Embryonen werden ohne Selektion auf M-MS-101-Medium umgesetzt. Sieben bis zehn Tage später werden die Embryonen auf M-LS-401-Medium, das 0,50 µM Imazethapyr enthält, umgesetzt und 4 Wochen lang wachsen gelassen (zweimal Umsetzen im Abstand von 2 Wochen), um auf transformierte Kalluszellen zu selektieren. Die Pflanzenregeneration wird dadurch initiiert, daß man resistente Kalli auf M-LS-504-Medium mit einem Zusatz von 0,75 µM Imazethapyr umsetzt und diese zwei bis drei Wochen lang unter Licht bei 25–27°C wachsen lässt. Die regenerierten Sprosse werden dann in die Bewurzelungskiste mit M-MS-618-Medium (0,5 µM Imazethapyr) umgesetzt. Die Pflänzchen mit Wurzeln werden in Blumenerdemischung in kleinen Töpfen im Gewächshaus umgesetzt und nach dem Akklimatisieren in größere Töpfe umgepflanzt und im Gewächshaus bis zur Reife stehengelassen.

[0131] Die Kopienzahl des Transgens in jedem Pflänzchen wird mit der Taqman-Analyse der genomischen DNA getestet, und die Transgenexpression wird mit qRT-PCR von Gesamt-RNA, die aus Blattproben isoliert wurde, getestet.

[0132] Unter Verwendung von Assays wie dem in Beispiel 3 beschriebenen Assay wird jede dieser Pflanzen mit einem einzigartigen Etikett versehen, einer Probennahme unterzogen und auf die Kopienzahl des Transgens analysiert. Transgenpositive und -negative Pflanzen werden markiert und mit ähnlichen Größen gepaart, um gemeinsam in große Töpfe umgepflanzt zu werden. So wird eine einheitliche und kompetitive Umwelt für die transgenpositiven und -negativen Pflanzen bereitgestellt. Die großen Töpfe werden auf einen gewissen Prozentsatz der Feldwasserkapazität des Bodens gegossen, und zwar je nach der Stärke des gewünschten Wasserstresses. Der Bodenwassergehalt wird durch Gießen alle zwei Tage aufrechterhalten. Während der Wachstumsperiode werden Pflanzenwachstums- und -physiologiemerkmale wie Höhe, Stengeldurchmesser, Einrollen der Blätter, Welken der Pflanze, Blattentfaltungsrates, Blattwasserzustand, Chlorophyllgehalt und Photosyntheserate gemessen. Nach einer Wachstumsperiode wird der oberirdische Teil der Pflanzen geerntet, und Frischgewicht und Trochengewicht jeder Pflanze werden aufgezeichnet. Dann erfolgt ein Vergleich des Trockenheitstoleranz-Phänotyps zwischen den transgenpositiven und -negativen Pflanzen.

[0133] Unter Verwendung von Assays wie dem in Beispiel 3 beschriebenen Assay werden die Töpfe mit Deckeln abgedeckt, die die Keimlinge durchwachsen lassen, jedoch Wasserverluste minimieren. Jeder Topf wird in gewissen Zeitabständen gewogen, und es wird mit Wasser versetzt, um den ursprünglichen Wassergehalt aufrechtzuerhalten. Am Ende des Versuchs wird das Frischgewicht und das Trockengewicht jeder Pflanze be-

stimmt, das von jeder Pflanze aufgenommene Wasser wird zahlenmäßig bestimmt und die WUE jeder Pflanze wird berechnet. Pflanzenwachstums- und -physiologiemerkmale wie WUE, Höhe, Stengeldurchmesser, Einrollen der Blätter, Welken der Pflanze, Blattentfaltungsrates, Blattwasserzustand, Chlorophyllgehalt und Photosyntheserate werden während des Versuchs bestimmt. Dann wird ein Vergleich des WUE-Phänotyps zwischen den transgenpositiven und -negativen Pflanzen angestellt.

[0134] Unter Verwendung von Assays wie dem in Beispiel 3 beschriebenen Assay werden diese Töpfe in einer Zone des Gewächshauses, die gleichmäßige Umweltbedingungen aufweist, stehengelassen und optimal versorgt. Jede dieser Pflanzen wird mit einem einzigartigen Etikett versehen, einer Probennahme unterzogen und auf die Kopienzahl des Transgens analysiert. Die Pflanzen werden unter diesen Bedingungen wachsen gelassen, bis sie ein vorbestimmtes Wachstumsstadium erreicht haben. Dann wird mit der Wasserversorgung aufgehört. Im Verlauf der Zunahme der Streßintensität werden Pflanzenwachstums- und -physiologiemerkmale wie Höhe, Stengeldurchmesser, Einrollen der Blätter, Welken der Pflanze, Blattentfaltungsrates, Blattwasserzustand, Chlorophyllgehalt und Photosyntheserate bestimmt. Dann wird ein Vergleich des Austrocknungstoleranz-Phänotyps zwischen den transgenpositiven und -negativen Pflanzen angestellt.

[0135] Für ein Transformations-Event aufspaltende transgene Maissamen werden für die Prüfung in einem zyklischen Trockenheits-Assay in kleine Töpfe gepflanzt. Diese Töpfe werden in einer Zone des Gewächshauses, die gleichmäßige Umweltbedingungen aufweist, stehengelassen und optimal versorgt. Jede dieser Pflanzen wird mit einem einzigartigen Etikett versehen, einer Probennahme unterzogen und auf die Kopienzahl des Transgens analysiert. Die Pflanzen werden unter diesen Bedingungen wachsen gelassen, bis sie ein vorbestimmtes Wachstumsstadium erreicht haben. Dann werden die Pflanzen zu bestimmten Zeitabständen wiederholt bis zum Sättigungspunkt gegossen. Dieser Wasser/Trockenheits-Zyklus wird über die gesamte Versuchsdauer wiederholt. Pflanzenwachstums- und -physiologiemerkmale wie Höhe, Stengeldurchmesser, Einrollen der Blätter, Welken der Pflanze, Blattentfaltungsrates, Blattwasserzustand, Chlorophyllgehalt und Photosyntheserate werden während der Wachstumsperiode bestimmt. Am Ende des Versuchs werden die Pflanzen für oberirdisches Frisch- und Trockengewicht geerntet. Dann wird ein Vergleich des zyklischen Trockenheitstoleranz-Phänotyps zwischen den transgenpositiven und -negativen Pflanzen angestellt.

[0136] Um aufspaltenden transgenen Mais auf Trockenheitstoleranz unter regenfreien Bedingungen zu testen, verwendet man kontrollierten Trockenheitsstreß an einem einzelnen Standort oder an mehreren Standorten. Die Verfügbarkeit von Wasser für die Kultur wird durch einen Tropfschlauch oder Bewässerung von oben an einem Standort, von dem erwartet wird, daß er während einer durchschnittlichen fünfmonatigen Vegetationsperiode weniger als 10 cm Niederschlag und Minimaltemperaturen von über 5°C aufweist, oder an einem Standort, dessen erwartete Niederschlagsmenge während der Wachstumsperiode durch eine automatisch betriebene „Regenschranke“ abgefangen wird, kontrolliert, die, wenn sie nicht gebraucht wird, eingezogen wird, um offene Feldbedingungen zu gewährleisten. Bezüglich Bodenvorbereitung, Auspflanzen, Düngung und Schädlingskontrolle wendet man die ortsüblichen Bewirtschaftungsmaßnahmen an. Jede Parzelle wird mit Saatgut, das bezüglich des Vorhandenseins eines einzelnen transgenen Insertions-Events aufspaltet, besät. An Blattproben verwendet man einen Taqman-Assay für die Kopienzahl des Transgens, um zwischen den transgenen Pflanzen und den als Kontrollpflanzen dienenden Null-Segreganten zu unterscheiden. Pflanzen, deren Genotyp auf diese Weise bestimmt wurde, werden auch auf verschiedene Phänotypen, die mit Trockenheitstoleranz, Wachstum und Ertrag in Beziehung stehen, durchmustert. Zu diesen Phänotypen zählen Pflanzenhöhe, Keimgewicht pro Pflanze, Kornzahl pro Pflanze, Kolbenzahl pro Pflanze, oberirdisches Trockengewicht, Blattleitfähigkeit für Wasserdampf, CO₂-Aufnahme durch das Blatt, Chlorophyllgehalt des Blattes, photosynthesebezogene Chlorophyll-Fluoreszenzparameter, Wassernutzungseffizienz, Wasserpotential des Blattes, relativer Wassergehalt des Blattes, Saffflußrate im Stamm, hydraulische Konduktivität im Stamm, Blattemperatur, Reflektion des Blattes, Lichtabsorption des Blattes, Blattfläche, Tage bis zur Blüte, Zeitraum zwischen Anthese und Seidenschleiben, Kornfüllungsdauer, osmotisches Potential, osmotische Anpassung, Wurzelgröße, Blattentfaltungsrates, Blattwinkel, Einrollen der Blätter und Überleben. Alle Messungen wurden mit im Handel erhältlichen Geräten für die Feldphysiologie unter Verwendung der von den Herstellern bereitgestellten Standardprotokolle durchgeführt. Als Wiederholungseinheit pro Event dienen einzelne Pflanzen.

[0137] Um nichtaufspaltenden transgenen Mais auf Trockenheitstoleranz unter regenfreien Bedingungen zu testen, verwendet man kontrollierten Trockenheitsstreß an einem einzelnen Standort oder an mehreren Standorten. Die Verfügbarkeit von Wasser für die Kultur wird durch einen Tropfschlauch oder Bewässerung von oben an einem Standort, von dem erwartet wird, daß er während einer durchschnittlichen fünfmonatigen Vegetationsperiode weniger als 10 cm Niederschlag und Minimaltemperaturen von über 5°C aufweist, oder an einem Standort, dessen erwartete Niederschlagsmenge während der Wachstumsperiode durch eine automatisch betriebene „Regenschranke“ abgefangen wird, kontrolliert, die, wenn sie nicht gebraucht wird, eingezogen wird,

um offene Feldbedingungen zu gewährleisten. Bezüglich Bodenvorbereitung, Aussäen, Düngung und Schädlingskontrolle wendet man die ortsüblichen Bewirtschaftungsmaßnahmen an. Die Versuchsanlage ist dergestalt, daß man eine Parzelle, die ein nichtaufspaltendes transgenes Event enthält, mit einer benachbarten Parzelle mit Null-Segreganten als Kontrollen paart. Eine Null-Segregante ist eine Nachkommenschaft (oder von der Nachkommenschaft abstammende Linie) einer transgenen Pflanze, die aufgrund der Mendelschen Abspaltung das Transgen nicht enthält. Zusätzliche wiederholte paarweise Parzellen für ein bestimmtes Event sind über den Versuch verteilt. Verschiedene Phänotypen in Bezug auf Trockenheitstoleranz, Wachstum und Ertrag werden in den gepaarten Parzellen bonitiert und auf Parzellenniveau geschätzt. Konnte die Meßtechnik nur auf Einzelpflanzen angewandt werden, so werden diese jedes Mal innerhalb der Parzelle zufallsmäßig gewählt. Zu diesen Phänotypen zählen Pflanzenhöhe, Keimgewicht pro Pflanze, Kornzahl pro Pflanze, Kolbenzahl pro Pflanze, oberirdisches Trockengewicht, Blattleitfähigkeit für Wasserdampf, CO₂-Aufnahme durch das Blatt, Chlorophyllgehalt des Blattes, photosynthesebezogene Chlorophyll-Fluoreszenzparameter, Wassernutzungseffizienz, Wasserpotential des Blattes, relativer Wassergehalt des Blattes, Saffflußrate im Stamm, hydraulische Leitfähigkeit im Stamm, Blattemperatur, Reflektion des Blattes, Lichtabsorption des Blattes, Blattfläche, Tage bis zur Blüte, Zeitraum zwischen Anthese und Seidenschleiben, Kornfüllungsdauer, osmotisches Potential, osmotische Anpassung, Wurzelgröße, Blattentfaltungsrate, Blattwinkel, Einrollen der Blätter und Überleben. Alle Messungen wurden mit im Handel erhältlichen Geräten für die Feldphysiologie unter Verwendung der von den Herstellern bereitgestellten Standardprotokolle durchgeführt. Als Wiederholungseinheit pro Event dienen einzelne Pflanzen.

[0138] Für die Prüfung von transgenem Mais auf Trockenheitstoleranz und Ertrag an mehreren Standorten werden fünf bis zwanzig Standorte, die Hauptmaisanbauregionen umfassen, ausgewählt. Diese sind weit verbreitet, so daß ein Bereich von erwarteten Wasserverfügbarkeitswerten für die Kulturpflanzen, die auf durchschnittliche Temperatur, Feuchtigkeit, durchschnittlichem Niederschlag und durchschnittlichem Bodentyp beruhen, zur Verfügung stehen. Die Wasserverfügbarkeit für die Kulturpflanzen wird nicht weiter beeinflusst, als dies bei den üblichen Kulturmaßnahmen der Fall ist. Die Versuchsanlage ist dergestalt, daß man eine Parzelle, die ein nichtaufspaltendes transgenes Event enthält, mit einer benachbarten Parzelle mit Null-Segreganten als Kontrollen paart. Verschiedene Phänotypen in Bezug auf Trockenheitstoleranz, Wachstum und Ertrag werden in den gepaarten Parzellen bonitiert und auf Parzellenniveau geschätzt. Konnte die Meßtechnik nur auf Einzelpflanzen angewandt werden, so werden diese jedes Mal innerhalb der Parzelle zufallsmäßig gewählt. Zu diesen Phänotypen zählen Pflanzenhöhe, Keimgewicht pro Pflanze, Kornzahl pro Pflanze, Kolbenzahl pro Pflanze, oberirdisches Trockengewicht, Blattleitfähigkeit für Wasserdampf, CO₂-Aufnahme durch das Blatt, Chlorophyllgehalt des Blattes, photosynthesebezogene Chlorophyll-Fluoreszenzparameter, Wassernutzungseffizienz, Wasserpotential des Blattes, relativer Wassergehalt des Blattes, Saffflußrate im Stamm, hydraulische Leitfähigkeit im Stamm, Blattemperatur, Reflektion des Blattes, Lichtabsorption des Blattes, Blattfläche, Tage bis zur Blüte, Zeitraum zwischen Anthese und Seidenschleiben, Kornfüllungsdauer, osmotisches Potential, osmotische Anpassung, Wurzelgröße, Blattentfaltungsrate, Blattwinkel, Einrollen der Blätter und Überleben. Alle Messungen wurden mit im Handel erhältlichen Geräten für die Feldphysiologie unter Verwendung der von den Herstellern bereitgestellten Standardprotokolle durchgeführt. Als Wiederholungseinheit pro Event dienen einzelne Pflanzen.

Zusammenfassung

[0139] Es werden Polynukleotide beschrieben, die fähig sind, Wachstum, Ertrag unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder erhöhte Toleranz einer Pflanze, die dahingehend transformiert wurde, daß sie solche Polynukleotide enthält, gegenüber einem Umweltstress zu vermitteln. Ebenfalls bereitgestellt werden Verfahren für die Verwendung von solchen Polynukleotiden und transgenen Pflanzen und Agrarprodukten, darunter Samen, die solche Polynukleotide als Transgene enthalten.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Patentliteratur

- EP 0359472 A [0088]
- EP 0385962 A [0088]
- WO 91/16432 [0088]
- US 5380831 [0088]
- US 5436391 [0088]
- US 15955646 [0092]
- US 5683439 [0092]
- WO 95/19443 [0093]
- WO 93/21334 [0093]
- WO 97/20057 [0094]
- US 5187267 [0094]
- WO 96/12814 [0094]
- EP 375091 [0094]
- US 5608152 [0096]
- WO 98/45461 [0096]
- US 5504200 [0096]
- WO 91/13980 [0096]
- WO 95/15389 [0096]
- WO 95/23230 [0096]
- WO 99/16890 [0096]
- US 5086169 [0097]
- US 5412085 [0097]
- US 5545546 [0097]
- US 5470359 [0097]
- US 4945050 [0099]
- US 5036006 [0099]
- US 5100792 [0099]
- US 5302523 [0099]
- US 5464765 [0099]
- US 5120657 [0099]
- US 6084154 [0099]
- US 5591616 [0099]
- US 5731179 [0099]
- US 5981840 [0099]
- US 5990387 [0099]
- US 6162965 [0099]
- US 6420630 [0099]
- EP 0424047 [0099]
- US 5322783 [0099]
- EP 0397687 [0099]
- US 5376543 [0099]
- US 5169770 [0099]
- WO 93/07256 [0099]
- US 5004863 [0099]
- US 5159135 [0099]
- US 5846797 [0099]
- US 4666844 [0099]
- US 5350688 [0099]
- US 6153813 [0099]
- US 6333449 [0099]
- US 6288312 [0099]
- US 6356807 [0099]

- US 6329571 [0099]
- US 5932782 [0099]
- US 6153811 [0099]
- US 6140553 [0099]
- US 5969213 [0099]
- US 6020539 [0099]
- EP 1566443 [0118]
- WO 02/00900 [0118]
- US 5767366 [0118]
- US 6225105 [0118]
- WO 2005/121345 [0125]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Meinkoth und Wahl, 1984, Anal. Biochem. 138: 267–284 [0086]
- Current Protocols in Molecular Biology, Kapitel 2, Ausubel et al., Hrsg., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1995 [0086]
- Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Teil I, Kapitel 2, Elsevier, New York, 1993 [0086]
- Narang, 1983, Tetrahedron 39: 3 [0087]
- Itakura et al., 1984, Annu. Rev. Biochem. 53: 323 [0087]
- Itakura et al., 1984, Science 198: 1056 [0087]
- Ike et al., 1983, Nucleic Acid Res. 11: 477 [0087]
- Perlack et al., 1991, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 88: 3324–3328 [0088]
- Murray et al., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 477–498 [0088]
- Odell et al., 1985, Nature 313: 810–812 [0092]
- Kay et al., 1987, Science 236: 1299–1302 [0092]
- McElroy et al., 1990, Plant Cell 2: 163–171 [0092]
- Christensen et al., 1989, Plant Molec. Biol. 18: 675–689 [0092]
- Last et al., 1991, Theor. Appl. Genet. 81: 581–588 [0092]
- Velten et al., 1984, EMBO J. 3: 2723–2730 [0092]
- Gatz, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 89–108 [0093]
- Gatz et al., 1992, Plant J. 2: 397–404 [0093]
- Chak et al., 2000, Planta 210: 875–883 [0094]
- Hovath et al., 1993, Plant Physiol. 103: 1047–1053 [0094]
- Anus et al., 1996, PNAS 93(23): 13404–09 [0094]
- Medina et al., 2001, Plant Physiol. 125: 1655–66 [0094]
- Nylander et al., 2001, Plant Mol. Biol. 45: 341–52 [0094]
- Navarre und Goffeau, 2000, EMBO J. 19: 2515–24 [0094]
- Capel et al., 1997, Plant Physiol. 115: 569–76 [0094]
- Xiong et al., 2001, Plant Cell 13: 2063–83 [0094]
- Abe et al., 1997, Plant Cell 9: 1859–68 [0094]
- Iwasaki et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 247: 391–8 [0094]
- Lang und Palve, 1992, Plant Mol. Biol. 20: 951–62 [0094]
- Hoeren et al., 1998, Genetics 149: 479–90 [0094]
- Nakamura et al., 1995, Plant Physiol. 109: 371–4 [0094]
- Müller-Röber et al., 1995, EMBO 14: 2409–16 [0094]
- Terryn et al., 1993, Plant Cell 5: 1761–9 [0094]
- Terryn et al., 1992, FEBS Lett. 299(3): 287–90 [0094]
- Atkinson et al., 1997, GenBank-Zugangsnummer 122302 [0094]
- Plesch et al., GenBank-Zugangsnummer X67427 [0094]
- Ahn et al., 1996, Plant Cell 8: 1477–90 [0094]
- Liu et al., 1994, Plant Cell 6: 645–57 [0094]
- Ward et al., 1993, Plant Mol. Biol. 22: 361–366 [0094]
- Yamaguchi-Shinozaki et al., 1993, Mol. Gen. Genet. 236: 331–340 [0094]
- Thompson et al., 1989, BioEssays 10: 108 [0095]
- Baeumlein et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 225(3): 459–67 [0096]
- Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2(2): 233–9 [0096]
- Brent und Ptashne, 1985, Cell 43: 729–736 [0098]
- Engel (1968, Am. J. Bot. 55: 438–446) [0107]

- pedant.mips.biochem.mpg.de [\[0108\]](#)
- Pearson, 1990, Methods Enzymol. 183: 63–98 [\[0108\]](#)
- Altschul et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215: 403–10 [\[0108\]](#)
- Frishman und Argos, 1997, Proteins 27: 329–335 [\[0108\]](#)
- Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673–4680 [\[0108\]](#)
- Persson und Argos, 1994, J. Mol. Biol. 237: 182–192 [\[0108\]](#)
- Klein et al., 1984, Biochim. Biophys. Acta 787: 221–226. Version 2 von Dr. K. Nakai [\[0108\]](#)
- Kolakowski et al., 1992, Biotechniques 13, 919–921 [\[0108\]](#)
- Wallace und Henikoff, 1992, Comput. Appl. Biosci. 8(3): 249–54 [\[0108\]](#)
- CABIOS 8: 249–254. Geschrieben von Bill Alford [\[0108\]](#)
- Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389–3402 [\[0114\]](#)
- An, G. in Agrobacterium Protocols, Methods in Molecular Biology, Band 44, S. 47–62, Gartland KMA und MR Davey, Hrsg., Humana Press, Totowa, New Jersey [\[0118\]](#)
- Ishida et al., 1996, Nature Biotech. 14: 745–50 [\[0126\]](#)

Patentansprüche

1. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine tRNA 2'-Phosphotransferase kodiert, transformiert ist.
2. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für eine CDC2-Proteinkinase kodiert, transformiert ist.
3. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein mit leucinreichen Repeats kodiert, transformiert ist.
4. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Ran-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist.
5. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Plastidenteilungsprotein kodiert, transformiert ist.
6. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Mitochondriensubstratträgerprotein für ein kodiert, transformiert ist.
7. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MADS-box-Protein kodiert, transformiert ist.
8. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Adenosinkinase-1-Protein kodiert, transformiert ist.
9. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Zinkfinger-6-Protein kodiert, transformiert ist.
10. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Protein einer regulatorischen Untereinheit der cyclinabhängigen Kinase kodiert, transformiert ist.
11. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein Zinkfinger-7-Protein kodiert, transformiert ist.
12. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für ein MAR-Bindungsprotein kodiert, transformiert ist.
13. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein LRP-2-Protein kodiert, transformiert ist.
14. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Phytochrom-Proteinkinase-Protein kodiert, transformiert ist.
15. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Synaptobrevin-Protein kodiert, transformiert ist.
16. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Calcineurin-B-Protein kodiert, transformiert ist.
17. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Caleosin-Protein kodiert, transformiert ist.
18. Transgene Pflanzenzelle oder transgene Pflanze, die mit einer Expressionskassette umfassend ein Polynukleotid, das für ein Histondeacetylase-Protein kodiert, transformiert ist.
19. Isoliertes Polynukleotid mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
 - (a) Nukleinsäuremolekül umfassend eine Polynukleotidsequenz gemäß Tabelle 1 oder Tabelle 2;
 - (b) Nukleinsäuremolekül, das für ein Polypeptid mit mindestens 50% Identität zu der Aminosäuresequenz des

von dem Nukleinsäuremolekül gemäß (a) kodierten Polypeptids aufweist, kodiert; und
(c) Nukleinsäuremolekül, das mit einem Nukleinsäuremolekül gemäß (a) bis (b) unter stringenten Hybridisierungsbedingungen hybridisiert.

20. Isoliertes Polypeptid mit einer Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
(a) Polypeptidsequenzen gemäß Tabelle 1; und
(b) Polypeptid mit mindestens 50% Identität zu der Polypeptidsequenz gemäß (a).

21. Verfahren für die Herstellung einer transgenen Pflanze umfassend mindestens ein Polynukleotid nach Anspruch 19, wobei die Expression des Polynukleotids in der Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze bei dieser Pflanze zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß führt, umfassend die folgenden Schritte:

(a) Einführen eines Expressionsvektors umfassend mindestens ein Polynukleotid nach Anspruch 19 in eine Pflanzenzelle, und

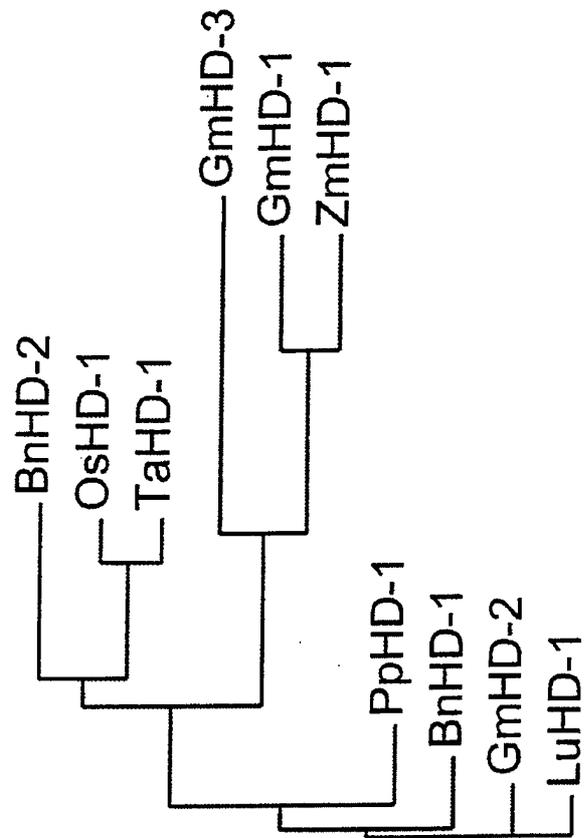
(b) Erzeugen einer transgenen Pflanze, die das Polynukleotid exprimiert, aus der Pflanzenzelle, wobei die Expression des Polynukleotids in der transgenen Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze bei dieser Pflanze zu einem erhöhten Wachstum und/oder einem erhöhten Ertrag unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Umweltstreß führt.

22. Verfahren zur Erhöhung des Wachstums und/oder des Ertrags einer Pflanze unter normalen Bedingungen oder unter wasserlimitierten Bedingungen und/oder zum Erhöhen der Toleranz einer Pflanze gegenüber einem Umweltstreß, umfassend die Schritte des Erhöhens der Expression von mindestens einem Polynukleotid nach Anspruch 19 in der Pflanze.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1



FIGUR 2A

BN50000854	(1)	-----METDESG-----VSLASGPDGKRRRVSIFYEPTI
BN51361834	(1)	-----MRSKDKISIFYDGDV
EST468	(1)	-----MPVKDRISIFYDGDV
GM49753757	(1)	-----MRSKDRIAIFYDGDV
GM50270592	(1)	MHLLKFPSPSSFGNAFFLVGHHVLDLRVFRKNQRCFRASISCSAVRNGSIEQLSDARLIYSVAP
GM59700314	(1)	-----MLKHDGTNGVFDTGMDP
LU61552369	(1)	-----MKSCKDISIFYDGDV
os34631911	(1)	-----MDASAGGGNSLPTAGADGAKRRVCIFYDAEV
ta60089198	(1)	-----MDISAGGGNSLPTTAGADGSKRRVCIFYDAEV
zm59324542	(1)	-----MLAHADAGRGVFDSGRDP
BN50000854	(30)	GNYYYGQGHMPKPHRIRMAHSLIVHYNLHRRLL-----EISRPYLADAADIGRFHSPSEYVDFLRS
BN51361834	(16)	GSVYFGPNHPMKPHRLCMTHTHLILAYGLHMKM-----EYRPHKAYPIEMAQFHSADYVEFLQR
EST468	(16)	GSVYFGPNHPMKPHRLCMTNSLVLAYGLHMKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSADYVEFLGR
GM49753757	(16)	GSVYFGAKHPMKPHRLCMTHTHLVLSYDLHKKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSADYVEFLNR
GM50270592	(66)	SMGHNOESHPESHFRVPAIVNALLEEMOLTSKFRGPEVIELQHFEPASVDDIASVHARAYVSGLEK
GM59700314	(18)	GFLEVLKHPENS DRVKNLVSILKRGPISPYI-----SWHLGTPAKIPELFSFHTPEYINELVE
LU61552369	(16)	GSVYFGPNHPMKPHRLCMTHTHLVLSYDLHKKM-----EYRPHKAYPVELAQFHSADYVEFLHR
os34631911	(33)	GNYYYGQGHMPKPHRIRMTHTALLAHYGLLDQM-----QVLKPHPARDRDLCRFHADDDYVAFLRS
ta60089198	(33)	GNYYYGQGHMPKPHRIRMTHTALLAHYGLLDQM-----QVLKPHPARDRDLCRFHADDDYVAFLRS
zm59324542	(18)	GFLDVLDQHPENADRVRNMVSIILRRGPIAHFL-----SWHSGRPAHASELLSFHSSEYIEELVQ
BN50000854	(89)	VSPESVGDSSARNLRRFNVGEDCPVFDGLFEFCRASAGGSI GAAVKLN-----QDADIAINWGG
BN51361834	(75)	INPENKDL-FPNEMARYNLGEDCPVFDGLFEFCQIYAGATIDAARRLN-----KLCIDIAINWAG
EST468	(75)	ITPESQEK-YAAELIRYNMGEDCPVFDNLFEFCQIYAGGTIDAARLN-----GLCDIAINWAG
GM49753757	(75)	ITPDTQHL-FLNELTKYNLGEDCPVFDNLFEFCQIYAGGTIDAARRLN-----QLCDIAINWAG
GM50270592	(131)	VMDQAVEKGLIFLDG-----SGPTYATATTFQESIVAAGAGLALVDSVACSKIKGDAPTGFALIR
GM59700314	(77)	VDKEGKQ-----LCGGTFLNPGSMDAALLAAGTILSAMKHLN-----GDGKVSYALVR
LU61552369	(75)	ITPDTQHL-YRTDLARYNLGEDCPVFDGLYFQIYAGGTIDAARRLN-----QLCDIAINWAG
os34631911	(92)	VTPETQQD-QIRALKRFNVGEDCPVFDGLYFQIYAGGTIDAARRLN-----HGHDIAINWAG
ta60089198	(92)	VTPETQQD-QIRALKRFNVGEDCPVFDGLYFQIYAGGTIDAARRLN-----HGHDIAINWAG
zm59324542	(77)	TNATGAKK-----K-LCEGTFLNPGSWGAAALLAAGTILSSAKHILD-----GQGNLAYALVR

Figur 2B

BN50000854	G-LHHAKKSEASGFCYVNDIVLGLILELLKM--FRRLVYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(149)	G-LHHAKKSEASGFCYVNDIVLGLILELLKM--FRRLVYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
BN51361834	G-LHHAKKCDASGFCYINDLVLGLILELLKH--HPRVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(134)	G-LHHAKKCDASGFCYINDLVLGLILELLKH--HPRVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
EST468	G-LHHAKKCEASGFCYVNDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(134)	G-LHHAKKCEASGFCYVNDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
GM49753757	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(134)	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
GM50270592	PPGHAVPQPMGFCIFGNVAIAARYSORVHGLKRVIIDFDVHHGNGTDAFYDDDPDVFFLSFH	(192)	PPGHAVPQPMGFCIFGNVAIAARYSORVHGLKRVIIDFDVHHGNGTDAFYDDDPDVFFLSFH
GM59700314	PPGHHAQPSLADGYCFLNAGLAVQLALDSG--CKKVAVIDIDVHYGNGTAEGFYRSNKVLTISLH	(127)	PPGHHAQPSLADGYCFLNAGLAVQLALDSG--CKKVAVIDIDVHYGNGTAEGFYRSNKVLTISLH
LU61552369	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(134)	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
os34631911	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(150)	G-LHHAKKCEASGFCYINDLVLGLILELLKY--HARVLYIDIDVHHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
ta60089198	G-LHHAKKCEASGFCYVNDIVLGLILELLKY--HQRVLYVDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH	(150)	G-LHHAKKCEASGFCYVNDIVLGLILELLKY--HQRVLYVDIDIHGDGVEEAFYTTDRVMTVSFH
zm59324542	PPGHHAQPDHADGYCFLNAGLAVQLALDSG--RAKVAVVDIDVHYGNGTAEGEFYRTDVTLTMSLH	(128)	PPGHHAQPDHADGYCFLNAGLAVQLALDSG--RAKVAVVDIDVHYGNGTAEGEFYRTDVTLTMSLH
BN50000854	KFGD----FFPGTGHIRDVGAEGKYYALNVPLNDGMDDSEFRSLFRPLIQKVMVEYRPEAVVLQ	(211)	KFGD----FFPGTGHIRDVGAEGKYYALNVPLNDGMDDSEFRSLFRPLIQKVMVEYRPEAVVLQ
BN51361834	KFGDK----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSFNRLFRAIISKVVEIYQPGAIVLQ	(196)	KFGDK----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSFNRLFRAIISKVVEIYQPGAIVLQ
EST468	KFGDY----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLKDGIDANFIRMFVRVVIQKVVVEYQPGAIVLQ	(196)	KFGDY----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLKDGIDANFIRMFVRVVIQKVVVEYQPGAIVLQ
GM49753757	KYGDS----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLKDGIDDSFTRLFKTIISKVVEYQPGAIVLQ	(196)	KYGDS----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLKDGIDDSFTRLFKTIISKVVEYQPGAIVLQ
GM50270592	QDGS----YPGTGKDFVSGDGEETLNLPLPGSSGDTAIRTVFDEVIVPCAQRFPKPDIIILVS	(257)	QDGS----YPGTGKDFVSGDGEETLNLPLPGSSGDTAIRTVFDEVIVPCAQRFPKPDIIILVS
GM59700314	MNHGSWGPSPQSGSVDELGEGYGENLNIPLPNGTGDVGYVHAFNELVPSIQKFGPDMIVLV	(191)	MNHGSWGPSPQSGSVDELGEGYGENLNIPLPNGTGDVGYVHAFNELVPSIQKFGPDMIVLV
LU61552369	KFGDL----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSFNRLFKTIISKVVEIYQPGAIVLQ	(196)	KFGDL----FFPGTGDVKEIGEREGKFYAINVPLRDGIDDSFNRLFKTIISKVVEIYQPGAIVLQ
os34631911	KFGD----YFPGTGDIRDIGHGSKGKYSLNVPLDDGIDDESYSQSLFKPIMGKVMVEFRPGAVVLQ	(212)	KFGD----YFPGTGDIRDIGHGSKGKYSLNVPLDDGIDDESYSQSLFKPIMGKVMVEFRPGAVVLQ
ta60089198	KFGD----YFPGTGDIRDIGHGSKGKYSLNVPLDDGIDDESYSQSLFKPIMGKVMVEFRPGAVVLQ	(212)	KFGD----YFPGTGDIRDIGHGSKGKYSLNVPLDDGIDDESYSQSLFKPIMGKVMVEFRPGAVVLQ
zm59324542	MMHGSWGPSPQSGSVDEIGEGKGLGYNLNIPLPNGSGDAGEYAMNELVPSIDKFPQQLLFLV	(192)	MMHGSWGPSPQSGSVDEIGEGKGLGYNLNIPLPNGSGDAGEYAMNELVPSIDKFPQQLLFLV
Consensus	KFGD FFPGTGDVKEIGE EGKYAALNVPL DGIDSSSF LFK II KVVEIFQPGAIVLQ	(261)	KFGD FFPGTGDVKEIGE EGKYAALNVPL DGIDSSSF LFK II KVVEIFQPGAIVLQ
BN50000854	CGADSLSGDRLLGCFNLSVKGHADCLRFLRSYN-----VPLMVLGGGGYTI RNVARCWCYETAVAV	(272)	CGADSLSGDRLLGCFNLSVKGHADCLRFLRSYN-----VPLMVLGGGGYTI RNVARCWCYETAVAV
BN51361834	CGADSLARDRLGCFNLSIDGHAECVKFVKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGILL	(258)	CGADSLARDRLGCFNLSIDGHAECVKFVKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGILL
EST468	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHSECVKFKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV	(258)	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHSECVKFKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV
GM49753757	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHAECVSVFKRFN-----LPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV	(258)	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHAECVSVFKRFN-----LPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV
GM50270592	AGYDGHVLDPLANLQYTTGYMYLASSIKQLAKDLCCGRCVFFLEGGYNLKSLSYSVADTFRALL	(317)	AGYDGHVLDPLANLQYTTGYMYLASSIKQLAKDLCCGRCVFFLEGGYNLKSLSYSVADTFRALL
GM59700314	LGQDSNAFDPNGRQCITMEGYREIGRIVHLLAKRHSAGRLLIVQEGGYHVITYSAYCLHATLEGIL	(256)	LGQDSNAFDPNGRQCITMEGYREIGRIVHLLAKRHSAGRLLIVQEGGYHVITYSAYCLHATLEGIL
LU61552369	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHAECVKFVKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV	(258)	CGADSLAGDRLLGCFNLSIDGHAECVKFVKFFN-----IPLLVTTGGGGYTKENVARCWTVETGVLV
os34631911	CGADSLSGDRLLGCFNLSIRGHAECVRFMRFSN-----VPLLVLLGGGGYTI RNVARCWCYETGVAL	(273)	CGADSLSGDRLLGCFNLSIRGHAECVRFMRFSN-----VPLLVLLGGGGYTI RNVARCWCYETGVAL
ta60089198	CGADSLSGDRLLGCFNLSIKGHAECVRFMRFSN-----VPLLVLLGGGGYTI RNVARCWCYETGVAL	(273)	CGADSLSGDRLLGCFNLSIKGHAECVRFMRFSN-----VPLLVLLGGGGYTI RNVARCWCYETGVAL
zm59324542	VGQDSSAFDPNGRQCITMEGYRKIGQIMRRRLADRHNCNGQILVVQEGGYHITYSAYCLHATLEGVL	(257)	VGQDSSAFDPNGRQCITMEGYRKIGQIMRRRLADRHNCNGQILVVQEGGYHITYSAYCLHATLEGVL

Figur 2C

BN500000854	(332)	GVEPDNKLPHYNEIFYFGPDYTLHVEPG-PMENLNTPKMERIRNTLLEQLSGLIHAPSVPFQHT
BN51361834	(318)	DTELPNEIPDNDYIKYFGPDYSLKIPGG-HIENLNTKSYISTIKAQILDNLRYSIQHAPSVMQEV
EST468	(318)	DTELPNEIPDNDYIKYFKPDCITIKTTSGNHMLNCKTYLSTIKQQVMENLRRIAHAPSVMHEV
GM49753757	(318)	DTELPNEIPQNDYIKYFAPEFSLKVPNG-PIENLNSKSYLSTIKMQVLENLRCIQHAPSVMQEV
GM50270592	(382)	GDRSLASEFDNPNILYEEPSTVKQAIQIKIHSL
GM59700314	(321)	NLPMPLLADPIAFT
LU61552369	(318)	DTELPNEIPENEYIKYFGPDYTLKIPSR-YIENLNSKSYLSSLKQVMENLRYIQHAPSVMQEV
os34631911	(333)	GHELTDKMPFNEYFEYFGPDYTLHVAPS-NMENKNTROQLDDIRSRLLDNLSKLRHAPSVMQEV
ta60089198	(333)	GHELTDKMPLNEHYEYFGPDYTLHVAPS-NMENKNTHRHLDEIRSRLLLENLTKLRHAPSVMQEV
zm593224542	(322)	DLEAPLLDDPIAYYPED-DKYTMKVVDMIKSYWKESVPFLKEI
BN500000854	(396)	PPVNRVLDEPEE-----DLEKR---PKPRIWSGTANYESDSDDDDEKP
BN51361834	(382)	PPDFYIPDFDEDERNP-----DVRVQSRDKQIQRDDEYFDGDKDNDAS-
EST468	(383)	PPDTYIPEFDEDELNP-----DERMDQHTQDKHIQREEEYEDDNDNDHDM
GM49753757	(382)	PPDFYIPEFDEEQNP-----DERIDQHTQDKHIQRDDEYDGDNDNDQMN
GM50270592	(418)	-----
GM59700314	(335)	-----
LU61552369	(382)	PPDFYIPDFDEEQNP-----DERMDQHTRDQVQRDDEYDGDNDNDPPTD
os34631911	(397)	PPEAEQPEQDEQEDPDERHHADSDVEMDDVKPLDDSGRRSSIQNVRVKRESAETDAA-DQDGNR
ta60089198	(397)	PPEAEQPEQDEQENPDERHHADSDVEMDDAKPLEDSERRTSTQGARVKRESAETEVTDDQDNG
zm593224542	(364)	-----
BN500000854	(435)	LGGFSGING-PTMDRDRSTGEDEMEDDSAEPEVDPSS-----
BN51361834	(427)	-----
EST468	(429)	DDS-----
GM49753757	(428)	IS-----
GM50270592	(418)	-----
GM59700314	(335)	-----
LU61552369	(428)	RS-----
os34631911	(461)	VAAENTKGTPEAADGVGSSKQTFVPTDASAMAIDEPGSLKVEPPDNSKQLQDQPSVHQKT-
ta60089198	(462)	VASEQVRGPEFVADGVGSSKQNPPIIDASPMADIGPAVVAEPEPERSNKLQEQQALHQKP-
zm593224542	(364)	-----