

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
2. September 2004 (02.09.2004)

PCT

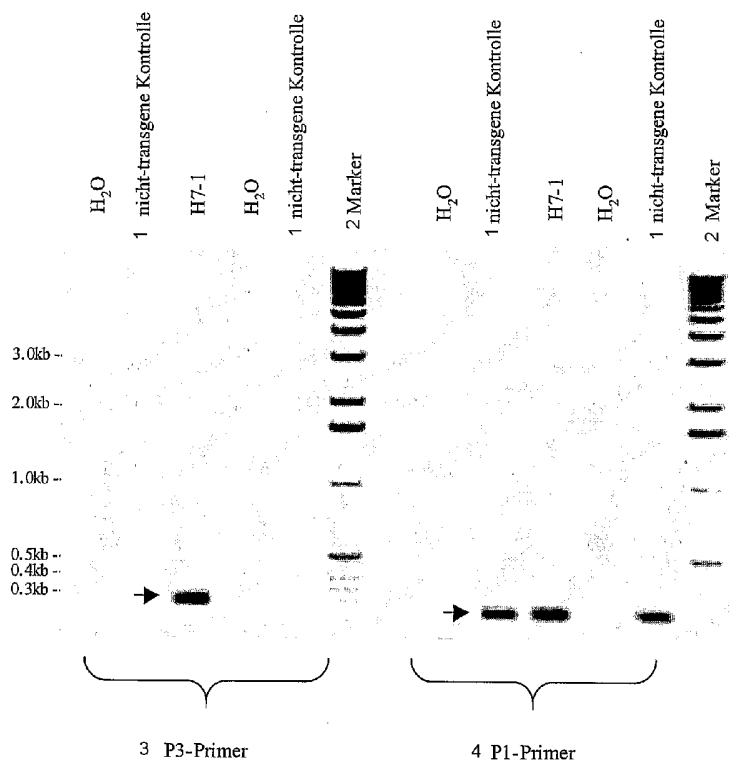
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/074492 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82, A01H 5/00, C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/001469
- (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Februar 2004 (17.02.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
03003866.5 20. Februar 2003 (20.02.2003) EP
10/376,763 28. Februar 2003 (28.02.2003) US
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): KWS SAAT AG [DE/DE]; Grimsehlstrasse 31, D-37555 Einbeck (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRAUS, Josef [DE/DE]; Negenborner Weg 8, D-37574 Einbeck (DE). SAUERBREY, Elke [DE/DE]; Beverstrasse 11, D-37574 Einbeck (DE). NEHLS, Reinhard [DE/DE]; Theodor-Heuss-Weg 44, D-37574 Einbeck (DE). LOOCK, Andreas [DE/DE]; Molderamweg 10, D-37574 Einbeck (DE). JANSEN, Rudolf [DE/DE]; Hölderlinstrasse 8, D-37574 Einbeck (DE).
- (74) Anwalt: POHL, Manfred; Kirchenhang 32b, D-21073 Hamburg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: GLYPHOSATE TOLERANT SUGAR BEET

(54) Bezeichnung: GLYPHOSAT-TOLERANTE ZUCKERRÜBE



1... NON TRANSGENIC CONTROL SAMPLE
2... MARKER
3... P3 PRIMER
4... P1 PRIMER

(57) Abstract: The invention relates to sugar beet-like glyphosate tolerant vegetables, vegetable material and seeds. The aim of said invention is to prepare a transgenic event for a sugar beet having a high-degree tolerance with respect to glyphosate and preserving other important agronomic properties in terms of growth, yield, quality and a pathogenic resistance, etc.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanzen, Pflanzenmaterial und Samen. Aufgabe der Erfindung ist es, ein transgenes Zuckerrübenpflanzen-Event bereitzustellen, das eine hohe Toleranz gegenüber Glyphosat aufweist, aber nicht in anderen wichtigen agronomischen Eigenschaften wie Wachstum, Ertrag, Qualität, Pathogenresistenz etc. beeinträchtigt ist.

WO 2004/074492 A1



FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

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

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

— mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung

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

- 1 -

GLYPHOSAT-TOLERANTE ZUCKERRÜBE

BESCHREIBUNG

- 5 Die Erfindung betrifft Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanzen, Pflanzenmaterial und Samen.

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) wird in vielen Ländern als kommerziell genutzte Kulturpflanze angebaut, mit einem Ge-
10 samtertrag von über 240 Millionen metrischen Tonnen.

N-(Phosphonomethyl)-Glycin, allgemein als Glyphosat bezeichnet, ist ein Breitband-Herbizid, das aufgrund seiner hohen Wirksamkeit, biologischen Abbaubarkeit und geringen Toxizität
15 gegenüber Tieren und Menschen breite Anwendung gefunden hat. Glyphosat hemmt den Shikimisäure-Weg, der zur Synthese von aromatischen Verbindungen, einschließlich Aminosäuren und Vitaminen, führt. Insbesondere hemmt Glyphosat die Umsetzung von Phosphoenolbrenztraubensäure und Shikimat-3-phosphat zu
20 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-phosphat durch Hemmung des Enzyms 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP-Synthase oder EPSPS). Wenn konventionelle Pflanzen mit Glyphosat behandelt werden, können die Pflanzen die zum Wachstum und Überleben erforderlichen aromatischen Aminosäuren (z. B. Phenylalanin
25 und Tyrosin) nicht herstellen. EPSPS ist in allen Pflanzen, Bakterien und Pilzen vorhanden. In Tieren, die ihre aromatischen Aminosäuren nicht selbst synthetisieren, kommt es nicht vor. Da der Biosynthese-Weg für aromatische Aminosäuren in Säugetieren, Vögeln oder aquatischen Lebensformen nicht vor-
30 handen ist, besitzt Glyphosat, wenn überhaupt, eine nur geringe Toxizität für diese Organismen. Das EPSPS-Enzym ist na-

- 2 -

türlicherweise in Nahrungsmitteln von pflanzlicher und mikrobieller Herkunft enthalten.

Glyphosat ist der wirksame Bestandteil von Herbiziden wie
5 beispielsweise Roundup[®], hergestellt durch Monsanto Company, USA. Üblicherweise wird es als wasserlösliches Salz wie beispielsweise ein Ammonium-, Alkylamin-, Alkalimetall- oder Trimethylsulfoniumsalz formuliert. Eine der gebräuchlichsten Formulierungen ist das Isopropylaminsalz von Glyphosat, welches die in dem Roundup[®]-Herbizid eingesetzte Form ist.
10

Es ist gezeigt worden, daß Glyphosat-tolerante Pflanzen hergestellt werden können, indem man die Fähigkeit, eine Glyphosat-tolerante EPSP-Synthase, z. B. die CP4-EPSPS aus Agrobacterium sp. Stamm CP4AcO, zu bilden, in das Genom der Pflanze
15 einbaut.

Eine Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanzen kann durch Agrobakterium-vermittelte Transformation, bei der ein Gen, das
20 für eine Glyphosat-tolerante EPSPS wie CP4-EPSPS kodiert, in das Pflanzengenom eingeführt wird, hergestellt werden. Solch eine Zuckerrübenpflanze, die CP4-EPSPS exprimiert, ist in der WO 99/23232 beschrieben worden. Zuckerrübenpflanzen, die aus Zellen angezogen wurden, die mit dem Gen für CP4-EPSPS in
25 dieser Weise transformiert wurden, unterscheiden sich jedoch weitgehend in ihren Eigenschaften, was auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß das Gen an einer zufälligen Stelle in das Pflanzengenom inseriert wird. Die Insertion eines bestimmten Transgens an einem bestimmten Ort auf einem Chromo-
30 somen wird oftmals als "Event" bezeichnet. Der Begriff "Event" wird auch verwendet, um gentechnisch veränderte Anbaupflanzensorten zu unterscheiden. Erwünschte Events sind

- 3 -

sehr selten. Die meisten Events werden verworfen, weil das Transgen in ein für das Wachstum wichtiges Pflanzengen mit der Folge eingebaut wird, daß dieses unterbrochen und nicht exprimiert wird, oder das Transgen in einen Abschnitt des Chromosoms eingebaut wurde, der eine Expression des Transgens nicht oder eine zu schwache Expression zuläßt. Aus diesem Grunde ist es erforderlich, eine große Anzahl von Events zu überprüfen, um ein Event zu identifizieren, das durch eine ausreichende Expression des eingeführten Gen gekennzeichnet ist. Dieses Verfahren ist sehr zeit- und kostenaufwendig, und es ist in keiner Weise garantiert, daß eine Pflanze mit zufriedenstellenden Eigenschaften gefunden wird.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Zuckerrübenpflanze bereitzustellen, die ein hohes Toleranzniveau gegenüber Glyphosat zeigt, aber keine Nachteile in bezug auf andere wichtige agronomische Eigenschaften wie beispielsweise Wachstum, Ertrag, Qualität, Pathogenresistenz etc. aufweist.

20

Die erfindungsgemäße Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze ist dadurch gekennzeichnet, daß

- a) die Zuckerrübenpflanze aus Samen erhalten wird, der bei der NCIMB, Aberdeen (Schottland, V.K.) unter der Zugangsnummer NCIMB 41158 oder NCIMB 41159 hinterlegt wurde, und/oder
- b) ein DNA-Fragment von 630-700 bp, bevorzugt 664 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 2 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder

- 4 -

c) ein DNA-Fragment von 3500-3900, bevorzugt 3706 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 3 aufweist, und einem
5 zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 4 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder

d) ein DNA-Fragment von 270-300 bp, bevorzugt 288 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer,
10 der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 7 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 8 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder

e) ein DNA-Fragment aus 710-790 bp, bevorzugt 751 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer,
15 der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 9 aufweist, und einem zweiten Primer, der die SEQ ID NO: 10 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder

f) ein DNA-Fragment von 990-1100 bp, bevorzugt 1042 bp, von
20 der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 14 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 16 aufweist, amplifiziert werden kann.

25 Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine gut bekannte Standardmethode, die zur Amplifizierung von Nukleinsäuremolekülen verwendet wird (siehe zum Beispiel US 4,683,202).

30 Die erfindungsgemäße Zuckerrübenpflanze (im folgenden als "Event H7-1" bezeichnet) weist eine hohe Toleranz gegenüber Glyphosat-Herbiziden auf. Darüber hinaus sind die Wachstum-

- 5 -

seigenschaften und andere agronomische Eigenschaften des Events H7-1 durch den Transformationsvorgang nicht beeinträchtigt. Event H7-1 exprimiert das Agrobakterium-CP4-EPSPS-Gen, das stabil in das Pflanzengenom integriert ist und der Pflanze Glyphosat-Toleranz vermittelt, auf hohem Niveau. Die Pflanze wurde hergestellt durch Agrobakterium-vermittelte Transformationstechnik unter Verwendung des binären Vektors PV-BVGT08. Dieser Vektor enthielt zwischen der linken und rechten Grenzregion ("Border"-Region) die folgenden Sequenzen: eine kodierende Region, bestehend aus einer für ein Chloroplasten-Transitpeptid kodierenden Sequenz von der EPSPS aus *Arabidopsis thaliana* (bezeichnet als *ctp2*), angefügt an die kodierende Sequenz der CP4-EPSPS und unter der Regulation des Braunwurz-Mosaik-Virus (*Figwort mosaic virus*)-Promotors (pFMV) und der E9-3'-Transkriptionsterminatorsequenz aus *Pisum sativum*.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weisen die 3706-bp-, 664-bp-, 288-bp-, 751-bp- und 1024-bp-DNA-Fragmente mindestens 95%, bevorzugt mindestens 99%, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit den Nukleotidsequenzen der SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 oder SEQ ID NO: 17 auf. 95% Identität bedeutet beispielsweise, daß 95% der Nukleotide einer gegebenen Sequenz mit der verglichenen Sequenz identisch sind. Zu diesem Zweck können die Sequenzen mit Hilfe des Programms BLAST ausgerichtet und verglichen werden (beispielsweise verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). Am meisten bevorzugt weist das 3706-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 6, das 664-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 13, das 288-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 11, das 751-bp-DNA-Fragment

- 6 -

die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 12 und/oder das 1042-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 17 auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Samen, hinterlegt bei
5 der NCIMB, Aberdeen (Schottland, V.K.), unter der Zugangsnummer NCIMB 41158 oder NCIMB 41159. Solcher Samen kann verwendet werden, um eine Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze zu erhalten. Der Samen kann ausgesät werden und die heranwachsende Pflanze wird Glyphosat-tolerant sein.

10

Die Erfindung betrifft auch eine Zelle, Gewebe oder Teile einer Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in einem Verfahren zur Identifizierung einer Glyphosat-toleranten
15 Zuckerrübenpflanze, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren den/die Schritt(e) umfaßt des

a) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 630-700 bp, bevorzugt 664 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze,
20 Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 2 aufweist, und/oder

b) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 3500-3900 bp, bevorzugt 3706 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der
25 SEQ ID NO: 3 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 4 aufweist, und/oder

30 c) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 270-300 bp, bevorzugt 288 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit

- 7 -

einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 7 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 8 aufweist, und/oder

5 d) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 710-790 bp, bevorzugt 751 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 9 aufweist, und einem zweiten Primer, der die SEQ ID NO: 10 aufweist, und/oder

10 e) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 990-1100 bp, bevorzugt 1042 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 14 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 16
15 aufweist.

Das Verfahren erlaubt die Detektion einer transgenen Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze mit Hilfe von Standardmethoden der Molekularbiologie.

20

Die Erfindung betrifft darüber hinaus einen Test-Kit zur Identifizierung einer transgenen Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze oder deren Zellen, Gewebe oder Teile. Der Kit umfaßt mindestens ein Primer-Paar mit einem ersten und einem
25 zweiten Primer für die Polymerasekettenreaktion, die es ermöglichen, Event H7-1, dessen Zellen, Gewebe oder Teile, spezifisch nachzuweisen.

Bevorzugt weist der erste Primer die Nukleotidsequenz der SEQ
30 ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 9 oder SEQ ID NO: 14 auf, und der zweite Primer weist bevorzugt die Nukleo-

- 8 -

tidsequenz der SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 8 oder SEQ ID NO:
10 oder SEQ ID NO: 16 auf.

Bei einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung
5 erkennen der erste und zweite Primer jeweils eine Nukleo-
tidsequenz, die einen Teil der Nukleotidsequenz der SEQ ID
NO: 5 bildet.

Die folgenden Figuren dienen zur Erläuterung der Erfindung.
10 Es zeigt:

Fig. 1 Eine Karte des binären Vektors und PV-BVGT08.

Fig. 2 Die Identifizierung von H7-1 durch PCR-Analyse. DNA-
15 Proben von 18 Pflanzen wurden analysiert. Neg.-Kontrolle =
DNA aus nicht-transformierter Zuckerrübe; Pos.-Kontrolle =
DNA aus der Original-H7-1-Transformante.

Fig. 3 Die Identifizierung von Event H7-1 durch Multiplex-PCR
20 und Unterscheidung zwischen transgenem Event H7-1 und nicht-
transgenen Pflanzen. DNA-Proben aus 54 Pflanzen wurden analy-
siert.

Fig. 4 Das pFMV-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3'-Insert mit Schnittstel-
25 len der Restriktionsenzyme HindIII, XbaI, ClaI, PstI und Bam-
HI.

Fig. 5 Insert-/Kopienzahl-Analyse für Event H7-1. Für die
Southern-Blot-Analyse wurden 10 µg genomische DNA von H7-1
30 mit PstI, HindIII, XbaI, ClaI und BamHI verdaut (Spur 3 bis
7). Nicht-transformierte genomische DNA als Negativkontrolle
wurde mit BamHI verdaut (Spur 8). Plasmid PV-BVGT08 als Posi-

- 9 -

tivkontrolle wurde mit BamHI verdaut. Die Spuren 2 und 9 repräsentieren Größenmarker. Der Blot wurde mit einer ³²P-markierten kodierenden Regionen von CP4-EPSPS sondiert. Die Sonde ist eine interne Sequenz des CP4-EPSPS-Gens, umfassend die Basenpaare 447 bis 1055.

Fig. 6 Southern-Blot-Analyse von H7-1 zur Ermittlung der Intaktheit der kodierenden Region der ctp2-CP4-EPSPS. 10 µg genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA und nicht-transgene Kontroll-DNA, gemischt mit PV-BVGT08, wurden mit XbaI und HindIII/BamHI verdaut. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten CP4-EPSPS-PCR-Fragment sondiert.

Fig. 7 Southern-Blot-Analyse von Event H7-1 zur Ermittlung der Intaktheit der Promotorregion. 10 µg genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA und nicht-transgene Kontroll-DNA, gemischt mit PV-BVGT08, wurden mit HindIII, XbaI und SacI/XhoI verdaut. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierte Promotor-Fragment (HindIII) (=PV-BVGT08-Sequenz, Bp 7972-8583) oder der vollständigen Promotor-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3'-Kassette (PmeI/XhoI) (=PV-BVGT08-Sequenz, Bp 7935-2389) sondiert.

Fig. 8 Southern-Blot-Analyse von Event H7-1 zur Ermittlung der Intaktheit der polyadenylierten(Poly-A-)Region. 10 µg genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA und nicht-transgene Kontroll-DNA, gemischt mit PV-BVGT08, wurden mit EcoRI/PstI, XbaI, HindIII und PstI verdaut. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten Poly-A-Fragment (BamHI/XhoI) (=PV-BVGT08-Sequenz, Bp 1702-2389) sondiert.

Fig. 9. Als Sonden zur Feststellung der Abwesenheit von "Backbone"-Vektor-DNA in Event H7-1 verwendete Fragmente.

- 10 -

Fig. 10 Southern-Blot-Analyse von Event H7-1 zur Feststellung der Abwesenheit von "Backbone"-DNA in Event H7-1. 10 µg genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA und nicht-transgene Kontroll-DNA, gemischt mit PV-BVGT08, wurden mit XbaI verdaut. Der Blot wurde mit einem ³²P-markierten Fragment, das das vollständige "Backbone" von PV-BVGT08 (Sonde 1-4) umfaßt, sondiert.

10 Fig. 11 Vergleich zwischen den PCR-Fragmenten und den PV-BVGT08-Sequenzen in der linken Grenzregion (left border, LB).

Fig. 12 Vergleich zwischen den PCR-Fragmenten und den PV-BVGT08-Sequenzen in der rechten Grenzregion (right border, 15 RB).

Fig. 13 Analyse der genomischen DNA außerhalb der rechten Verbindungsstelle des Inserts. Ungefähr jeweils 50 ng genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA oder Wasser wurden für PCR-Reaktionen mit der Primer-Kombinationen P1, bei der beide Primer außerhalb des Inserts lokalisiert sind, und P3, bei der ein Primer innerhalb des Inserts lokalisiert ist und der andere Primer außerhalb des Insert liegt, verwendet.

25

Fig. 14 Analyse der genomischen DNA außerhalb der linken Verbindungsstelle des Inserts. Ungefähr 50 ng genomische DNA von H7-1, nicht-transgene Kontroll-DNA und Wasser wurden für PCR-Reaktionen mit der Primer-Kombinationen P2, bei der beide Primer außerhalb des Inserts lokalisiert sind, und P4, bei der ein Primer innerhalb des Inserts lokalisiert ist und der andere Primer außerhalb des Insert liegt, verwendet.

30

Fig. 15 Abstammungskarte zu H7-1 Saatkulturen.

Fig. 16 Southern-Blot-Analyse von Event H7-1, um zu ermit-
 5 teln, ob die eingefügte DNA stabil in das Genom integriert
 ist. 10 μ g genomische DNA von H7-1 (der ursprüngliche Trans-
 formant H-7-1-1995 und drei Nachkommen, H7-1-1996 bis 1998)
 und nicht-transgene Kontroll-DNAs von verschiedener Herkunft
 wurden mit BamHI, XbaI und HindIII verdaut. Der Blot wurde
 10 mit einer 32 P-markierten CP4-EPSPS-Sonde von PV-BVGT08 (= Bp
 447-1555) untersucht.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von ausgewählten Bei-
 spielen näher erläutert.

15

Eine Liste von Abkürzungen ist unten wiedergegeben:

~	ungefähr
°C	Grad Celsius
20 bidest	doppelt destilliertes steriles Wasser
bp	Basenpaar(e)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
25 EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fig.	Figur
h	Stunde
HCl	Salzsäure
kb	Kilobasenpaar(e)
30 kg	Kilogramm
M, mM,	molar, millimolar
min	Minuten

- 12 -

	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄	Natriumphosphat
	NaCl	Natriumchlorid
	NaOH	Natriumhydroxid
	nt	Nukleotide
5	PCR	Polymerasekettenreaktion
	pmol	Picomol
	RNase	Ribonukleinsäure-Nuklease
	UPM	Umdrehungen pro Minute
	RR	Roundup Ready [®]
10	RT	Raumtemperatur
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	sek	Sekunde
	SEVAG	Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)
	SSC	standard saline citrate
15	TE	Tris-EDTA-Puffer
	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

BEISPIEL 1: Identifizierung von Event H7-1

20

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) vom Genotyp 3S0057 ist in einer Weise genetisch verändert, daß sie eine CP4-5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-phosphat-Synthase oder CP4-EPSPS exprimiert, die Toleranz gegenüber dem Herbizid Glyphosat vermittelt und auch als selektierbarer Marker verwendet wird. Diese transgene Linie wurde durch Agrobakterium-tumefaciens-vermittelte Transformationstechnologie unter Verwendung des binären Vektors PV-BVGT08 hergestellt. Die T-DNA des für die Zuckerrüben-Transformation verwendeten Vektors enthielt zwischen der linken und der rechten Grenzregion die folgenden Sequenzen: eine kodierende Region, zusammengesetzt aus einer für ein Chloroplasten-Transitpeptid kodierenden Sequenz aus

30

- 13 -

der EPSPS aus *Arabidopsis-thaliana* (bezeichnet als *ctp2*), fusioniert mit der kodierenden Sequenz für CP4-EPSPS und unter Regulation des 35S-Braunwurz-Mosaik-Virus (*Figwort mosaic virus*)-Promotors (pFMV) und der 3'-Transkriptionsterminatorsequenz des *rbcS-E9*-Gens aus *Pisum sativum*.

Die folgenden Methoden wurden eingesetzt:

I. DNA-Extraktion:

10

Methode 1:

Frisches Blatt- oder anderes Gewebe wurde gesammelt (20 bis 100 mg in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß) und 400 µl Extraktions-Puffer (siehe unten) wurden zugegeben. Das Gewebe wurde mit einem kleinen Stößel zermahlen. Die Mischung wurde für 5 sek verwirbelt und 30 min bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugations-Schritt bei 13.000 UPM für 1 min. Der die DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegossen und mit 120 µl Isopropanol gemischt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 2 min inkubiert. Ein DNA-Niederschlag wird nach Zugabe von Ethanol gebildet. Nach Zentrifugation bei 13.000 UPM für 5 Minuten wurde das Ethanol dekantiert. Die Probe wurde an der Luft trocknen gelassen. Der Niederschlag wurde in 400 µl H₂O oder TE-Puffer (siehe unten) resuspendiert.

25

Extraktions-Puffer (100 ml):

30	20 ml	1 M Tris (pH 7,5)
	5 ml	5 M NaCl
	5 ml	0,5 M EDTA

- 14 -

2,5 ml 20% SDS
67,5 ml H₂O

TE-Puffer:

5

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

Methode 2:

10

Frisches Pflanzenmaterial (20 bis 100 mg) wurde in einem 1,5-ml-Eppendorfgesäß gesammelt und 500 µl CTAB-Puffer (65 °C) (siehe unten) wurden zugegeben. Die Mischung wurde 1 bis 1,5 h bei 65 °C inkubiert und anschließend für 5 sek zentrifugiert. 5 µl RNase A (10 mg/ml) wurden zugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 sek zentrifugiert. 200 µl SEVAG wurden zugefügt. Nach Mischen und Zentrifugieren bei 13.000 UPM für 10 min wurde der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Ein Volumen Isopropanol (etwa 400 µl) wurde vorsichtig mit dem Überstand vermischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 UPM für 10 min. 600 µl 70% Ethanol wurden zugefügt. Der Niederschlag wurde durch Invertieren des Reaktionsgefäßes mehrere Male gewaschen. Erneut wurde die Mischung bei 13.000 UPM für 2 min gewaschen. Der Ethanol wurde vorsichtig verworfen. Das Reaktionsgefäß wurde invertiert und auf sauberem Papier drainiert. Die Probe wurde für 15 min an der Luft getrocknet. Der Niederschlag wurde in 50 µl H₂O (siehe unten) resuspendiert.

30

CTAB-Puffer:

- 15 -

1,4 M NaCl
20 mM EDTA
100 mM Tris-HCl
2 % (w/v) CTAB

5

SEVAG:

Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)

RNase-Puffer:

10

10 mM Tris, 15 mM NaCl, pH 7,5

RNase A:

15 10 mg RNase/ml RNase-Puffer

(5 ml bidest + 50 mg RNase A, Aliquots in 1,5-ml-
Reaktionsgefäßen, koche die Reaktionsgefäße 30 min bei 100°C,
Lagerung bei -20°C)

20 Normalerweise wurde Methode 1 verwendet. Mit dieser Methode
ist es möglich, eine hohe Zahl von DNA-Proben pro Tag zu ex-
trahieren, und die DNA-Qualität ist akzeptabel. Methode 2
wurde angewendet, wenn das Blattmaterial älter war oder Pro-
bleme mit der DNA-Qualität auftraten. Methode 2 ist komple-
25 xer, erfordert mehr Zeit und ergibt einen geringeren DNA-
Ertrag, jedoch von höherer Qualität.

Normalerweise wird eine DNA-Quantifizierung nicht durchge-
führt und typischerweise werden in einer PCR-Reaktion 0,5 bis
30 1 µl der extrahierten DNA-Lösung verwendet.

II. PCR-Reaktion:

- 16 -

Für die PCR-Reaktion wurde ein 10x Puffer-Mix aus Puffer + dNTPs hergestellt. Das Verfahren ist wie folgt:

	Stammlösung	Volumen	Konz. 10x-Puffer	Endkonz. PCR-Reaktion
5	1 M Tris-HCl, pH 8,3	100 μ l	0,1 M	10 mM Tris-HCl, pH 8,3
	1 M KCl	500 μ l	0,5 M	50 mM KCl
10	100 mM dATP	20 μ l	2 mM	0,2 mM dATP
	100 mM dCTP	20 μ l	2 mM	0,2 mM dCTP
	100 mM dTTP	20 μ l	2 mM	0,2 mM dTTP
	100 mM dGTP	20 μ l	2 mM	0,2 mM dGTP
	100 mM MgCl ₂	150 μ l	15 mM	1,5 mM MgCl ₂
15	HPLC-Wasser	170 μ l		
		1000 μ l gesamt		

PCR-Reaktion (25 μ l):

20	DNA	0,5 μ l		
	Primer 1	1 μ l (20 pmol)		
	Primer 2	1 μ l (20 pmol)		
	Taq-Polymerase 1	0,2 μ l (1 U, von Oncor Appligene S.A., Heidelberg, Deutschland)		
25	Puffer 10x konz.	2,5 μ l		
	Wasser	18,8 μ l		

III. Identifizierung von H7-1 durch PCR

30

Die Identifizierung von H7-1 wurde mittels PCR unter Verwendung von Event-spezifischen Primern durchgeführt:

Oberer Primer (SEQ ID NO: 1):

- 17 -

H7-207U30: 5' TTA ATT TTT GCA GGC GAT GGT GGC TGT TAT 3'

Unterer Primer (SEQ ID NO: 2):

H7-841L30: 5' CAT ACG CAT TAG TGA GTG GGC TGT CAG GAC 3'

5

Der obere Primer ist außerhalb des Inserts lokalisiert und ist Teil der genomischen DNA der Zuckerrübe. Der unterer Primer ist innerhalb des eingefügten CP4-EPSPS-Gens lokalisiert.

10 PCR-Bedingungen:

94°C 4 min SCHRITT 1

95°C 30 sec SCHRITT 2a

55°C 30 sec SCHRITT 2b

72°C 2 min SCHRITT 2c

15 72°C 5 min SCHRITT 3

4°C über Nacht SCHRITT 4

Reaktion beendet

Die Schritte 2a-c wurden 34mal wiederholt.

20

Das erwartete PCR-Produkt ist ein DNA-Fragment von 664 bp (SEQ ID NO: 13, siehe Fig. 2).

IV. Identifizierung von H7-1 durch Multiplex-PCR

25

Zur Unterscheidung von nicht-transgenen und transgenen Pflanzen, ob homozygot oder heterozygot, wurde eine Multiplex-PCR mit drei verschiedenen Primern durchgeführt. Die folgenden Primer wurden verwendet:

30

H72 (SEQ ID NO: 14): 5' GCTCTGACACAACCGGTAAATGCATTGGCC 3'

H7S2 (SEQ ID NO: 15): 5' GACCCATAGTTTGATTTTAAGCACGACATG 3'

- 18 -

H7R2 (SEQ ID NO: 16): 5' GCAGATTCTGCTAACTTGCGCCATCGGAG 3'

PCR-Bedingungen:

94°C 2 min SCHRITT 1
5 94°C 1 sec SCHRITT 2a
60°C 45 sec SCHRITT 2b
72°C 90 sec SCHRITT 2c
72°C 5 min SCHRITT 3
4°C über Nacht SCHRITT 4
10 Reaktion beendet

Die Schritte 2a-c wurden 34mal wiederholt.

15 Nicht-transgene Pflanzen zeigten lediglich ein PCR-Fragment
von ungefähr 350 bp. Homozygote transgene Pflanzen zeigten
ein Fragment von ungefähr 1.042 kb. Heterozygote Pflanzen
zeigten beide Fragmente (siehe Fig. 3).

BEISPIEL 2: Charakterisierung von Event H7-1

20

Es wurde eine molekulare Analyse zur Charakterisierung der in
H7-1 vorhandenen integrierten DNA durchgeführt. Insbesondere
wurde die Zahl der Inserts (Zahl der Integrationsstellen in-
nerhalb des Zuckerrüben-genoms), die Kopienzahl (die Zahl von
25 DNA-Fragmenten innerhalb eines Ortes), die Integrität der
eingefügten kodierenden Region und dessen regulatorischer
Elemente, dem pFMV-Promotor und der E9-3'-Transkriptionster-
minatorsequenz, die Abwesenheit von "Backbone"-Sequenzen des
zur Transformationen verwendeten Vektors und die stabile Ver-
30 erbung des Inserts bestimmt. Darüber hinaus wurden die das
DNA-Insert flankierenden Sequenzen identifiziert.

- 19 -

Die eingefügte DNA des Zuckerrüben-Transformations-Events H7-1 wurde mittels Southern-Blot, PCR und Invers-PCR-Techniken charakterisiert. Positiv- und Negativkontrollen (PV-BVGT08, DNA von nicht-transgenen Pflanzen) wurden mit untersucht und
5 in der gleichen Weise wie die Testsubstanz (H7-1) behandelt.

DNA wurde aus dem Ansatz Nummer 74903H von Event-H7-1-Pflanzen, angezogen im Jahr 1997, isoliert. Auch aus der Original-Transformante H7-1/3S0057 (= 6401VH) von 1995 und aus
10 drei zusätzlichen in den Jahren 1996, 1997 und 1998 hergestellten Nachkommen (H7-1/64801H, H7-1/74922H und H7-1/83002S) wurde DNA isoliert.

Die nicht-transgene Zuckerrübenlinie 3S0057 diente als Kontrolle. Darüber hinaus wurden die Zuckerrübenlinien 5R7150, 8K1180 und 6S0085 als Negativkontrolle eingesetzt. Diese Linien sind gewöhnliche nicht-transgene Linien, die zur Zucht konventioneller Zuckerrüben verwendet werden.

20 Referenzsubstanzen entsprachen dem zur Transformation verwendeten Plasmid PV-BVGT08. Die Plasmid-DNA und DNA aus den Kontroll-Zuckerrübenlinien wurde zusammengemischt, mit Restriktionsenzymen verdaut und durch Elektrophorese auf Agarose-Gelen parallel zu den Testsubstanzen getrennt. Das Plasmid
25 diente als Größenmarker für das erwartete Fragment und als positive Hybridisierungs-Kontrolle. Die Plasmid-DNA wurde mit der genomischen Pflanzen-DNA in einer Konzentration gemischt, die weniger als eine Kopie des zu analysierenden Elements repräsentiert, um die Empfindlichkeit der Southern-Blot-Methode
30 (~10 µg genomische DNA und ~28 pg PV-BVGT08-DNA) zu demonstrieren. Für Größenabschätzungen wurde der Molekülgrößenmarker RAOUL™ (ONCOR/Appligene, Katalog #160673) verwendet.

DNA-Isolierung:

Pflanzengewebe (1 bis 3 g Feuchtgewicht) vom Ansatz Nummer
5 74903H des Events H7-1 wurden unter Verwendung eines Mörsers
und Stößels in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver
zermahlen. Das Pulver wurde in ein 50-ml-Oakridge-Gefäß
transferiert und 7,5 ml vorgewärmter (60 °C) CTAB-Puffer (2 %
CTAB, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl and 0,2
10 % Mercaptoethanol) wurden zugegeben. Die Proben wurden für
ungefähr 30 min bei 65 °C inkubiert und zwischendurch ge-
mischt. Ein gleiches Volumen (8 ml) einer Mischung aus Chlo-
roform : Isoamylalkohol (24:1 v/v) , RT, wurde zu den Proben
zugegeben. Die Suspension wurde durch Invertieren gemischt
15 und die zwei Phasen wurden durch Zentrifugation (10 min, 9000
UPM) getrennt. Die wäßrige Phase wurde in ein neues 50-ml-
Oakridge-Gefäß überführt und anschließend die DNA durch Zuga-
be von 5 ml Isopropanol gefällt. Die DNA wurde durch Zentri-
fugation (2 min, 9000 UPM) niedergeschlagen und der Überstand
20 wurde entfernt. Die niedergeschlagene DNA wurde mit einer
Waschlösung aus 76% Ethanol und 10 mM Ammoniumacetat für un-
gefähr 20 min inkubiert. Nach der Zentrifugation und dem De-
kantieren des Überstandes wurde die DNA vakuumgetrocknet und
in TE, pH 8,0, bei 4 °C über Nacht resuspendiert.

25

Alternativ wurde DNA mittels des DNeasy Plant Maxi Kits von
Qiagen (Düsseldorf, Deutschland, Katalog #68163) isoliert.
Die DNA-Isolierung wurde nach den Herstellerangaben durchge-
führt.

30

Als zusätzliche alternative Methode wurde DNA mittels des
DNeasy Plant Mini Kits von Qiagen (Düsseldorf, Deutschland,

- 21 -

Katalog #69103) isoliert. Die DNA-Isolierung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Quantifizierung der DNA und Verdauung durch Restriktionsenzyme:

5 Die Quantifizierung der DNA wurde unter Verwendung eines LKB Biochrom UV/visible Spektralphotometers (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) oder alternativ durch Scannen der DNA
10 mit dem Programm RFLPscan (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) nach Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Als Kalibrierungsstandard wurde der High DNA Mass Ladder von Gibco/Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) (Katalog # 10496-016) verwendet. Die Restriktionsenzyme wurden entweder
15 von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) oder New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

DNA-Sonden-Herstellung:

20 PV-BVGT08-DNA wurde aus E. coli-Kulturen isoliert. Zu der kodierenden Region der CP4-EPSPS, dem 35S-Promotor, der E9-3'-Poly-A-Region, der 35S-ctp2-CP4-EPSPS-E9-3'-Kassette und den "Backbone"-Bereichen homologe Sonden-Matrizen wurden durch
25 Verdauung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließende Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese oder durch Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt. Die Produkte wurden mittels des Gene Clean II Kits von BIO 101 (La Jolla, CA) gereinigt. Die Markierung der Sonden (25 pg) mit ³²P-dCTP oder ³²P-dATP wurde durch Verwendung des Megaprime™-DNA-
30 Markierungssystems von Amersham-Pharmacia Biotech Europe (Freiburg, Deutschland) erreicht.

Southern-Blot-Analyse:

Die mit Restriktionsenzymen behandelten DNA-Proben wurden
5 durch Agarose-Gelelektrophorese für ~15 Stunden bei ~35 Volt
getrennt. Nach dem Fotografieren des Gels wurde die DNA durch
Tränken des Gels für 15 min in einer 0,25 M HCl-Lösung depu-
riniert, durch Inkubieren des Gels für 30 min in einer dena-
turierenden Lösung aus 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl unter konstan-
10 ter sanfter Bewegung denaturiert und schließlich durch Trän-
ken für 2 Stunden in verschiedenen Volumina einer Lösung aus
2 M NaCl und 1 M Tris-HCl, pH 5,5, neutralisiert. Die DNAs
aus den Agarose-Gelen wurden unter Verwendung eines Pressure
Blotter von Stratagene nach Anweisungen des Herstellers auf
15 Hybond-NTM-Nylonmembranen (Amersham Pharmacia Biotech Europe,
Freiburg, Deutschland) übertragen. Nach dem Tränken der Fil-
ter für 15 min in 2 x SSPE (20 x SSPE: 3,6 M NaCl, 20 mM
EDTA, 0,2 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,4) wurde die DNA durch Be-
lichtung mit UV-Licht (Transilluminator Pharmacia, Freiburg,
20 Deutschland) für 1 min und durch Erhitzen bei 80 °C für 1
Stunde in einem Vakuumofen auf der Membran fixiert. Die Blots
wurden für 4 Stunden in einer wäßrigen Lösung aus 50 % Forma-
mid, 5 x SSC, 0,1 % Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS und 2 %
Blockreagenz (Boehringer Mannheim, Deutschland, Katalog #
25 1096176) vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit der radioak-
tiv-markierten Sonde wurde in frischer Vorhybridisierungs-
Lösung für 16-18 Stunden bei 42 °C durchgeführt. Nach der Hy-
bridisierung wurden die Membranen für 5 min in 2 x SSC bei
42°C, für 20 min in 2 x SSC, 1 % SDS bei 65°C und für zwei
30 15-min-Perioden in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen.
Autoradiographiebilder von den Blots wurden durch Exponieren

- 23 -

der Blots unter Verwendung eines Biomax-MSTM-Films in Verbindung mit Kodak Biomax MSTM Verstärkungsfolien erhalten.

Identifizierung flankierender 5'- und 3'-Genomsequenzen:

5

Die Verbindungsstelle zwischen der Transgen- und Pflanzengenom-DNA wurde unter Einsatz der Invers-PCR-Technik identifiziert. Genomische DNA wurde wie oben beschrieben gereinigt. Ungefähr 1 µg der DNA wurde in getrennten Reaktionen durch die Restriktionsendonukleasen TaqI, AluI, NdeIII oder RsaI verdauten. Die verdauten DNA-Fragmente wurden durch T4-Ligase über Nacht religiert, worauf sich die PCR-Reaktion anschloß. Die verschiedenen Invers-Primer-Kombinationen wurden unter Verwendung der Primer-Analysesoftware OLIGO[®] von NBI (National Biosciences, Inc., Plymouth, Michigan) erhalten.

15

Aus dieser Invers-PCR-Amplifikation erhaltene Fragmente wurden durch Gel-Elektrophorese getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung des Gene Clean IITM Kits gereinigt. Die gereinigten Fragmente wurden unter Einsatz des TOPOTMTA cloning[®] Kit von Invitrogen (Groningen, Niederlande) in den Vektor pCR[®]2.1 kloniert. Die Inserts wurden zur Sequenzierung bei MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) eingereicht. Die Analyse der erhaltenen Sequenzdaten wurde unter Verwendung der DNA-Analysesoftware Mac Molly[®] Tetra (Soft Gene GmbH, Bochold, Deutschland) durchgeführt.

25

PCR-Analyse:

30

Genomische DNA wurde mit dem DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) nach Herstellerangaben hergestellt. Ungefähr 50 ng genomische DNA wurden für die PCR verwendet.

- 24 -

Die Reaktionsansätze wurden für 30 sek 95°C, für 30 sek 55°C und für 2 min 72°C für 35 Zyklen ausgesetzt. Die PCR wurde in einem PTC200-Cycler (Biozym, Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-
5 Gelelektrophorese analysiert.

1. Anzahl Inserts:

Die Anzahl der Inserts, die Zahl der Integrationsstellen
10 transgener DNA im Zuckerrübengenom, wurde für H7-1 bestimmt. Um die Zahl der Inserts festzustellen, wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen HindIII, XbaI und BamHI verdaut. Als Negativkontrolle wurde DNA aus einer nicht-
transformierten Kontroll-Pflanze, die denselben genetischen
15 Hintergrund repräsentiert, mit Hind III verdaut. Als Positivkontrolle wurde DNA des Transformationsvektors (PV-BVGT08) verwendet.

XbaI und BamHI schneiden PV-BVGT08 nur einmal und schneiden
20 nicht innerhalb der verwendeten markierten CP4-EPSPS-Sonde (siehe Fig. 4). HindIII schneidet PV-BVGT08 dreimal, aber alle drei Stellen sind außerhalb der Sonde und auf derselben Seite, 5' relativ zur Sonde, lokalisiert. Daher sollte jedes Enzym ein einzelnes DNA-Fragment freisetzen, das mit der CP4-
25 EPSPS-Sonde hybridisieren und einen Teil der eingefügten DNA sowie angrenzende genomische Pflanzen-DNA enthalten würde. Die Zahl der festgestellten Fragmente zeigt die Zahl der im Event vorhandenen Inserts an. Die Ergebnisse sind in Fig. 5 dargestellt.

30

Nach Verdauung mit den Enzymen HindIII, XbaI oder BamHI wurde jeweils lediglich ein einzelnes Hybridisierungs-Fragment ge-

- 25 -

funden. Die Fragmente aus 5,2 kb von der HindIII-Verdauung (Spur 4), 4 kb von der XbaI-Verdauung (Spur 5) und ungefähr 11 kb von der BamHI-Verdauung (Spur 7) zeigen, daß die Transformante H7-1 ein einzelnes Integrationsereignis repräsentiert (Fig. 4). Das starke Signal in Spur 1 repräsentiert das linearisierte PV-BVGT08-Plasmid. Zusätzliche schwache Signale sind auf kleine Mengen von unverdaulichem PV-BVGT08 oder auf unspezifische Hintergrund-Hybridisierungssignale zurückzuführen.

10

2. Kopienzahl

Theoretisch könnte eine Integrationsstelle aus mehr als einer Kopie der eingefügten DNA bestehen. Aufgrund der Fragmentgrößen der oben dargestellten Restriktionsanalyse war dies aber nicht möglich. Wenn mehr als eine Kopie der eingefügten DNA H7-1 vorhanden wäre, würden zusätzliche Fragmente detektiert werden. Dies wurde auch bestätigt durch Verdauung mit dem Restriktionsenzym PstI. PstI schneidet zweimal innerhalb der linken und der rechten Grenzsequenzen. Eine der Restriktionsschnittstellen liegt innerhalb der kodierenden Region der CP4-EPSPS, so daß nach der Verdauung zwei mit der CP4-EPSPS-Sonde hybridisierende Fragmente zu erwarten sind. Eines der erwarteten Fragmente entspricht dem internen Fragment von etwa 1,2 kb. Das zweite Fragment sollte ein Grenzfragment sein. Auch hier müßten zusätzliche Fragmente feststellbar sein, wenn mehr als eine Kopie vorhanden ist. Die Ergebnisse zeigen aber, daß PstI die DNA wie erwartet schneidet. Das innere Fragment von 1,2 kb und nur ein zusätzliches Fragment von ungefähr 4,9 kb wurden detektiert (Fig. 5, Spur 3; Fig. 4).

20

30

- 26 -

Als zusätzliche interne Kontrolle wurde die DNA mit ClaI geschnitten (Fig. 5, Spur 6; Fig. 4). Wie erwartet hybridisierte ein einzelnes Fragment von 2,4 kb, da ClaI zweimal, aber links und rechts außerhalb des verwendeten CP4-EPSPS-

5 Fragments schneidet. Dieses Ergebnis ist auch ein Beleg für die Intaktheit des integrierten DNA-Fragments und steht in Übereinstimmung mit den im folgenden wiedergegebenen Ergebnissen.

10 Die Hybridisierung des Plasmids PV-BVGT08 (PV-BVGT08 = 8590 bp) mit dem CP4-EPSPS-Fragment führt wie erwartet zu einem 8,6-kb-Signal (Fig. 5, Spur 1). Eine zweite kleinere sehr schwache Bande ist auf die unvollständige Restriktion von PV-BVGT08 zurückzuführen.

15

Zusammengefaßt zeigen die Experimente, daß die transformierte Zuckerrübenlinie H7-1 eine einzige Kopie der T-DNA von PV-BVGT08 im Pflanzengenom enthält.

20 3. Intaktheit der kodierenden Region

Der Einbau der CP4-EPSPS-Genkassette mit den einzelnen Elementen (P-FMV-Promotor, kodierende Region der ctp2-CP4-EPSPS und E9-3'-untranslatierte Region) wurde durch Verdauung mit
25 den Enzymen HindIII für P-FMV, HindIII plus BamHI für ctp2-CP4-EPSPS und EcoRI und PstI für die E9-3'-untranslatierte Region bestimmt. Zusätzliche Experimente wurden mit SacI und XhoI für die P-FMV-ctp2-CP4-EPSPS-Region und für die E9-3'-Region durchgeführt. Plasmid-DNA, gemischt mit nicht-
30 transgener Zuckerrüben-DNA, und nicht-transgene Zuckerrüben-DNA allein wurden als Positiv- bzw. Negativkontrollen mit denselben Enzymen verdaut.

- 27 -

Diese Enzyme schneiden innerhalb des vorgesehenen DNA-Inserts zwischen den linken und rechten T-DNA-Grenzen (siehe die Plasmid-Karte in Fig. 1), so daß, wenn die entsprechenden Elemente intakt sind, die Größe der hybridisierenden Fragmente in H7-1-DNA und PV-BVGT08-DNA identisch sein sollte.

Als zusätzliche Kontrolle wurden die DNAs mit XbaI verdaut. XbaI schneidet einmal zwischen dem Promotor und der kodierenden Region der ctp2-CP4-EPSPS. Man würde daher ein 8,6-kb-Fragment mit der PV-BVGT08-DNA und im Falle von H7-1 ein Grenzfragment, das sich in der Größe im Vergleich zu dem PV-BVGT08-Fragment unterscheidet, erwarten. Die Ergebnisse sind in den Fig. 6, 7 und 8 dargestellt.

15

Fig. 6: Die Verdauung mit HindIII und BamHI setzte das CP4-EPSPS-Gen frei und der Blot wurde mit einem durch PCR erzeugten CP4-EPSPS-Fragment sondiert. Die Negativkontrolle (Spur 6) zeigte keinerlei Hybridisierungsbanden. Genomische DNA vom Event H7-1 und Plasmid PV-BVGT08, gemischt mit nicht-transgener DNA, bildeten jeweils ein etwa 1,7-kb-Fragment, das der erwarteten Größe entspricht. Die Verdauung mit XbaI führte zu dem erwarteten 8,6-kb-Fragment des linearisierten PV-BVGT08. Für Event H7-1 führte die Verdauung zu einem ungefähr 4,0-kb-Grenzfragment (siehe auch Fig. 4 und 5). Erneut zeigte die Negativkontrolle keinerlei Signal.

25

Fig. 7: Die Verdauung mit HindIII setzte den Braunwurz-Mosaik-Virus-Promotor frei und der Blot wurde mit einem durch PCR erzeugten Promotor-Fragment sondiert. Die Negativkontrolle (Spur 5) zeigte keinerlei Hybridisierungssignale. Genomische DNA aus dem Event H7-1 und Plasmid PV-BVGT08, gemischt

30

- 28 -

mit nicht-transgener DNA, bildeten jeweils ein hybridisierendes Fragment mit einer ungefähren Größe von 0,6 kb. Dieses Fragmente entspricht der erwarteten Größe des Promotors (Spur 4 und 6).

5

Die Verdauung mit XbaI führte zu dem erwarteten 8,6-kb-Fragment des linearisierten PV-BVGT08 und zu dem etwa 1,3 kb großen linken Grenzfragment (Spur 1 und 3) von Event H7-1. Dieses 1,3-kb-Fragment ist auch ein zusätzlicher Beweis dafür, daß das Event H7-1 nur eine einzelne Kopie des Transgens enthält. Erneut zeigte die Negativkontrolle (Spur 2) keinerlei Signal.

Die Verdauung mit SacI/XhoI setzte den Promotor zusammen mit der kodierenden Region der CP4-EPSPS und der Poly-A-Region frei. Hybridisierung mit der vollständigen Promotor-ctp2-CP4-EPSPS-Poly-A-Signal-Kassette (PmeI/XhoI-Fragment) ergab die erwarteten 2,3-kb-Promotor-ctp2-CP4-EPSPS- und 0,7-kb-Poly-A-Signal-Fragmente, sowohl mit der PV-BVGT08-DNA, gemischt mit nicht-transgener DNA, als auch mit genomischer DNA von H7-1 (Spur 9 und 11).

Fig. 8: die Verdauung mit PstI und EcoRI setzte das E9-3'-Polyadenylierungssignal frei und der Blot wurde mit einem Polyadenylierungssignal-Fragment sondiert. Die Negativkontrolle (Spur 3) zeigte keinerlei Hybridisierungsbanden. Plasmid PV-BVGT08, gemischt mit nicht-transgener DNA, und genomische DNA von Event H7-1 bildeten beide ein ungefähr 0,6 kb großes Fragment, das der erwarteten Größe entspricht. Die Verdauung mit XbaI führte zu dem erwarteten 8,6-kb-Fragment des linearisierten PV-BVGT08 und zu einem ungefähr 4,0 kb großen Grenzfragment beim Event H7-1.

- 29 -

Die Verdauung mit PstI setzte das E9-3'-Polyadenylierungssignal, verbunden mit einem 0,5 kb großen 3'-Abschnitt der kodierenden Region der CP4-EPSPS, frei. Das
5 erhaltene 1,2-kb-Fragment war wie erwartet sowohl mit der genomischen H7-1-DNA als auch mit der PV-BVGT08-DNA nachweisbar.

Die Verdauung mit HindIII führte zu einem 8,0-kb-Fragment des
10 linearisierten PV-BVGT08 minus dem Promotorfragment (Spur 13) und zu einem 5,2-kb-Grenzfragment (Spur 11) bei H7-1. Das einzelne 5,2-kb-Fragment aus der HindIII-Verdauung und das einzelne 4,0-kb-Fragment aus der XbaI-Verdauung stellen ebenfalls einen zusätzliche Beleg dafür dar, daß das Event H7-1
15 nur eine Kopie eingefügter DNA enthält. Erneut zeigte die Negativkontrolle kein Signal.

Zusammengefaßt belegen die Ergebnisse für die Blots, daß alle Elemente der transferierten DNA intakt sind und daß das Event
20 H7-1 eine einzelne intakte kodierende Region der CTP2-CP4-EPSPS mit deren regulatorischen Elementen, dem pFMV-Promotor und der E9-3'-Transkriptionsterminator-Sequenz, enthält.

4. Analyse zur Bestimmung von "Backbone"-Fragmenten

25

Die "Backbone"-Region eines Ti-Plasmids wird definiert als die Region außerhalb der T-DNA, begrenzt durch linke und rechte Grenzsequenzen, die aus den ori-Genen und den Selektionsgenen für die Bakterienreplikation und Bakterienselektion
30 bestehen und die durch Agrobakterium-vermittelte Transformation normalerweise nicht in das Pflanzengenom überführt werden. Um die Abwesenheit der "Backbone"-Vektor-DNA in Event

- 30 -

H7-1 zu bestätigen, wurde genomische DNA aus H7-1, aus einer nicht transformierten Kontrolle und genomische DNA aus H7-1, gemischt mit PV-BVGT08-DNA, mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut und mit drei überlappenden durch PCR erzeugte Sonden, die die vollständige "Backbone"-Sequenz umfaßten, untersucht. Eine vierte Sonde weist das vollständige "Backbone" in einem Fragment auf.

Die verwendeten Sonden repräsentieren die "Backbone"-Sequenz (siehe Fig. 9):

- 1: bp 2730- 5370
- 2: bp 5278- 6419
- 3: bp 6302- 7851
- 4: bp 2730- 7851

Fig. 10 zeigt das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse. Spuren 6, 10, 14 und 18: verdaute genomische DNA von H7-1, die mit den "Backbone"-Fragmenten des vollständigen "Backbones" sondiert wurde, zeigte keinerlei Hybridisierungsbanden. Nur Spuren 4, 8, 12, 16 und 20: genomische DNA von H7-1, gemischt mit PV-BVGT08-DNA, zeigt Banden von 8,6 kb, wie erwartet. Die Banden repräsentieren die linearisierte PV-BVGT08-DNA.

Spuren 2 und 4: genomische DNA von H7-1 und genomische DNA von H7-1, gemischt mit PV-BVGT08, und hybridisiert mit dem CP4-EPSPS-Fragment, zeigte Hybridisierungssignale. Die 4-kb-Bande in Spur 2 repräsentiert das rechte Grenzfragment, die zwei Banden der Spur 4 repräsentieren erneut das 4,0 kb lange rechte Grenzfragment und das 8,6 kb große linearisierte PV-BVGT08-Plasmid. Beide Banden weisen dieselbe Intensität auf. Dies ist ein klarer Hinweis, daß die Konzentration der zuge-

- 31 -

gebenen PV-BVGT08-DNA mit der Konzentration des CP4-EPSPS-Elements in der H7-1-DNA vergleichbar ist. Die Konzentration der verwendeten Plasmid-DNA entspricht 0,5 Kopien. Wenn "Backbone"-Sequenzen im H7-1-Genom integriert wären, sollten
5 klare Signale nachweisbar sein.

Diese Ergebnisse belegen, daß H7-1 keine nachweisbare "Backbone"-Sequenz des für die Transformation verwendeten Plasmids enthält. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Daten der Analyse der flankierenden 5'- und 3'-Genombereiche (siehe unten)
10 unterstützt.

5. Identifizierung der flankierenden 5'- und 3'-Genomsequenzen

15

Agrobakterium-vermittelte Transformation führt normalerweise zur Integration aller Sequenzen zwischen der linken und rechten Grenze in das Pflanzengenom. Die 5'- und 3'-Enden der integrierten Plasmid-DNA sollten sich innerhalb oder in der Nähe der linken beziehungsweise rechten Grenzsequenzen befinden.
20 Daher wurde eine Invers-PCR-Technik verwendet, um diese Bereiche zu identifizieren. Die klonierten PCR-Produkte wurden sequenziert und die Sequenzdaten wurden mit der PV-BVGT08-Sequenz verglichen.

25

Fig. 11 zeigt den Abgleich der Sequenz des klonierten Invers-PCR-Fragments (D1U.RPT) (= Genom H7-1, obere Sequenz), erhalten mit Primern für die Analyse der linken Grenzregion, mit der PV-BVGT08-Sequenz (unter Sequenz). Der Vergleich der beiden Sequenzen zeigt, daß die Homologie exakt innerhalb der
30 Grenzsequenz endet.

- 32 -

Fig. 12 zeigt den Abgleich der Sequenz des klonierten Invers-PCR-Fragments (B3UNI.RPT) (= Genom H7-1, obere Sequenz), erhalten mit Primern zur Analyse der rechten Grenzregion, gegen die PV-BVGT08-Sequenz (untere Sequenz). Der Vergleich beider
5 Sequenzen zeigt, daß die Homologie bereits 18 Nukleotide vor der Grenzsequenz endet.

Insgesamt ist dies ein klarer Hinweis darauf, daß die Sequenz zwischen den linken und rechten Grenzen des Ti-Plasmids PV-BVGT08 korrekt integriert ist. Die Sequenz endet innerhalb
10 oder unmittelbar vor den Grenzen. Diese Daten unterstützen das Ergebnis der "Backbone"-Analyse, daß keine Sequenzen des "Backbones" außerhalb der Grenzregionen in das H7-1-Genom integriert wurden.

15

Um festzustellen, ob die flankierenden Sequenzen auf der rechten und linken Seite des Inserts in dem Zuckerrüben-Event H7-1 intakte genomische Sequenzen der Pflanze sind, wurde eine Invers-PCR-Analyse mit den Primer-Kombinationen P1, P2, P3
20 und P4 durchgeführt.

Die Primer der Primer-Kombinationen P1 und P2 sind außerhalb des Inserts lokalisiert. Wenn die DNA des Insertionsortes innerhalb des Events H7-1 mit der DNA einer nicht-
25 transformierten Kontrolle identisch ist, sollte die PCR zu zwei PCR-Fragmenten führen, die die Synthese aus den zwei Primer-Kombinationen repräsentieren. Die Primer der Primer-Kombinationen P3 und P4 sind in einer Weise ausgelegt, daß einer der entsprechenden Primer innerhalb des CP4-EPSPS-
30 Inserts lokalisiert ist und der andere Primer außerhalb des Inserts, innerhalb der genomischen DNA der Pflanze. Daher

- 33 -

sollte die PCR ausschließlich Fragmente von der DNA des Events H7-1 bilden.

Sequenzdaten aus der Invers-PCR-Technik, kombiniert mit Daten
5 von dem PV-BVGT08-Vektor, führen zu einer Sequenz, die das H7-1-Insert (PV-BVGT08-Sequenz), die rechten und linken Verbindungsstellenbereiche und zusätzliche genomische Zuckerrüben-DNA enthalten (SEQ ID NO: 5).

10 Zur Identifizierung der Transgen-zu-Pflanzengenom-DNA-Verbindungsstellen (Identifizierung der Event-Spezifität) und für die Genom-DNA-Regionen auf der linken und rechten Seite des Inserts wurden folgende Primer-Kombinationen verwendet:

15 P1-Kombination (Primer zur Analyse genomischer DNA außerhalb der rechten Grenzregion, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19):

Oberer Primer: 5'CGG TAA ATG CAT TGG CCT TTG TT

Unterer Primer: 5'CAC CCA GAT CCC AAT AAA ACC GTA AT

20 Erwartetes PCR-Produkt 241 bp

P2-Kombination (Primer zur Analyse genomischer DNA außerhalb der linken Grenzregion, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21):

25 Oberer Primer: 5'AAA TGG TTG TAG ATA AAT AAG GAA ATC A

Unterer primer: 5'ACA TGT TTG AGC ACT CTT CTT GT

Erwartetes PCR-Produkt 377 bp

P3-Kombination (Primer zur Analyse der Transgen-Planzengenom-DNA-Verbindungsstelle, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8):
30

Oberer Primer: 5'ATG CAT TGG CCT TTG TTT TTG AT

- 34 -

Unterer Primer: 5'TGT CGT TTC CCG CCT TCA G

Erwartetes PCR-Produkt 288 bp (SEQ ID NO: 11)

5 P4-Kombination (Primer zur Analyse der Transgen-Planzengenom-DNA-Verbindungsstelle, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10):

Oberer Primer: 5'CGC TGC GGA CAT CTA CAT TTT TGA AT

Unterer primer: 5'AGT TAA CTT TCC ACT TAT CGG GGC ACT G

Erwartetes PCR-Produkt 751 bp (SEQ ID NO: 12)

10

PCR-Experimente mit DNA von Event H7-1 und mit DNA von einer nicht-transgenen Kontrollpflanze unter Verwendung der Primer-Kombination P3, die einen Primer aufweist, der innerhalb des H7-1-Inserts lokalisiert ist, ergab ein Fragment ausschließlich mit der DNA des Events H7-1. Im Gegensatz dazu ergeben
15 PCR-Experimente unter Verwendung der zu Sequenzen außerhalb des Insertes homologen Primer-Kombinationen P1 Fragmente sowohl mit Event H7-1 als auch mit nicht-transgener Kontroll-DNA. Siehe Fig. 13 zu diesen Ergebnissen.

20

Die Ergebnisse zeigen, daß die Sequenz neben der rechten Verbindungsstelle des Insertes in der DNA des transgenen Events H7-1 und in der DNA von nicht-transgenen Pflanzen vorhanden ist. Daraus ergibt sich, daß diese DNA außerhalb des Event-
25 H7-1-Inserts nicht-transgene genomische DNA ist.

PCR-Experimente, durchgeführt mit Event-H7-1-DNA und DNA aus einer nicht-transgenen Kontrollpflanze unter Verwendung der Primer-Kombination P4, die einen innerhalb des CP4-EPSPS-
30 Insertes lokalisierten Primer aufweist, ergibt ein Fragment ausschließlich mit DNA des Events H7-1. Im Gegensatz dazu ergeben PCR-Experimente unter Verwendung der zu Sequenzen au-

- 35 -

ßerhalb des Inserts homologen Primer-Kombination P2 Fragmente sowohl mit DNA des Events H7-1 als auch mit nicht-transgener Kontroll-DNA (Fig. 14).

5 Die Ergebnisse zeigen, daß die Sequenz neben der linken Verbindungsstelle des Inserts in der DNA des transgenen Events H7-1 und in der DNA von nicht-transgenen Pflanzen vorhanden ist. Daraus ergibt sich, daß diese DNA außerhalb des Event-H7-1-Inserts nicht-transgene genomische DNA ist.

10

Zusammengefaßt kann festgestellt werden, daß die Sequenzen außerhalb des Inserts des Zuckerrüben-Events H7-1 identisch mit Sequenzen sind, die in nicht-transgenen Pflanzen vorhanden sind. Es kann geschlossen werden, daß diese Sequenzen pflanzliche genomische Sequenzen sind, die in der für die Transformation verwendeten Elternlinie und in anderen konventionellen Zuckerrübenlinien vorhanden sind.

6. Stabilität über Generationen

20

Um die Stabilität der integrierten DNA zu demonstrieren, wurde das ursprüngliche Transformations-Event H7-1 mit drei Nachkommen (64801H, 74922H und 83002S; siehe Fig. 15) dieser Linie, die durch Selbstbestäubung mit nicht-transgenen Zuckerrübenlinien erhalten wurden, verglichen. Die ursprüngliche transformierte Linie und die Nachkommen wurden in den Jahren 1995, 1996, 1997 und 1998 hergestellt.

Als Kontrolle wurden vier verschiedene nicht-transgene Zuckerrübenlinien (3S0057, 5R7150, 8K1180, 6S0085) analysiert. Alle DNAs wurden mit XbaI, HindIII bzw. BamHI verdaut und mit einem markierten CP4-EPSPS-Fragment hybridisiert. Um zu zei-

30

- 36 -

gen, daß die T-DNA stabil in das Pflanzengenom integriert ist, sollten alle Spuren der H7-1-Nachkommen, die mit demselben Restriktionsenzym verdaut wurden, eine Bande von exakt derselben Größe zeigen.

5

Die DNAs von den H7-1-Nachkommen, Spuren 3 to 6, zeigen die erwarteten Fragmente: DNA verdaut mit BamHI führte zu Banden von ungefähr 11 kb, Verdaus mit XbaI führten zu Fragmenten von 4,0 kb und HindIII-Restriktion bildete Banden von 5,2 kb. Alle Banden von derselben Restriktion, aber aus verschiedenen Jahren, waren in ihrer Größe identisch. Alle nicht-transgenen Linien zeigten keinerlei Signal (Fig. 16).

10

Diese Ergebnisse zeigen, daß die eingeführte Sequenz stabil in die genomische DNA integriert ist und stabil vererbt wird.

15

Sequenzprotokoll - freier Text

20

SEQ ID: 5

<223>: Eingefügte DNA mit flankierenden 3'- und 5'-Sequenzen

SEQ ID: 6

<223>: PCR-Produkt

25

SEQ ID: 11

<223>: PCR-Produkt

SEQ ID: 12

30

<223>: PCR-Produkt

SEQ ID: 13

<223>: PCR-Produkt

SEQ ID: 17

5 <223>: PCR-Produkt

- 38 -

SEQUENCE LISTING

5 <110> KWS SAAT AG

<120> Glyphosat-tolerante Zuckerrübe

<130> PCT 0079

10 <150> EP 03003866.5

<151> 2003-02-20

<150> US 10/376763

15 <151> 2003-02-28

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Primer

<400> 1

30 ttaatttttg caggcgatgg tggctgttat 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

- 39 -

<400> 2
 catacgcatt agtgagtggg ctgtcaggac 30

<210> 3
 5 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 10 <223> Primer

<400> 3
 atgttatctt taccacagtt 20

15 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Primer

<400> 4
 25 gtcctaaat gaaatacgta aaac 24

<210> 5
 <211> 3778
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Inserted DNA with 3' and 5' flanking sequences

<400> 5
 35 ctcgagcggc gccagtggt atggatatct gcagaattcg cccttatggt atctttacca 60
 cagtttggtg ctctgacaca accggtaa at gcattggcct ttgtttttga tggcatcaac 120
 tttggagcat ctgattttgc atattcagcc ttttccatgg taattctttt acaagaattt 180
 40 tcattctttc ttaagtataa acacttagct tgggacaaac ttctgatcct atttcttaat 240

- 40 -

	ttttgcaggt gatggtggct gttatgagca ttttgtgttt gatgtttctt tcttctcatt	300
	acggttttat tgggatctgg gtggctctaa ctatttacat gagcctccgc gcgtttgctg	360
5	aaggcgggaa acgacaatct gatccccatc aagcttgagc tcaggattta gcagcattcc	420
	agattggggt caatcaacaa ggtacgagcc atatcacttt attcaaattg gtatcgccaa	480
10	aaccaagaag gaactcccat cctcaaaggt ttgtaaggaa gaattctcag tccaaagcct	540
	caacaaggtc agggtagaga gtctccaaac cattagccaa aagctacagg agatcaatga	600
	agaatcttca atcaaagtaa actactgttc cagcacatgc atcatgggtca gtaagtttca	660
15	gaaaaagaca tccaccegaag acttaaagtt agtgggcatc tttgaaagta atcttgtcaa	720
	catcgagcag ctggcttgtg gggaccagac aaaaaaggaa tgggtgcagaa ttgttaggcg	780
20	cacctaccaa aagcatcttt gcctttattg caaagataaa gcagattcct ctagtacaag	840
	tggggaacaa aataacgtgg aaaagagctg tcctgacagc ccactcacta atgcgtatga	900
	cgaacgcagt gacgaccaca aaagaattcc ctctatataa gaaggcattc attcccattt	960
25	gaaggatcat cagatactca accaatcctt ctagaagatc taagcttatc gataagcttg	1020
	atgtaattgg aggaagatca aaattttcaa tccccattct tcgattgctt caattgaagt	1080
30	ttctccgatg gcgcaagtta gcagaatctg caatgggtgtg cagaaccat ctcttatctc	1140
	caatctctcg aaatccagtc aacgcaaatc tcccttatcg gtttctctga agacgcagca	1200
	gcatccacga gcttatccga tttcgtcgtc gtggggattg aagaagagtg ggatgacgtt	1260
35	aattggctct gagcttcgtc ctcttaaggt catgtcttct gtttccacgg cgtgcatgct	1320
	tcacgggtgca agcagccgtc cagcaactgc tcgtaagtcc tctggctctt ctggaaccgt	1380
40	ccgtattcca ggtgacaagt ctatctccca caggctcttc atgtttggag gtctcgctag	1440
	cggtgaaacc cgtatcaccg gtcttttggga aggtgaagat gttatcaaca ctggtaaggc	1500
	tatgcaagct atgggtgcca gaatccgtaa ggaaggatgat acttggatca ttgatgggtg	1560
45	tggtaacggt ggactccttg ctctgaggc tcctctcgat ttcggtaacg ctgcaactgg	1620
	ttgccgttg actatgggtc ttgttgggtg ttaacgatttc gatagcactt tcattgggtg	1680
50	cgcttctctc actaagcgtc caatgggtcg tgtgttgaac ccacttcgcg aaatgggtgt	1740
	gcaggatgaag tctgaagacg gtgatcgtct tccagttacc ttgcgtggac caaagactcc	1800
	aacgccaatc acctacaggg tacctatggc ttccgctcaa gtgaagtccg ctgttctgct	1860
55	tgctggctctc aacaccccag gtatcaccac tgttatcgag ccaatcatga ctcgtgacca	1920
	cactgaaaag atgcttcaag gttttgggtc taaccttacc gttgagactg atgctgacgg	1980

- 41 -

	tgtgcgtacc atccgtcttg aaggctcgtg taagctcacc ggtcaagtga ttgatgttcc	2040
	aggtgatcca tcctctactg ctttcccatt ggttgctgcc ttgcttgttc caggttccga	2100
5	cgtcaccate cttaacgttt tgatgaaccc aaccctact ggtctcatct tgactctgca	2160
	ggaaatgggt gccgacatcg aagtgatcaa cccacgtctt gctggaggag aagacgtggc	2220
10	tgacttgctg gttcgttctt ctactttgaa ggggtgttact gttccagaag accgtgctcc	2280
	ttctatgatc gacgagatc caattctcgc tgttgagct gcattcgtg aaggtgctac	2340
	cgttatgaac ggtttggaag aactccgtgt taaggaaagc gaccgtcttt ctgctgtcgc	2400
15	aaacggtctc aagctcaacg gtggtgattg cgatgaaggt gagacttctc tcgtcgtgcg	2460
	tggtcgtcct gacggtaagg gtctcggtaa cgcttctgga gcagctgtcg ctaccacct	2520
20	cgatcacctg atcgtatga gcttcctcgt tatgggtctc gtttctgaaa accctgttac	2580
	tgttgatgat gctactatga tcgctactag cttcccagag ttcattggatt tgatggctgg	2640
	tcttgagct aagatcgaac tctccgacac taaggctgct tgatgagctc aagaattcga	2700
25	gctcggtagc ggatcctcta gctagagctt tcgttcgtat catcggtttc gacaacgttc	2760
	gtcaagttca atgcatcagt ttcattgctc acacaccaga atcctactga gtttgagtat	2820
30	tatggcattg ggaaaactgt ttttcttgta ccatttggtg tgcttgtaat ttactgtgtt	2880
	ttttattcgg ttttcgctat cgaactgtga aatggaaatg gatggagaag agttaatgaa	2940
	tgatatggtc cttttgttca ttctcaaatt aatattattt gtttttctc ttatttggtg	3000
35	tgtggtgaa ttgaaattat aagagatatg caaacatttt gttttgagta aaaatgtgtc	3060
	aaatcgtggc ctctaattgac cgaagttaat atgaggagta aaacacttgt agttgtacca	3120
40	ttatgcttat tcactaggca acaaataat tttcagacct agaaaagctg caaatgttac	3180
	tgaatacaag tatgtcctct tgtgttttag acatttatga actttccttt atgtaatttt	3240
	ccagaatcct tgtcagattc taatcattgc tttataatta tagttatact catggatttg	3300
45	tagttgagta tgaaaatatt ttttaatgca ttttatgact tgccaattga ttgacaacat	3360
	gcatcaatcg acctgcagcc actcgaagcg gccgacctc gagtggaggc cgcacgatc	3420
50	gtgaagtttc tcatctaagc cccatttg acgtgaatgt agacacgtcg aaataaagat	3480
	ttccgaatta gaataatttg tttattgctt tcgcctataa atacgacgga tcgtaatttg	3540
	tcgttttatc aaaatgtact ttcattttat aataacgctg cggacatcta catttttgaa	3600
55	ttgaaaaaaa ttggtaatta ctctttcttt ttctccatat tgaccatcat actcattgct	3660
	gatccatgta gatttcccgg acatgaagcc atttacaatt gaatatatcc taagtaaaac	3720

- 42 -

ctcataggtt ttacgtatth catttaggga caagggcgaa ttccagcaca ctggcggc 3778

<210> 6

<211> 3706

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR product

10

<400> 6

atgttatctt taccacagtt tgttgctctg acacaaccgg taaatgcatt ggcctttgtt 60

tttgatggca tcaactttgg agcatctgat tttgcatatt cagccttttc catggtaatt 120

15

cttttacaag aattttcatt ctttcttaag tataaacact tagcttggga caaacttctg 180

atcctatctt ttaatthttg caggtgatgg tggctgttat gagcathttg tgtttgatgt 240

20

ttctttcttc tcattacggg tttattggga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc 300

tccgcgcggt tgctgaaggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct tgagctcagg 360

athtagcagc attccagatt gggttcaatc aacaaggtag gagccatata actthattca 420

25

aattggtatc gccaaaacca agaaggaact cccatcctca aaggthttgta aggaagaatt 480

ctcagthcaa agcctcaaca aggtcagggt acagagthctc caaacctata gccaaaagct 540

30

acaggagatc aatgaagaat cthcaatcaa agthaaactac thttccagca catgcatcat 600

ggthcagthaa thtcagaaaa agacatccac cgaagactth aagthtagthg gcathctthga 660

aagthaatctt thcaacatcg agcagctggc thtgthggggac cagacaaaaa aggaathgthg 720

35

cagaththgtt aggcgcacct accaaaaagca thththgcctt ththgcaaaag athaaagcaga 780

thctcttagt acaagthgggg acaaaaaataa cgtggaaaag agctgthctg acagcccact 840

40

cactaatgth ththgacgaa gcagthgacga ccacaaaaaga ththcctcta thaaagaagg 900

cathcathcc caththgaagg athcatcagat actcaacca thctthctaga agathctaagc 960

ththcagataa gctthgatgta aththgaggaa gatcaaaath thcaathcccc athctthcgat 1020

45

thctthcaath gaagththctc cgathggcgca agthtagcaga athctgcaath gthgthcagaa 1080

cccathctctt athctcaath thctgaaath cagthcaacgc aathctcct thctggththc 1140

50

thctgaagacg cagcagcath cacgagctta thcgaththg thgthcgtggg gaththgaagaa 1200

gagthgggath acgththath gctctgagct thgthctctt aagthcatgt thctctgththc 1260

- 43 -

cacggcgtgc atgcttcacg gtgcaagcag ccgtccagca actgctcgtgta agtcctctggt 1320
 tctttctgga accgtccgta ttccagggtga caagtctatc tcccacaggt ccttcatggt 1380
 5 tggagggtctc gctagcgggtg aaaccctgat caccggctctt ttggaagggtg aagatgttat 1440
 caacactgggt aaggctatgc aagctatggg tgccagaatc cgtaaggaag gtgatacttg 1500
 10 gatcattgat ggtggttgga acgggtggact ccttgctcct gaggctcctc tcgatttcgg 1560
 taacgctgca actggttgcc gtttgactat gggctctggt ggtggttacg atttcgatag 1620
 cactttcatt ggtgacgctt ctctcactaa gcgtccaatg ggtcgtgtgt tgaaccact 1680
 15 tcgcgaaaatg ggtgtgcagg tgaagtctga agacgggtgat cgtcttccag ttaccttgcg 1740
 tggaccaaag actccaacgc caatcaccta cagggtacct atggcttccg ctcaagtgaa 1800
 gtccgctggt ctgcttgctg gtctcaacac cccagggtatc accactgtta tcgagccaat 1860
 20 catgactcgt gaccacactg aaaagatgct tcaaggtttt ggtgctaacc ttaccgttga 1920
 gactgatgct gacgggtgtc gtaccatccg tcttgaagggt cgtggtaagc tcaccgggtca 1980
 25 agtgattgat gttccagggtg atccatcctc tactgctttc ccattgggtg ctgccttgct 2040
 tgttccagggt tccgacgtca ccaccttaa cgttttgatg aaccaaccg gtactgggtct 2100
 catcttgact ctgcaggaaa tgggtgcccga catcgaagtg atcaaccac gtcttgctgg 2160
 30 tggagaagac gtggctgact tgcgtgttog ttcttctact ttgaagggtg ttactgttcc 2220
 agaagaccgt gtccttcta tgatcgacga gtatccaatt ctcgctggtg cagctgcatt 2280
 35 cgctgaagggt gctaccgtta tgaacggttt ggaagaactc cgtgttaagg aaagcgaccg 2340
 tctttctgct gtcgcaaacg gtctcaagct caacgggtgtt gattgctgat aagggtgagac 2400
 ttctctcgtc gtgctgggtc gtctgacgg taagggtctc ggtaacgctt ctggagcagc 2460
 40 tgtcgtacc cacctgatc accgtatcgc tatgagcttc ctcgttatgg gtctcgtttc 2520
 tgaaaaccct gttactgttg atgatgctac tatgatcgtc actagcttcc cagagttcat 2580
 45 ggatttgatg gctggtcttg gagctaaagt cgaactctcc gacactaagg ctgcttgatg 2640
 agctcaagaa ttcgagctcg gtaccggatc ctctagctag agctttcggt cgtatcatcg 2700
 gtttcgacaa cgttcgtcaa gttcaatgca tcagtttcat tgcgcacaca ccagaatcct 2760
 50 actgagtttg agtattatgg cattgggaaa actgtttttc ttgtaccatt tgttgtgctt 2820
 gtaatttact gtgtttttta ttcggttttc gctatcgaac tgtgaaatgg aaatggatgg 2880
 55 agaagagtta atgaatgata tggctcctttt gttcattctc aaattaatat tatttgtttt 2940
 ttctcttatt tgttgtgtgt tgaatttgaa attataagag atatgcaaac attttgtttt 3000

- 44 -

gagtaaaaat gtgtcaaadc gtggcctcta atgaccgaag ttaatatgag gagtaaaaaca 3060
 cttgtagttg taccattatg cttattcact aggcaacaaa tatattttca gacctagaaa 3120
 5 agctgcaaact gttactgaat acaagtatgt cctccttggt tttagacatt tatgaacttt 3180
 cctttatgta attttccaga atccttgatc gattctaadc attgctttat aattatagtt 3240
 10 atactcatgg atttgtagtt gagtatgaaa atatttttta atgcatttta tgacttgcca 3300
 attgattgac aacatgcatc aatcgacctg cagccactcg aagcggccgc cactcgagtg 3360
 gtggccgcat cgatcgtgaa gtttctcatc taagccccc tttggacgtg aatgtagaca 3420
 15 cgtcgaaata aagatttccg aattagaata atttgtttat tgctttcgcc tataaatagc 3480
 acggatcgta atttgtcgtt ttatcaaaaat gtactttcat tttataataa cgctgcggac 3540
 20 atctacattt ttgaattgaa aaaaattggt aattactctt tctttttctc catattgacc 3600
 atcactactca ttgctgatcc atgtagattt cccggacatg aagccattta caattgaata 3660
 taccctaagt aaaacctcat aggttttacg tatttcattt agggac 3706

25 <210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Primer

<400> 7
 atgcattggc ctttgttttt gat 23

35 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40 <220>
 <223> Primer

<400> 8
 45 tgtcgtttcc cgccttcag 19

- 45 -

<210> 9
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Primer

 <400> 9
 10 cgctgaggac atctacattt ttgaat 26

 <210> 10
 <211> 28
 <212> DNA
 15 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Primer

 <400> 10
 20 agttaacttt ccacttatcg gggcactg 28

 <210> 11
 <211> 288
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> PCR product
 30
 <400> 11
 atgcattggc ctttgttttt gatggcatca actttggagc atctgatttt gcatattcag 60
 ccttttccat ggtaattcct ttacaagaat ttccattcct tcttaagtat aaacacttag 120
 35 cttgggacaa acttctgatc ctattttotta atttttgcag gcgatgggtg ctgttatgag 180
 cattttgtgt ttgatgtttc tctcttctca ttacggtttt attgggatct ggggtggctct 240
 40 aactatttac atgagcctcc gcgcgtttgc tgaaggcggg aaacgaca 288

- 46 -

<210> 12
 <211> 751
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

5

<220>
 <223> PCR product

<400> 12

10 cgctgCGGac atctacattt ttgaattgaa aaaaaattgg taattactct ttctttttct 60
 ccatattgac catcatactc attgctgac catgtagatt tcccggacat gaagccattt 120
 15 acaattgaat atatcctaag taaaacctca taggttttac gtatttcatt tagggactaa 180
 aatggtttag gataattact ttagctaaca taagataata aataaataaa taaataaaaa 240
 taaaatgggt gtagataaat aaggaaatca ataataaata tgagtgtgag tgataggacg 300
 20 ggaatgggaa actttttacac tactttaacg ctattgaacg agtatgagta tgttataaac 360
 gtaaaatggt ttatgtgtta gacaatggcc tcaagtgaaa gtgaccctat taatggagga 420
 25 aatgcaaacc acgagtctga ggtcacgctc gaagaaatga gggcaaggat cgacgcattg 480
 cgtagcgacc ctgtttttgg agatgccacg ggagatgcta gtgataaccg aatggattta 540
 atgaggttga tgatgatgga gcttttacia ggaaatcgac aaaggcctag aactgaacaa 600
 30 gaagagtgct caaacatggt caagaggttt tgggctcata agcccccaac ttatgatgga 660
 aagccagacc ccaactgagtt tgaagaatgg ctcaacggca tggaaaaatt gttc gatgcc 720
 35 acccagtgcc ccgataagtg gaaagttaac t 751

<210> 13
 <211> 664
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

40

<220>
 <223> PCR product

<400> 13

45 ttaatttttg caggcgatgg tggctgttat gagcattttg tgtttgatgt ttctctcttc 60
 tcattacggt tttattggga tctgggtggc tctaactatt tacatgagcc tccgcgcgtt 120

- 47 -

tgctgaaggc gggaaacgac aatctgatcc ccatcaagct tgagctcagg atttagcagc 180
 attccagatt gggttcaatc aacaaggtag gagccatata actttattca aattggtatc 240
 5 gccaaaacca agaaggaact cccatcctca aaggtttgta aggaagaatt ctcagtccaa 300
 agcctcaaca aggtcagggt acagagtctc caaaccatta gccaaaagct acaggagatc 360
 10 aatgaagaat cttcaatcaa agtaactac tgttccagca catgcatcat ggtcagtaag 420
 tttcagaaaa agacatccac cgaagactta aagttagtgg gcatctttga aagtaatctt 480
 gtcaacatcg agcagctggc ttgtggggac cagacaaaaa aggaatggtg cagaattggt 540
 15 aggcgcacct accaaaagca tctttgcctt tattgcaaag ataaagcaga ttcctctagt 600
 acaagtgggg aacaaaataa cgtggaaaag agctgtcctg acagcccact cactaatgcg 660
 20 tatg 664
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> Primer
 <400> 14
 30 gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc 30
 <210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 40 <400> 15
 gacctatagt ttgattttaa gcacgacatg 30
 <210> 16
 <211> 29
 45 <212> DNA

- 48 -

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5

<400> 16

gcagattctg ctaacttgcg ccatcggag

29

<210> 17

10

<211> 1042

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15

<223> PCR product

<220>

<221> misc_feature

20

<223> PCR product

<400> 17

gctctgacac aaccggtaaa tgcattggcc tttgtttttg atggcatcaa ctttggagca 60

25

tctgattttg catattcagc cttttccatg gtaattcttt tacaagaatt ttcattcttt 120

cttaagtata aacacttagc ttgggacaaa cttctgatcc tatttcttaa tttttgcagg 180

30

cgatggtggc tgttatgagc attttgtggt tgatgtttct ctcttctcat tacggtttta 240

ttgggatctg ggtggctcta actatttaca tgagcctccg cgcgtttgct gaaggcggga 300

aacgacaatc tgatcccat caagcttgag ctcaggattt agcagcatte cagattgggt 360

35

tcaatcaaca aggtacgagc catatcactt tattcaaatt ggtatcgcca aaaccaagaa 420

ggaactccca tcctcaaagg tttgtaagga agaattctca gtccaaagcc tcaacaaggt 480

40

cagggtacag agtctccaaa ccattagcca aaagctacag gagatcaatg aagaatcttc 540

aatcaaagta aactactggt ccagcacatg catcatggtc agtaagtttc agaaaaagac 600

atccaccgaa gacttaaagt tagtgggcat ctttgaaagt aatcttgtca acatcgagca 660

45

gctggcttgt ggggaccaga caaaaaagga atggtgcaga attgttaggc gcacctacca 720

aaagcatctt tgcctttatt gcaaagataa agcagattcc tctagtacaa gtgggggaaca 780

- 49 -

aaataacgtg gaaaagagct gtcctgacag cccactcact aatgcgtatg acgaacgcag 840
 5 tgacgaccac aaaagaattc cctctatata agaaggcatt cattcccatt tgaaggatca 900
 tcagatactg aaccaatcct tctagaagat ctaagcttat cgataagctt gatgtaattg 960
 gaggaagatc aaaattttca atccccattc ttcgattgct tcaattgaag tttctccgat 1020
 10 ggcgcaagtt agcagaatct gc 1042

<210> 18

<211> 23

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

20

<400> 18

cggtaaatgc attggccttt gtt 23

<210> 19

25 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30 <223> Primer

<400> 19

cacccagatc ccaataaaac cgtaat 26

35 <210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40 <220>

<223> Primer

<400> 20
aaatggttgt agataaataa ggaaatca 28

<210> 21
5 <211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
10 <223> Primer

<400> 21
15 acatgtttga gcacttttct tgt 23

PATENTANSPRÜCHE

1. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze, dadurch gekennzeichnet, daß

- 5 a) die Zuckerrübenpflanze aus Samen erhalten wird, der bei der NCIMB, Aberdeen (Schottland, V.K.) unter der Zugangsnummer NCIMB 41158 oder NCIMB 41159 hinterlegt wurde, und/oder
- 10 b) ein DNA-Fragment von 630-700 bp, bevorzugt 664 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 2 aufweist, amplifiziert werden
- 15 c) ein DNA-Fragment von 3500-3900, bevorzugt 3706 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 3
- 20 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 4 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder
- 25 d) ein DNA-Fragment von 270-300 bp, bevorzugt 288 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 7
- aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 8 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder
- 30 e) ein DNA-Fragment von 710-790 bp, bevorzugt 751 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem er-

- 52 -

sten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 9 aufweist, und einem zweiten Primer, der die SEQ ID NO: 10 aufweist, amplifiziert werden kann, und/oder

5 f) ein DNA-Fragment von 990-1100 bp, bevorzugt 1042 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 14 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 16 aufweist, amplifiziert werden kann.

10

2. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 3706-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 6 aufweist oder mindestens 95 %, bevorzugt mindestens 99 %, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 6 aufweist.

15

3. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 664-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 13 aufweist oder mindestens 95 %, bevorzugt mindestens 99 %, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 13 aufweist.

20

4. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 288-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 11 aufweist oder mindestens 95 %, bevorzugt mindestens 99 %, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 11 aufweist.

25

30

5. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 751-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 12 aufweist oder mindestens 95 %, bevorzugt mindestens 99 %, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 12 aufweist.
5
6. Glyphosat-tolerante Zuckerrübenpflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das 1042-bp-DNA-Fragment die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 17 aufweist oder mindestens 95 %, bevorzugt mindestens 99 %, besonders bevorzugt mindestens 99,9 % Identität mit der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 17 aufweist.
10
- 15 7. Samen einer Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Zelle, Gewebe oder Teile von der Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
- 20 9. Samen, hinterlegt beim NCIMB unter der Zugangsnummer NCIMB 41158 oder NCIMB 41159.
10. Pflanze, oder Teile davon, erhalten aus Samen nach Anspruch 9.
- 25 11. Verfahren zur Identifizierung einer Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren den/die Schritt(e) umfaßt des
 - a) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 630-700 bp, bevorzugt 664 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidse-
30

- 54 -

quenz der SEQ ID NO: 1 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 2 aufweist, und/oder

5 b) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 3500-3900 bp, bevorzugt 3706 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 3 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 4 aufweist, und/oder

10 c) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 270-300 bp, bevorzugt 288 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 7 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 8 aufweist, und/oder

15 d) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 710-790 bp, bevorzugt 751 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze, Teilen oder Samen davon, durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 9 aufweist, und einem zweiten Primer, der die SEQ ID NO: 10 aufweist, und/oder

20 e) Amplifizierens eines DNA-Fragments von 990-1100 bp, bevorzugt 1042 bp, von der genomischen DNA der Zuckerrübenpflanze durch Polymerasekettenreaktion mit einem ersten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 14 aufweist, und einem zweiten Primer, der die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 16 aufweist.

30

12. Test-Kit zur Identifizierung einer transgenen Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze, deren Zellen, Gewebe oder

- 55 -

Teile, umfassend mindestens ein Primer-Paar mit einem ersten und einem zweiten Primer für die Polymerasekettenreaktion, wobei der erste Primer eine Sequenz innerhalb der in das Genom der Pflanze aufgenommenen fremden DNA erkennt, und der zweite Primer eine Sequenz innerhalb der flankierenden 3'- oder 5'-Bereiche der DNA erkennt, wobei die Pflanze eine Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 10 ist.

- 10 13. Test-Kit zur Identifizierung einer transgenen Glyphosat-toleranten Zuckerrübenpflanze, deren Zellen, Gewebe oder Teile, umfassend mindestens ein Primer-Paar mit einem ersten und einem zweiten Primer für die Polymerasekettenreaktion, wobei der erste Primer eine Sequenz innerhalb der in das Genom der Pflanze aufgenommenen fremden DNA erkennt, und der zweite Primer eine Sequenz innerhalb der flankierenden 3'- oder 5'-Bereiche der DNA erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß
- 15 a) der erste Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1 aufweist und der zweite Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 2 aufweist, und/oder
- 20 b) der erste Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 7 aufweist und der zweite Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 8 aufweist, und/oder
- 25 c) der erste Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 9 aufweist und der zweite Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 10 aufweist, und/oder
- 30 d) der erste Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 14 aufweist und der zweite Primer die Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 16 aufweist.

- 56 -

14. Test-Kit nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß der erste und zweite Primer eine Nukleotidsequenz erkennen, die einen Teil der Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 5 bildet.

5

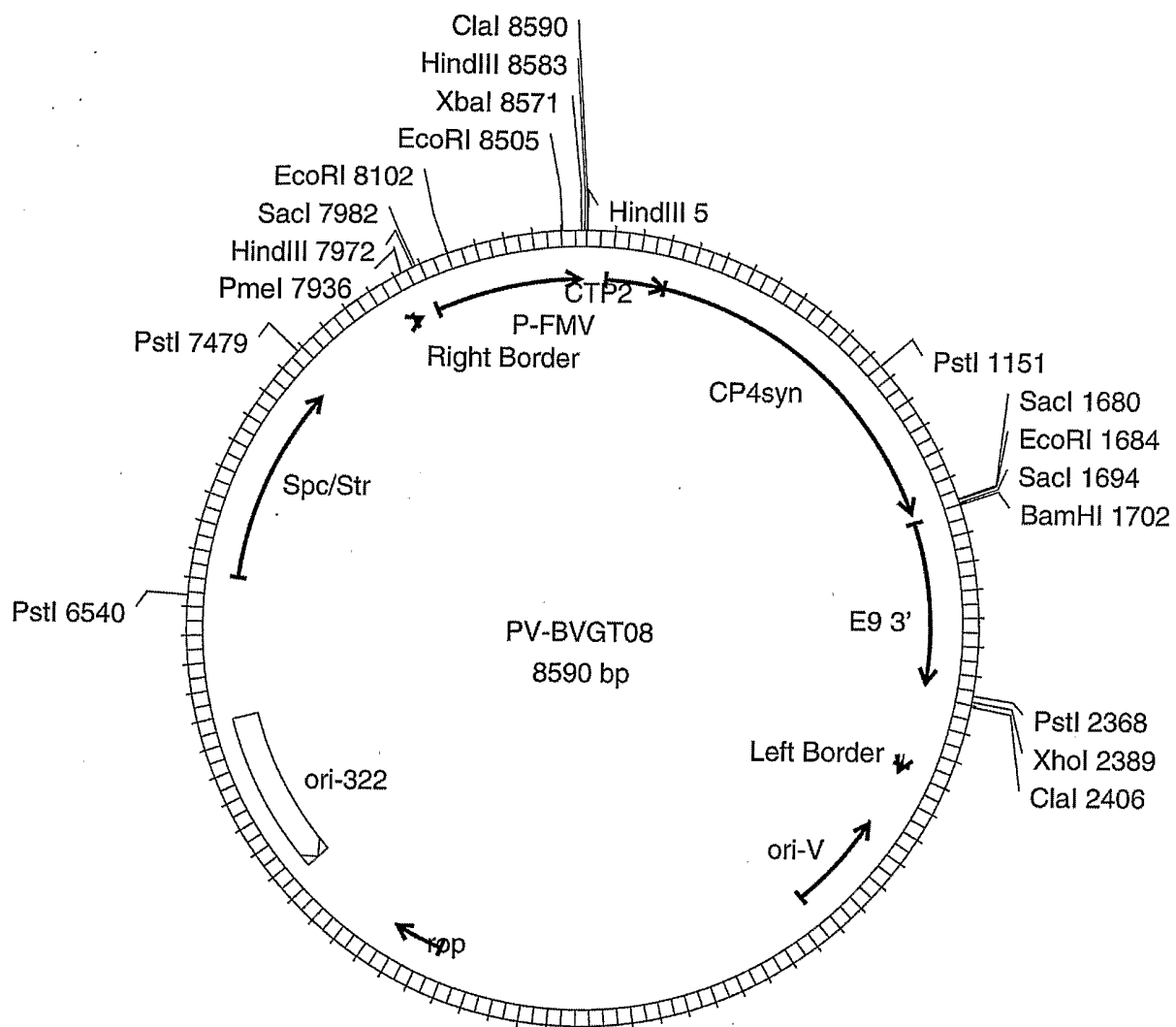


Fig. 1

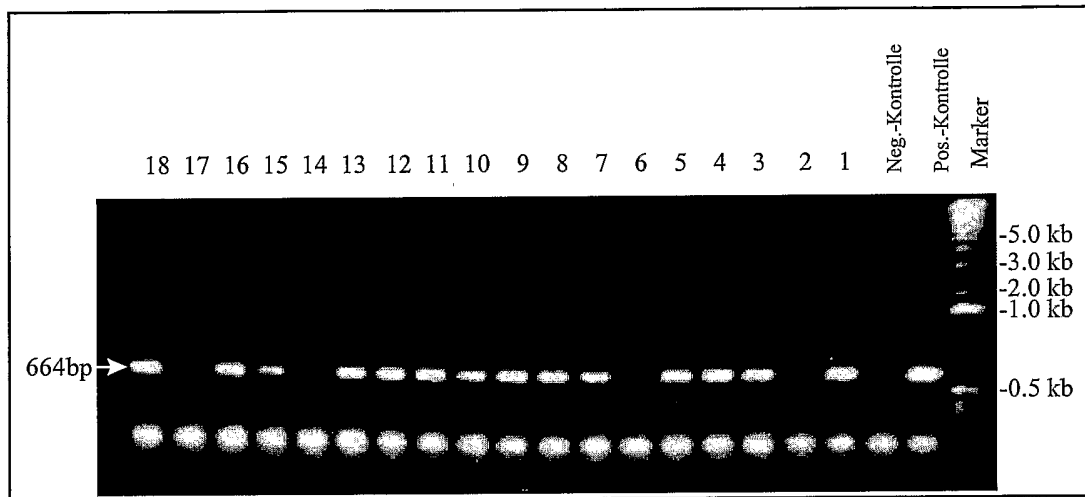


Fig. 2

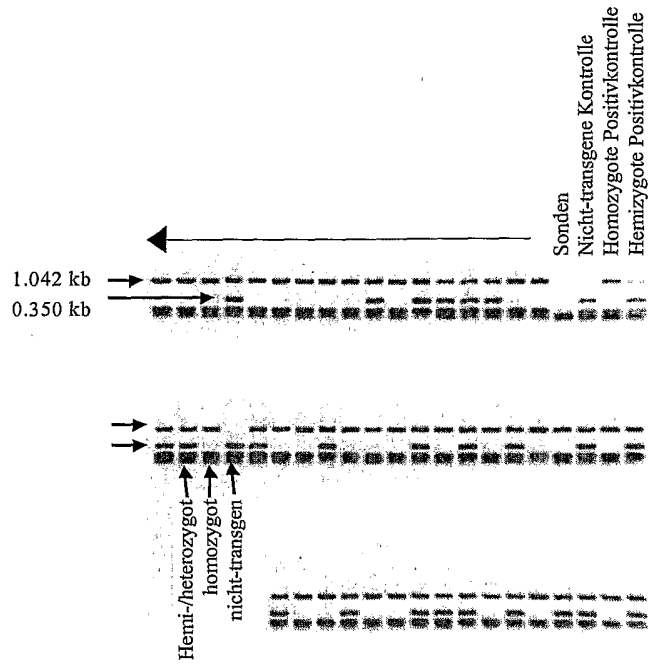


Fig. 3

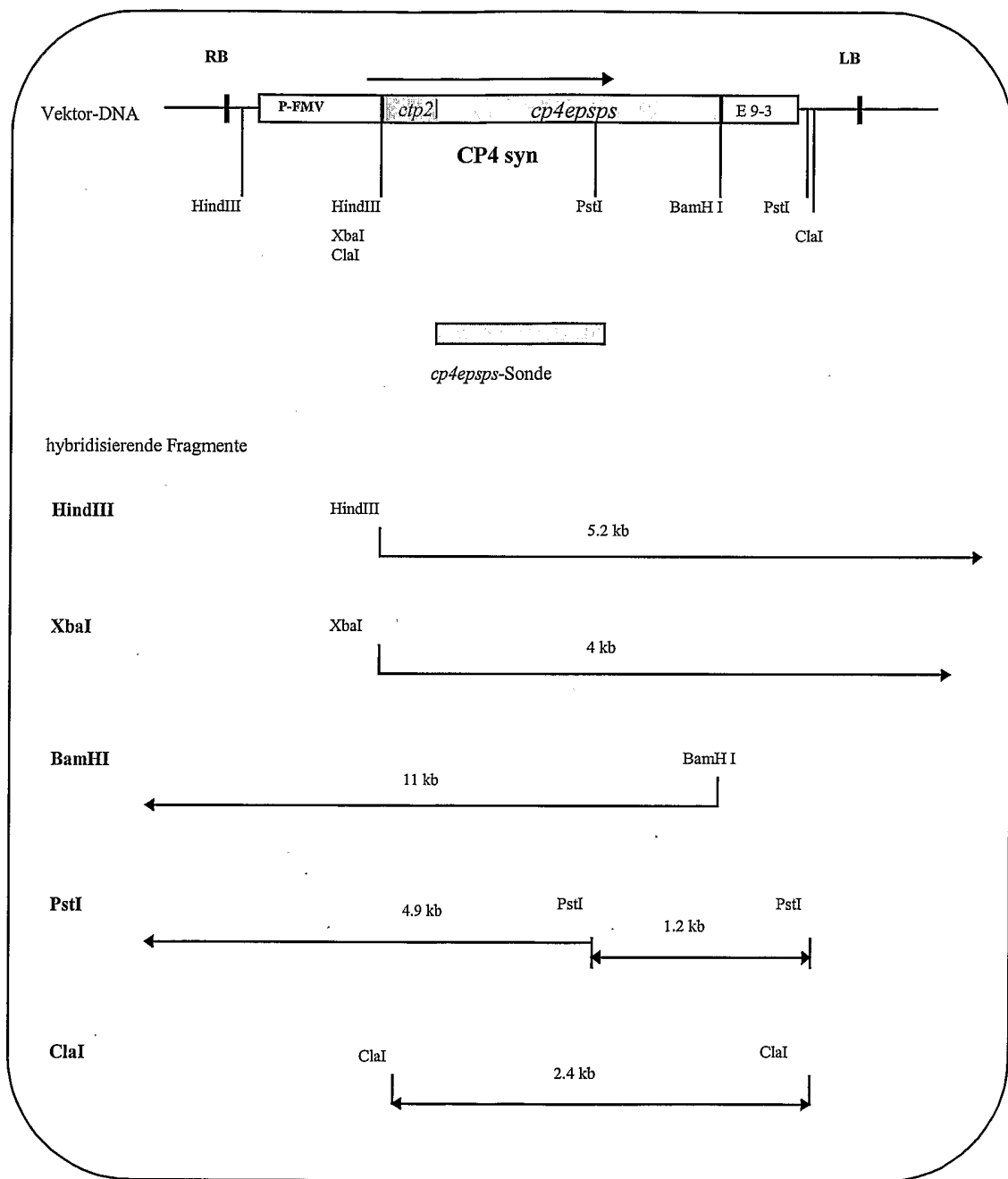


Fig. 4

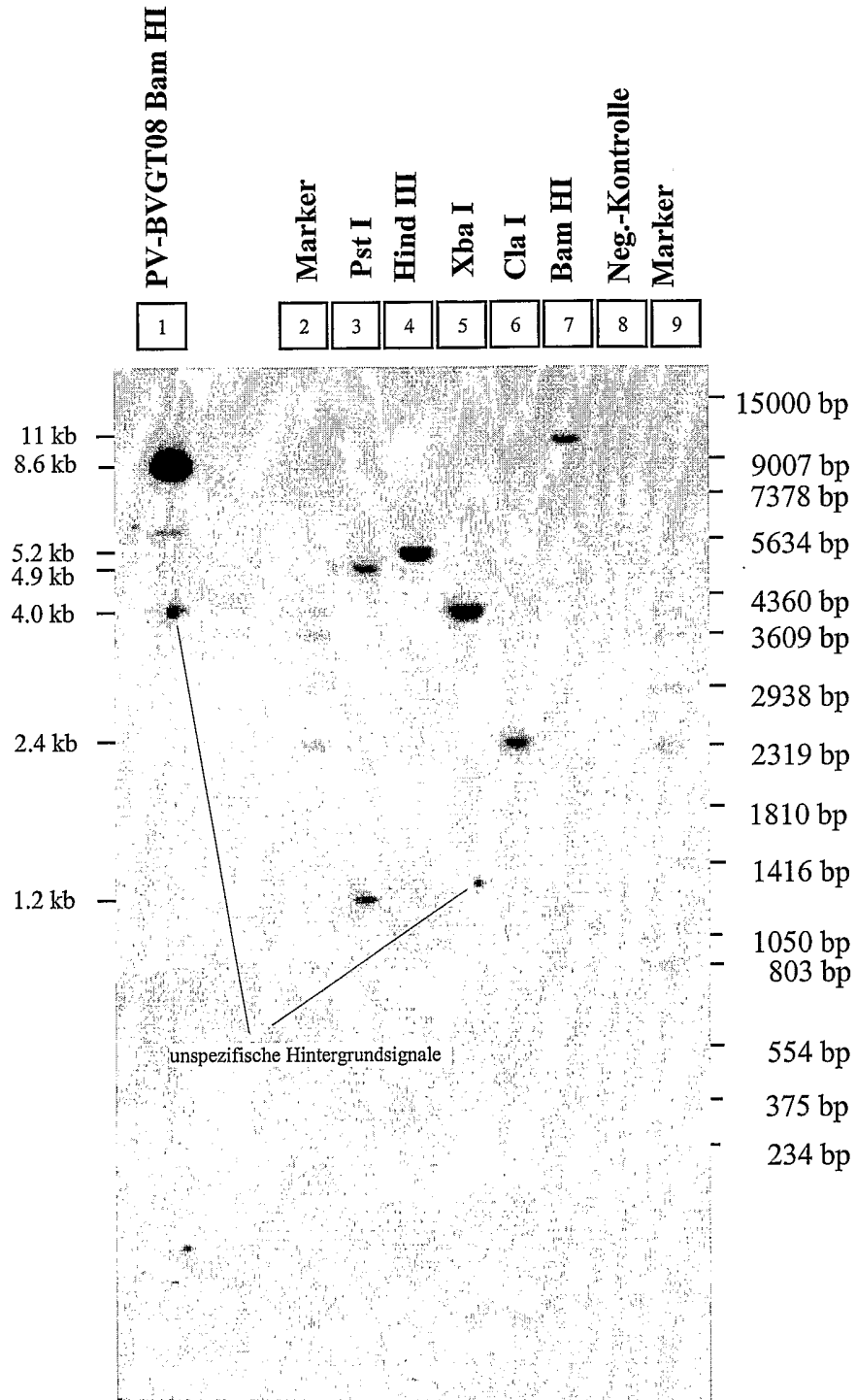


Fig. 5

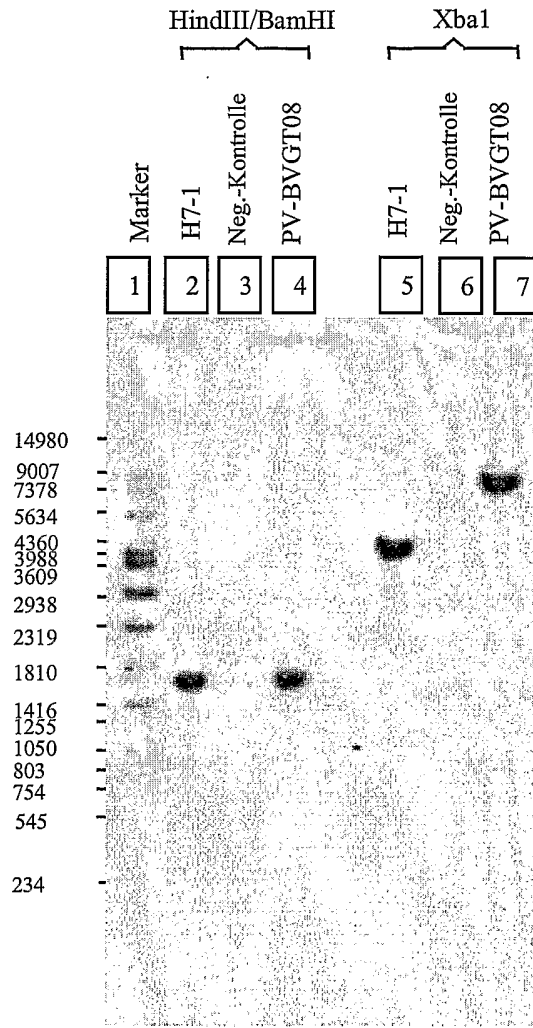


Fig. 6

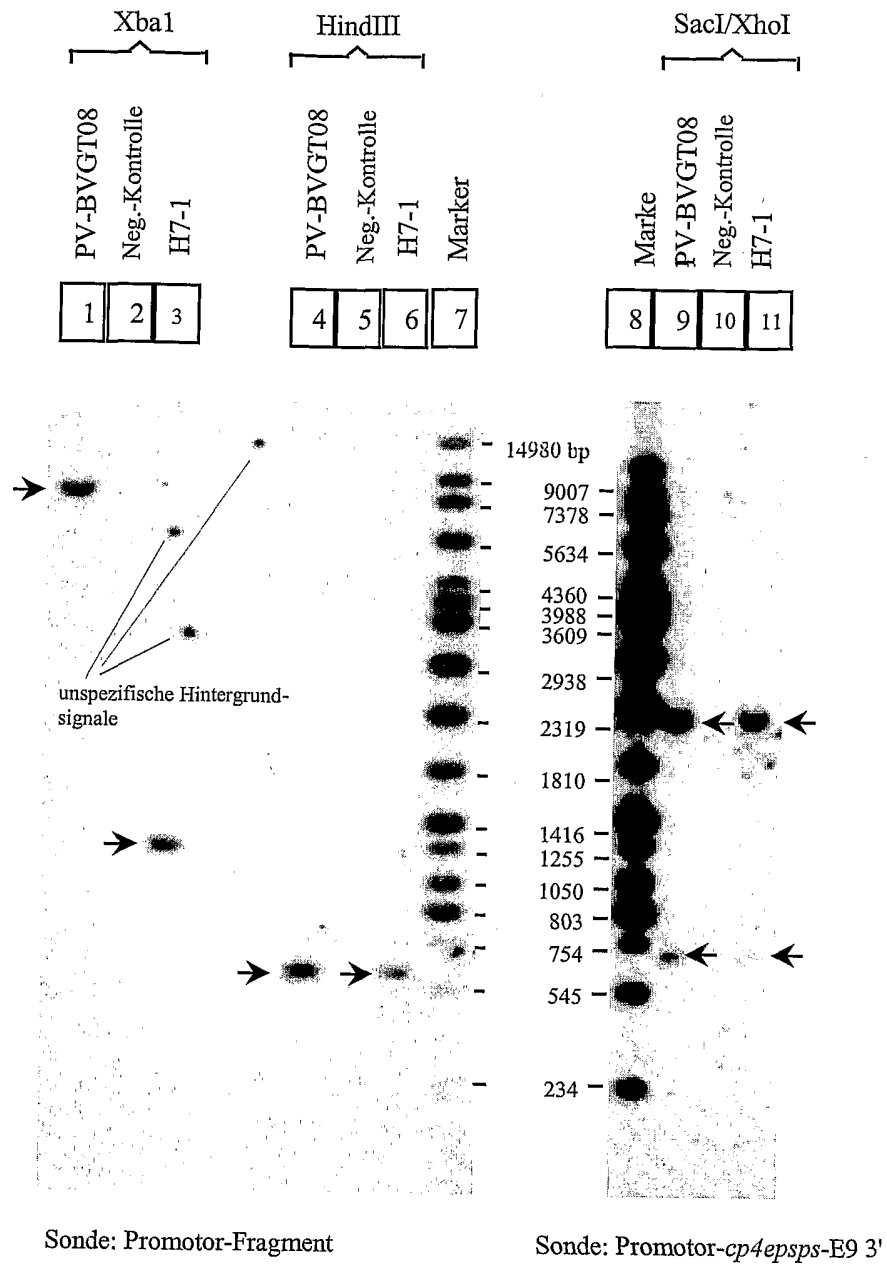


Fig. 7

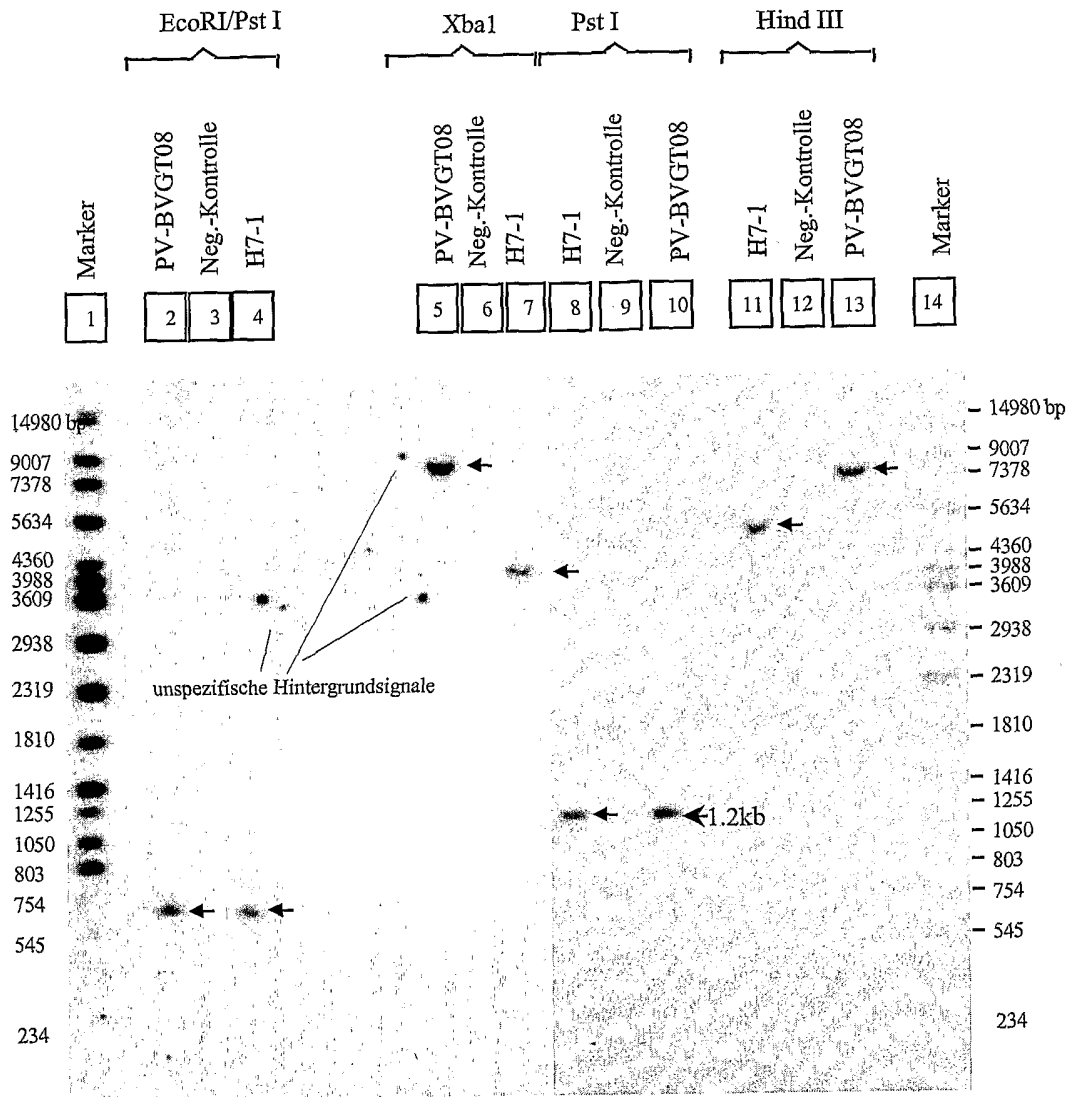


Fig. 8

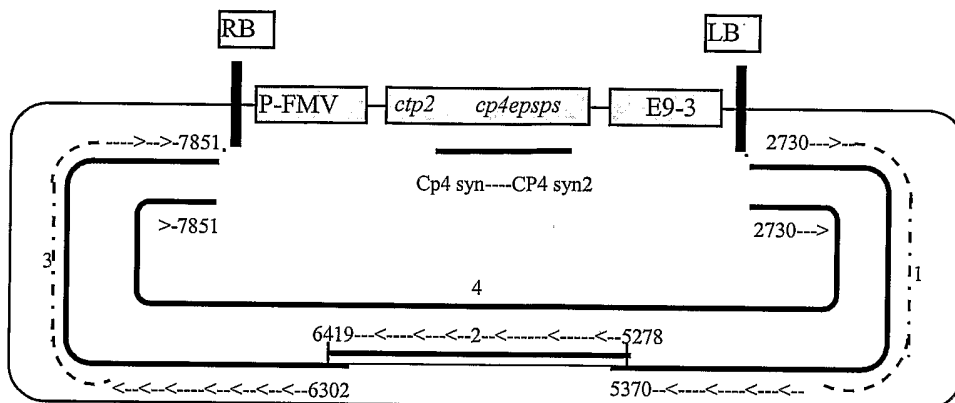


Fig. 9

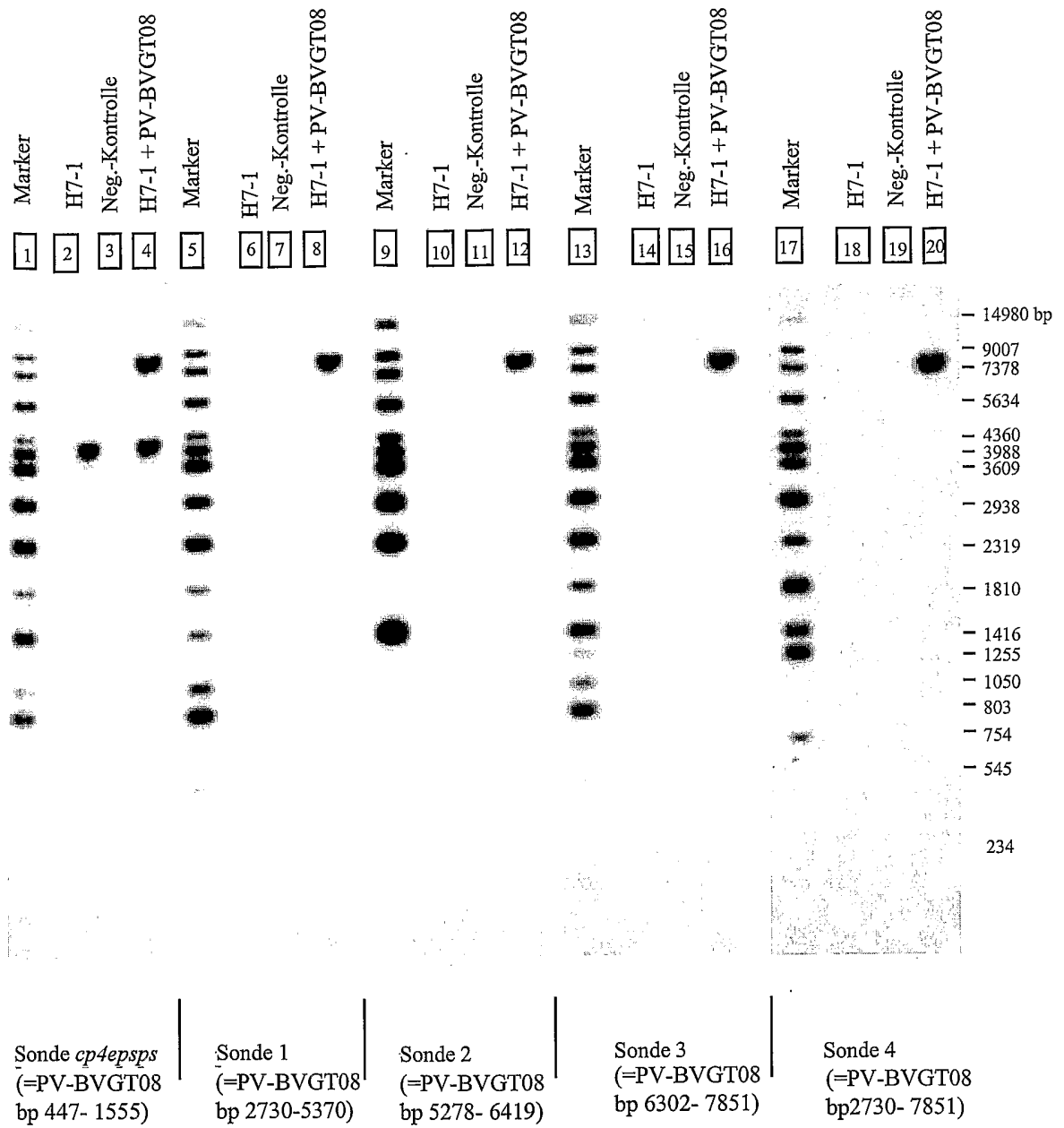


Fig. 10

GAAATAAAGA TTCCGAATT AGAATAATTT GTTTATTGCT TTCGCCTATA AATACGACGG 140
 GAAATAAAGA TTCCGAATT AGAATAATTT GTTTATTGCT TTCGCCTATA AATACGACGG 2520

ATCGTAATTT GTCGTTTTAT CAAAATGTAC TTTCATTTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 200
 ATCGTAATTT GTCGTTTTAT CAAAATGTAC TTTCATTTTA TAATAACGCT GCGGACATCT 2580

ACATTTTGA ATTGAAAAA AATTGGTAAT TACTCTTCT TTTTCTCCAT ATTGACCATC 260
 ACATTTTGA ATTGAAAAA AATTGGTAAT TACTCTTCT TTTTCTCCAT ATTGACCATC 2640

ATACTCATTG CTGATCCATG TAGATTTCCC GGACATGAAG CCATTTACAA TTGAATATAT 320
 ATACTCATTG CTGATCCATG TAGATTTCCC GGACATGAAG CCATTTACAA TTGAATATAT 2700

↓
CCTAAGTAAA ACCTCATAGG TTTTACGTAT TTCATTTAGG GACTAAAATG GTTTAGGATA 380
CCTGCCGCCG CTGCCGCTTT GCACCCGGTG GAGCTTGCAT GTTGGTTTCT ACGCAGAACT 2760
 ↑

LB-Stelle

genomische DNA

Fig. 11

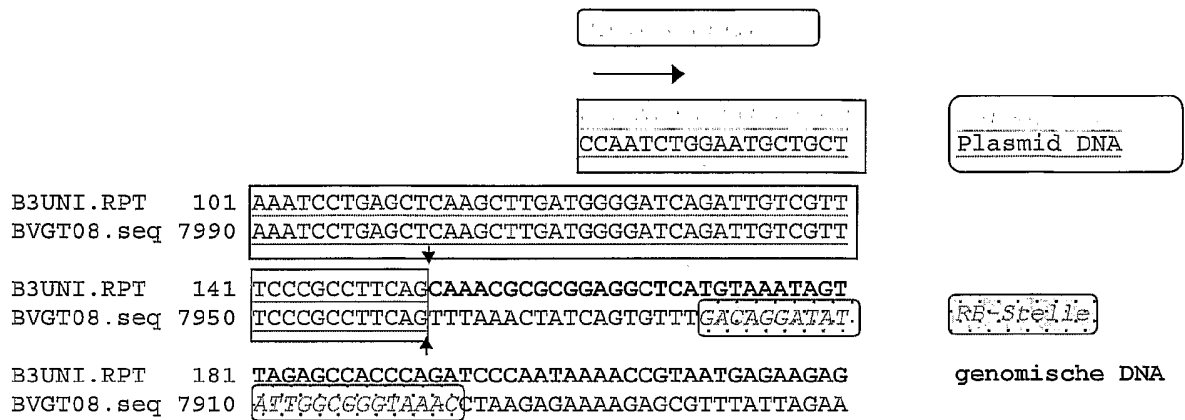


Fig. 12

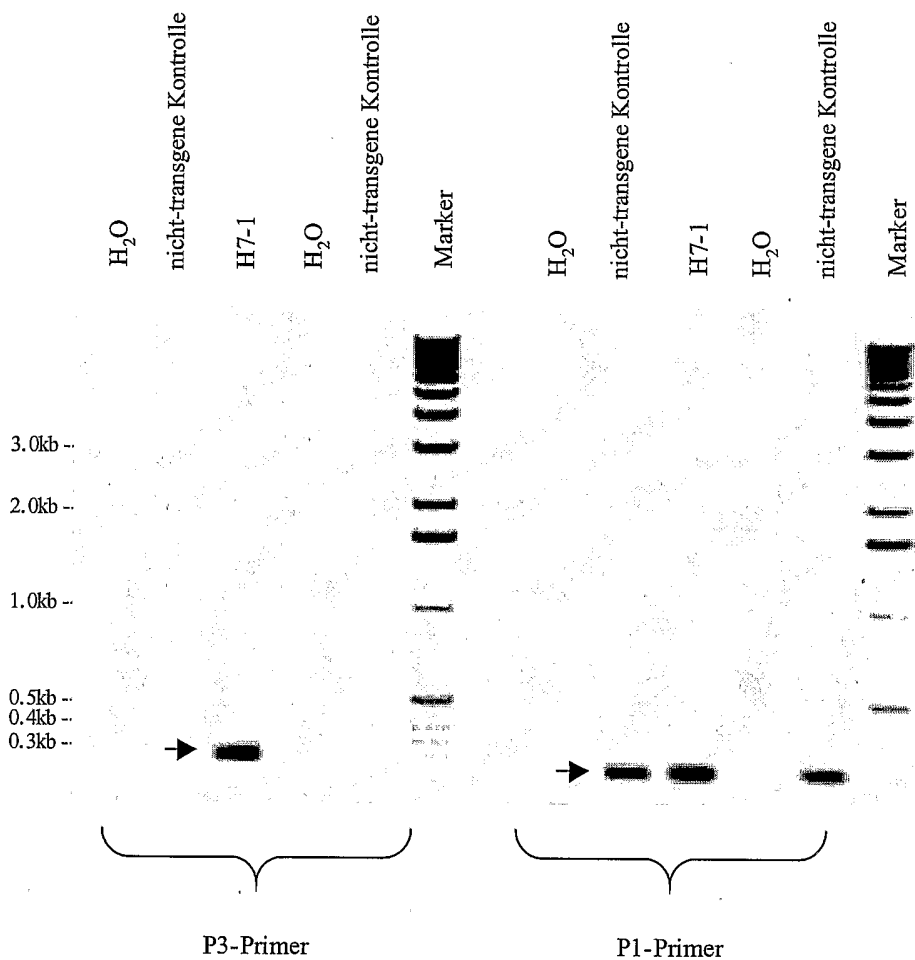


Fig. 13

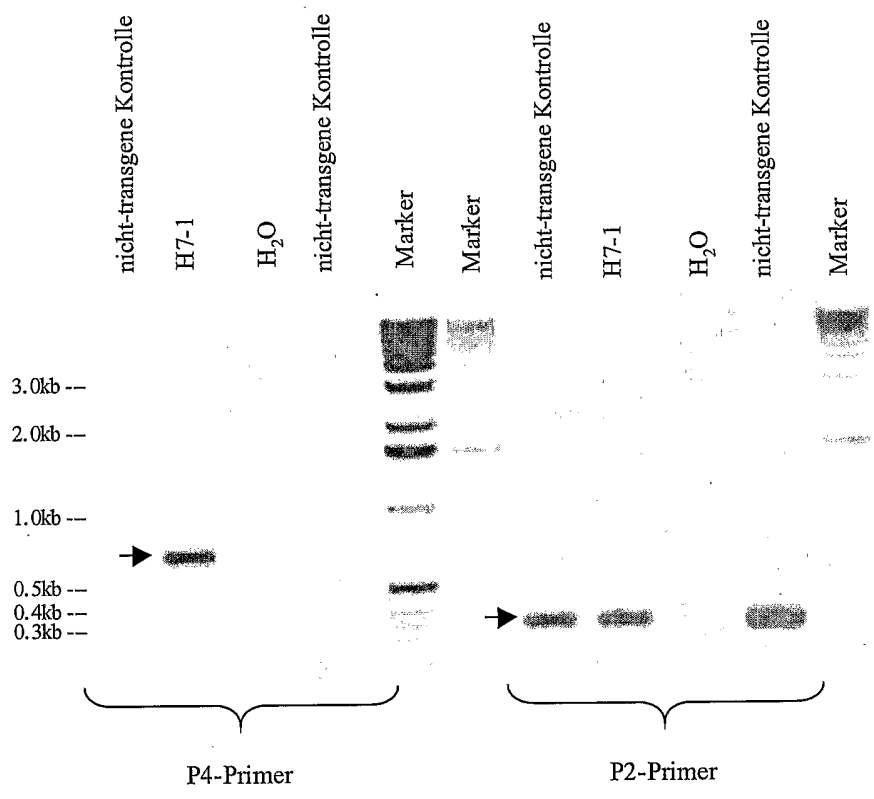


Fig. 14

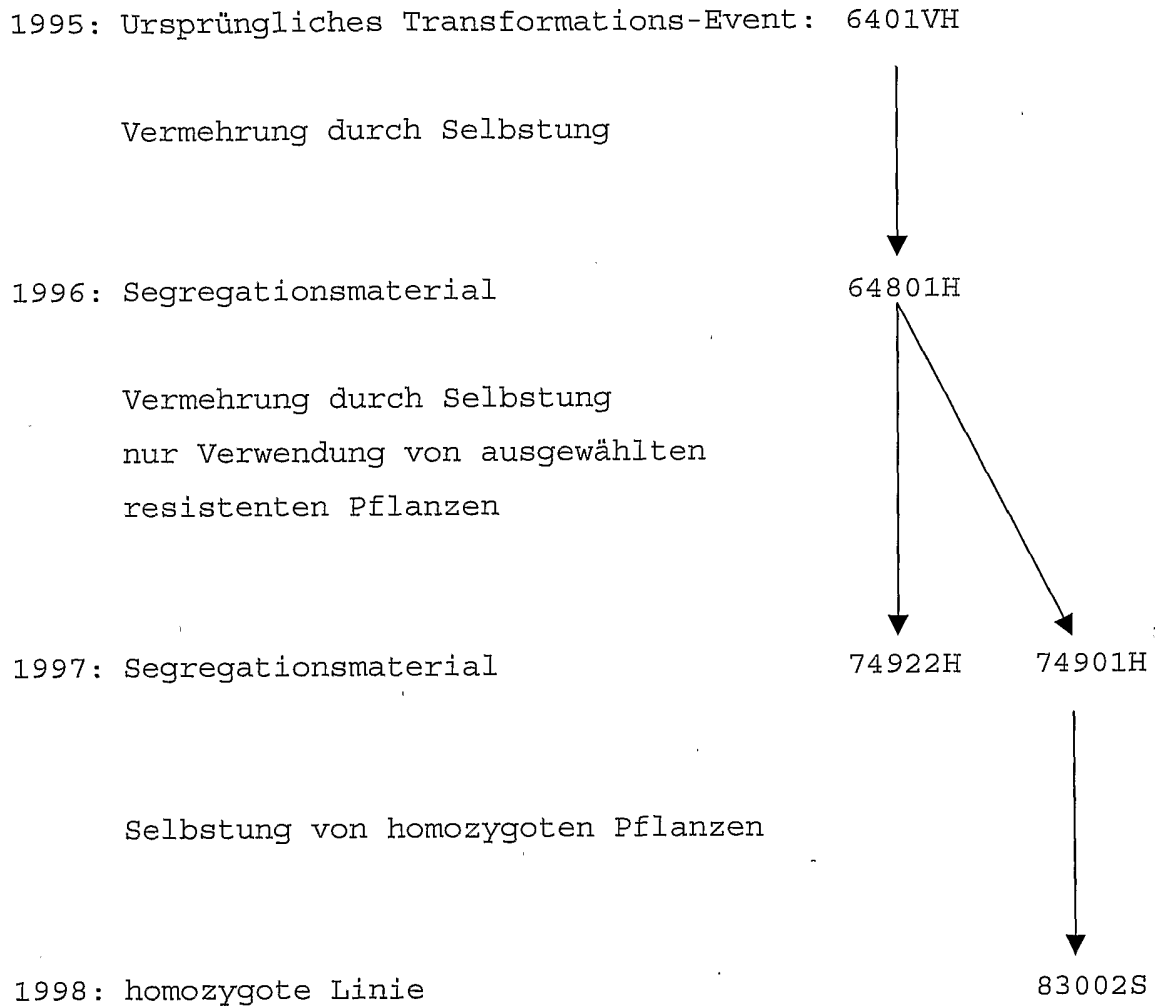


Fig. 15

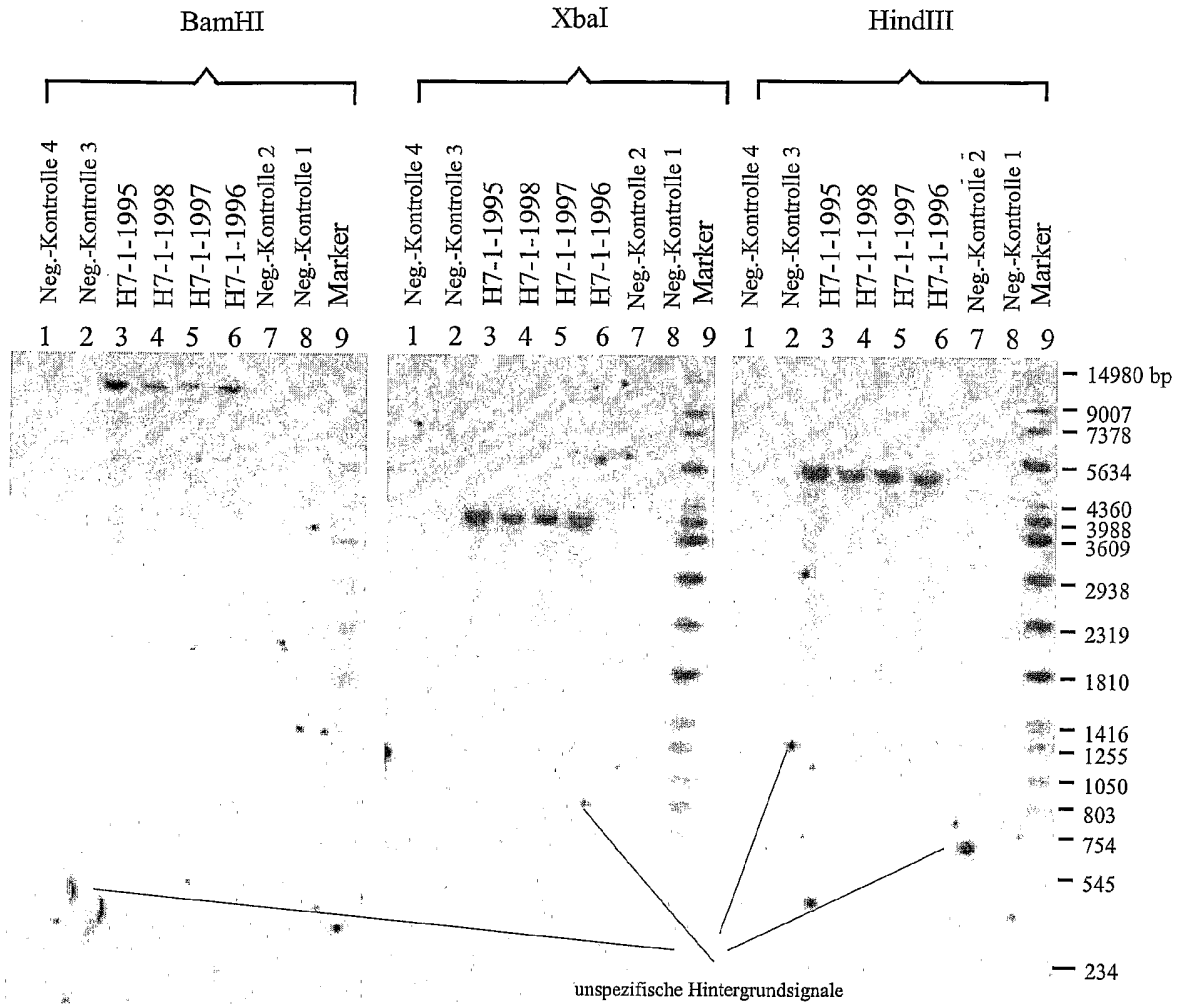


Fig. 16

**INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL**

(PCT Rule 13bis)

<p>A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>3</u> , line <u>25</u> .</p>	
<p>B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></p>	
<p>Name of depositary institution NCIMB National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Ltd.</p>	
<p>Address of depositary institution (including postal code and country) 23 St. Machar Drive Aberdeen AB2 1RY Scotland, United Kingdom</p>	
<p>Date of deposit 17.02.2003</p>	<p>Accession Number NCIMB 41158 / 41159</p>
<p>C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></p>	
<p>Die Anmelderin hat sich für die Expertenlösung entschieden. Insofern sollen für diese Anmeldung und hierauf erteilte Patente die Bestimmungen gemäß Regel 28 Absatz 4 EPÜ gelten.</p>	
<p>D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)</p>	
<p>E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)</p>	
<p>The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")</p>	

For receiving Office use only	
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	
Authorized officer	

For International Bureau use only	
<input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:	
<div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; display: inline-block;"> 12 JUN 2004 </div>	
Authorized officer	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/001469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68

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

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N A01H C12Q

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/23232 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); STEEN PER (DK); MANNE) 14 May 1999 (1999-05-14) cited in the application the whole document -----	1-14

Further documents are listed in the continuation of box C.
 Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 June 2004	03. 08. 2004

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Holtorf, S</p>
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/001469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9923232	A	14-05-1999	
		CZ 9902351 A3	15-09-1999
		DK 91699 A	28-06-1999
		WO 9923232 A1	14-05-1999
		FI 991221 A	28-05-1999
		RU 2224024 C2	20-02-2004
		SE 520353 C2	01-07-2003
		SE 9902189 A	19-08-1999
		SK 88599 A3	13-03-2000
		AU 1558099 A	24-05-1999
		DE 19881833 T0	10-02-2000
		EP 0950109 A1	20-10-1999
		GB 2337263 A	17-11-1999
		PL 334135 A1	14-02-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/001469

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N A01H C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99/23232 A (NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH ; NOVARTIS AG (CH); STEEN PER (DK); MANNE) 14. Mai 1999 (1999-05-14) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-14
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 16. Juni 2004		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 03. 08. 2004
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Holtorf, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/001469

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9923232	A	14-05-1999	CZ 9902351 A3 15-09-1999
			DK 91699 A 28-06-1999
			WO 9923232 A1 14-05-1999
			FI 991221 A 28-05-1999
			RU 2224024 C2 20-02-2004
			SE 520353 C2 01-07-2003
			SE 9902189 A 19-08-1999
			SK 88599 A3 13-03-2000
			AU 1558099 A 24-05-1999
			DE 19881833 T0 10-02-2000
			EP 0950109 A1 20-10-1999
			GB 2337263 A 17-11-1999
			PL 334135 A1 14-02-2000
