(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 38 748 T2** 2009.07.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 477 557 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 38 748.8**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 016 329.7**
(96) Europäischer Anmeldetag: **29.03.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.11.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.04.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.07.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/10*** (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

282995	**31.03.1999**	**US**
502852	**11.02.2000**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Syngenta Participations AG, Basel, CH

(74) Vertreter:
HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(72) Erfinder:
Hohn, Thomas M., Research Triangle Park N. Carolina 27709, US; Peters, Cheryl, Research Triangle Park N. Carolina 27709, US; Salmeron, John Manuel, Research Triangle Park N. Carolina 27709, US; Reed, Janet N., Research Triangle Park N. Carolina 27709, US; Dawson, John Luther, Research Triangle Park N. Carolina 27709, US

(54) Bezeichnung: **Mykotoxin-resistente transgene Pflanze und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Wirte, insbesondere transgene Pflanzen, Pflanzengewebe, Samen und Zellen, die Trichothecenresistent sind, und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Prävention und/oder Reduzierung von Pilzwachstum auf einer Pflanze, einem Pflanzengewebe, einem Samen oder einer Pflanzenzelle. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Prävention und/oder Reduzierung von Mykotoxin-Kontamination einer Pflanze, eines Pflanzengewebes oder eines Samens. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Trichothecene als selektive Mittel in Transformationsprotokollen.

[0002] Zahlreiche Pilze sind ernsthafte Schädlinge von wirtschaftlich bedeutenden landwirtschaftlichen Anbauten. Ferner ist die Kulturpflanzenkontamination durch pilzliche Toxine ein Hauptproblem für die Landwirtschaft in der Welt. Mykotoxine sind toxische pilzliche Metaboliten, die häufig in landwirtschaftlichen Produkten gefunden werden und durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet sind, Gesundheitsprobleme für Wirbeltiere zu verursachen. Trichothecene sind Sesquiterpenepoxid-Mykotoxine, die durch Arten von Fusarium, Trichothecium und Myrothecium erzeugt werden und als wirksame Inhibitoren der eukaryontischen Proteinsynthese wirken. Fusarium-Arten, die solche Trichothecene erzeugen, schließen F. acuminatum, F. crookwellense, F. culmorum, F. equiseti, F. graminearum (Gibberella zeae), F. lateritium, F. pose, F. sambucinum (G. pulicaris) und F. sporotrichioides ein (Marasas, W. F. O., Nelson, P. E. und Toussoun, T. A. 1984).

[0003] Wie zuvor beschrieben (A. E. Desjardins und T. M. Hohn, Mycotoxins in plant pathogenesis. Mol. Plant-Microbe Interact. 10 (2): 147–152, 1997), werden sowohl akute als auch chronische Mykotoxikosen in landwirtschaftlichen Nutztieren und in Menschen mit dem Verzehr von Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Reis und Mais in Verbindung gebracht, die mit Fusarium-Arten kontaminiert sind, die Trichothecen-Mykotoxine erzeugen. Experimente mit chemisch reinen Trichothecenen in niedrigen Dosierungen haben viele der Merkmale reproduziert, die bei Schimmelkorn-Toxikosen in Tieren beobachtet werden, einschließlich Anämie und Immunsuppression, Blutung, Erbrechen und Futterverweigerung. Historische und epidemiologische Daten aus menschlichen Populationen zeigen eine Verbindung zwischen bestimmten Krankheitsepidemien und dem Verzehr von Getreide, das mit Fusarium-Arten infiziert ist, die Trichothecene erzeugen. Insbesondere werden Ausbrüche einer tödlichen, als alimentäre toxische Aleukie bekannten Krankheit, die in Russland seitdem 19. Jahrhundert auftritt, mit dem Verzehr von überwintertem Getreide in Verbindung gebracht, das mit Fusarium-Arten verunreinigt ist, die das Trichothecen T-2-Toxin erzeugen. In Japan werden Ausbrüche einer ähnlichen Krankheit, die als akakabi-byo oder Rotschimmelerkrankung bezeichnet wird, mit Getreide in Verbindung gebracht, das mit Fusarium-Arten infiziert ist, die das Trichothecen, Desoxynivalenol (nachfolgendend "DON") erzeugen. Trichothecene wurden in toxischen Getreideproben detektiert, die für kürzliche menschliche Krankheitsausbrüche in Indien und Japan verantwortlich waren. Es besteht deshalb ein Bedarf an landwirtschaftlichen Verfahren zur Prävention von Mykotoxin-Kontamination und Anbauten mit reduzierten Mengen einer solchen Kontamination von.

[0004] Ferner sind Trichothecen-erzeugende Fusarium-Arten destruktive Pathogene und greifen einen weiten Bereich von Pflanzenarten an. Die akute Phytotoxizität von Trichothecenen und ihr Auftreten in Pflanzengeweben legen ebenfalls nahe, daß diese Mykotoxine eine Rolle in der Pathogenese von Fusarium auf Pflanzen spielen. Dies impliziert, daß Mykotoxine eine Rolle in der Krankheit spielen, und deshalb kann die Reduzierung ihrer Toxizität für die Pflanze auch die Krankheit in der Pflanze verhindern oder reduzieren. Ferner kann die Reduktion der Erkrankungsstärke den zusätzlichen Nutzen der Reduzierung der Mykotoxin-Kontamination auf der Pflanze und insbesondere in Getreide haben, wenn die Pflanze eine Getreidepflanze ist.

[0005] Verschiedene Verfahren zur Bekämpfung von Krankheiten in Pflanzen wie Maiskolbenfäule, Stengelfäule oder Weizen-Weißährigkeit wurden mit verschiedenen Erfolgsgraden verwendet. Ein Verfahren zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheit besteht im Ausbringen einer antimikrobiellen Chemikalie auf die Kulturpflanzen. Dieses Verfahren hat zahlreiche fachlich anerkannte Probleme. Alternativ beinhaltet ein neueres Verfahren die Verwendung von biologischen Kontrollorganismen ("biologische Bekämpfung"), die natürliche Konkurrenten oder Inhibitoren des Schädlingsorganismus sind. Es ist jedoch schwierig, biologische Bekämpfung auf großen Flächen anzuwenden, und noch schwieriger, diese lebenden Organismen dazu zu bringen, in der behandelten Fläche für einen ausgedehnten Zeitraum zu verbleiben. In neuerer Zeit haben Techniken der rekombinanten DNA die Möglichkeit bereitgestellt, in Pflanzenzellen klonierte Gene zu inserieren, de antimikrobielle Verbindungen exprimieren. Jedoch hat diese Technologie zu Bedenken über eine eventuelle mikrobielle Resistenz gegen wohlbekannte, natürlich vorkommende Antimikrobiotika geführt. Deshalb besteht ein fortgesetzter Bedarf an der Identifizierung von natürlich vorkommenden antimikrobiellen Mitteln wie Proteinen, die durch Pflanzenzellen direkt durch Translation eines einzelnen Gens gebildet werden können.

[0006] Eine Trichothecen-3-O-acetyltransferase, die die Acetylierung einer Anzahl unterschiedlicher Fusarium-Trichothecene, einschließlich DON, an der C3-Hydroxyl-Gruppe katalysiert, wurde in Fusarium sporotrichioides identifiziert (S. P. McCormick, N. J. Alexander, S. C. Trapp und T. M. Hohn. Disruption of TRI101, the gene encoding trichothecene 3-O-acetyltransferase, from Fusarium sporotrichioides. Applied. Environ. Microbiol. 65 (12): 5252–5256, 1999). Die Acetylierung von Trichothecenen am C3-OH reduziert ihre Toxizität in Wirbeltieren und Pflanzen signifikant und führt zum Reaktionsprodukt 3-Acetyldesoxynivalenol (nachfolgend "3ADON"). Siehe Kimura et al. unten.

[0007] Die Sequenz von strukturellen Genen, die Trichothecen-3-O-acetyltransferase codieren, aus Fusarium graminearum, Fusarium sporotrichioides sowie Sequenzen anderer Orthologe wurden veröffentlicht. Siehe z. B. Kimura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 62 (5) 1033–1036 (1998) und Kimura et al., FEBS Letters, 435, 163–168 (1998). Ferner wurde spekuliert, daß das Gen aus Fusarium sporotrichioides, das eine Trichothecen-3-O-acetyltransferase codiert, nützlich in der Entwicklung von Pflanzensorten mit erhöhter Resistenz gegen Fusarium sein kann. Siehe z. B. Hohn, T. M. et al. Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Diesease, 17–24 (1998) und Kimura et al. J. Biological Chemistry, 273 (3) 1654–1661 (1998).

[0008] Vor der vorliegenden Erfindung machten es jedoch viele Unsicherheiten bei weitem nicht naheliegend, ob die Expression von Trichothecen-3-O-acetyltransferasen in einer Pflanze tatsächlich zu Trichothecen-resistenten Pflanzen führen würde. Zum Beispiel ist die durch die Fusarium sporotrichoides Trichothecen-3-O-acetyltransferase katalysierte Reaktion reversibel und könnte deshalb im Schützen von Pflanzenzellen vor Trichothecenen wie DON versagt haben. Es war ebenfalls unsicher, ob es vielleicht Esterasen in Pflanzenzellen geben könnte, die mit den 3-O-Acetyltransferase-Aktivitäten zur Erzeugung von toxischem DON aus 3ADON konkurrieren würden. Es war ebenfalls unsicher, wie der Metabolismus des Reaktionsprodukts 3ADON die Pflanze beeinflussen könnte, z. B. ob die Einführung der Trichothecen-3-O-acetyltransferase das Pflanzenwachstum und die Entwicklung in Weisen verändern würde, die einen etwaigen positiven Beitrag der Acetyltransferase ins Negative umkehren würden, z. B. durch Wechselwirkung mit den natürlichen Krankheitsresistentzmechanismen der Pflanze. Es war ebenfalls unsicher, ob 3ADON durch die Pflanze unter Bildung eines neuen sekundären Metaboliten mit toxischen Wirkungen metabolisiert werden konnte. Es war ebenfalls unsicher, selbst falls das durch einen eindringenden Pilz erzeugte DON wirksam zu 3ADON umgewandelt würde, ob diese Umwandlung der Pflanze eine gesteigerte Pathogenresistenz verleihen würde. Die obigen sind nur einige der Unsicherheiten auf diesem Gebiet vor dem Zeitpunkt der vorliegenden Erfindung.

[0009] Es ist eine Aufgabe der Erfindung, eine Pflanzenzelle oder -zellen bereitzustellen, die ein heterologes Polynukleotid umfaßt, das ein Genprodukt codiert, das in der Pflanzenzelle exprimiert wird, worin das Genprodukt Trichothecen-Resistenzaktivität umfaßt.

[0010] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze bereitzustellen, die die vorstehend beschriebene Pflanzenzelle umfaßt, worin die Pflanze resisten gegen ein Trichothecen ist.

[0011] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die resistenz gegen ein Trichothecen ist, wobei das Trichothecen eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt.

[0012] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die resistent gegen einen Pilz ist, der ein Trichothecen erzeugt, vorzugsweise ein Trichothecen, das eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt.

[0013] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die resistent gegen Fusarium, Trichothecium oder Myrothecium ist.

[0014] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die resistent gegen Fusarium ist, insbesondere, jedoch nicht einschränkend, gegen Fusarium graminearum, Fusarium culmorum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium pose, Fusarium sambucinum, Fusarium equiseti, Fusarium acuminatum, Fusarium lateritium und Fusarium pseudograminearum.

[0015] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin die Pflanze resistent gegen Fusarium graminearum ist.

[0016] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die ein heterologes Polynukleotid umfaßt, das ein Genprodukt codiert, das in der Pflanzenzelle exprimiert wird, worin das Genprodukt Trichothecen-Resistenzaktivität umfaßt, worin das heterologe Polynukleotid ein mikrobielles Poly-

nukleotid ist, vorzugsweise eine Polynukleotid aus Hefe oder Pilz.

[0017] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin das Polynukleotid aus Pilz ein Fusarium-Polynukleotid ist, vorzugsweise ein Polynukleotid aus Fusarium graminearum oder Fusarium sporotrichioides.

[0018] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin das heterologe Polynukleotid eine Sequenz umfaßt, die im wesentlichen gleich zur Nukleinsäuresequenz der SEQ ID NOs: 1, 5 oder 7 ist.

[0019] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin das heterologe Polynukleotid die Nukleinsäuresequenz des SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 oder Homologe davon umfaßt.

[0020] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanzen der Erfindung bereitzustellen, die ein heterologes Polynukleotid umfaßt, das einen fortlaufenden Teil von wenigstens 80 Basenpaaren umfaßt, der identisch in der Sequenz zu einem fortlaufenden Teil von 80 Basenpaaren ist, der in SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 dargelegt ist, vorzugsweise ein fortlaufender Teil von wenigstens 50 Basenpaaren, der identisch in der Sequenz zu einem fortlaufenden Teil von 50 Basenpaaren ist, der in SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 dargelegt ist, und besonders bevorzugt ein fortlaufender Teil von wenigstens 21 Basenpaaren, der identisch in Sequenz zu einem fortlaufenden Teil von 21 Basenpaaren ist, der in SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 dargelegt ist, und am meisten bevorzugt ein fortlaufender Teil von 18 Basenpaaren, der identisch in Sequenz zu einem fortlaufenden Teil von 18 Basenpaaren ist, der in SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 dargelegt ist.

[0021] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze bereitzustellen, die gegen ein Trichothecen resistent ist, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus T-2-Toxin, HT-2-Toxin, Isotrichodermol, 4,15-Diacetoxyscirpenol (nachstehend "DAS"), 3-Deacetylcalonectrin, 3,15-Dideacetylcalonectrin, Scirpentriol, Neosolaniol; Typ B: 15-Acetyldesoxynivalenol, Nivalenol, 4-Acetylnivalenol (Fusarenon-X), 4,15-Diacetylnivalenol, 4,7,15-Acetylnivalenol und DON besteht.

[0022] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, die gegen DAS oder DON resistent ist.

[0023] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze bereitzustellen, worin das Genprodukt durch ein erfindungsgemäßes Polynukleotid codiert wird.

[0024] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin das Genprodukt eine 3-O-Acetyltransferase ist.

[0025] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pflanze der Erfindung bereitzustellen, worin das Genprodukt ein Polypeptid ist, das eine Sequenz umfaßt, die im wesentlichen ähnlich zu der SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 ist.

[0026] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Saatgut jeder der erfindungsgemäßen Pflanzen bereitzustellen.

[0027] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, jede der zuvor beschriebenen Pflanzen bereitzustellen, worin die Pflanze eine Weizen-, Mais-, Gerste- oder Reispflanze ist.

[0028] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Erzeugen einer Trichothecen-resistenten Pflanze bereitzustellen, das die folgenden Schritte umfaßt:

(a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einem heterologen Gen, das ein Genprodukt codiert, worin das Genprodukt die Resistenz gegen ein Trichothecen erhöht; und
(b) exprimieren des Genprodukts auf einem biologisch signifikanten Niveau;
(c) Regenerieren der Pflanzenzelle zu einer Pflanze; und
(d) Selektieren einer Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegen ein Trichothecen.

[0029] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein wie vorstehend beschriebenes Verfahren bereitzustellen, das ferner den Schritt des Selektierens einer Pflanze umfaßt, auf der ein reduziertes Wachstum eines Pilzes vorliegt, wobei der Pilz ein Trichothecen erzeugt.

[0030] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein wie vorstehend beschriebenes Verfahren bereitzustellen, worin der Pilz aus der Gattung Fusarium ist.

[0031] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Trichothecenresistente Pflanze bereitzustellen, die gemäß den vorstehend beschriebenen Verfahren erhältlich ist.

[0032] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Saatgut bereitzustellen, das durch Selbsten oder Auskreuzen einer Pflanze der Erfindung, wie vorstehend beschrieben, erzeugt wird, worin eine aus dem Saatgut kultivierte Pflanze eine erhöhte Resistenz gegen Trichothecen aufweist.

[0033] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Prävention von Mycotoxin-Kontamination einer Pflanze, einschließlich eines Pflanzensaatguts, bereitzustellen, das das Kultivieren einer Pflanze der Erfindung, wie vorstehend beschrieben, umfaßt, vorzugsweise in einem Gebiet mit moderatem bis schwerem Pilzbefall, worin die Pflanze vorzugsweise eine Kulturpflanze ist.

[0034] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Prävention von Pilzwachstum auf einer Pflanze bereitzustellen, bevorzugt das Wachstum eines Pilzes der Gattung Fusarium, das das Kultivieren einer Pflanze der Erfindung umfaßt, der ein Trichothecen erzeugt, vorzugsweise ein Trichothecen, das wie vorstehend beschrieben eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt, vorzugsweise in einem Gebiet mit moderatem bis schwerem Pilzbefall, worin die Pflanze vorzugsweise eine Kulturpflanze ist.

[0035] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Erzeugen einer Pilz-resistenten Pflanze bereitzustellen, das folgendes umfaßt:

(a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einem heterologen Gen, das ein Genprodukt codiert, worin das Genprodukt die Resistenz gegen ein Trichothecen erhöht;
(b) Exprimieren des Genprodukts auf einem biologisch signifikanten Niveau;
(c) Regenerieren der Pflanzenzelle zu einer Pflanze; und
(d) Selektieren einer Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen ein Trichothecen; und
(e) optionales Selbsten oder Auskreuzen der in Schritt (d) erhaltenen Pflanze.

[0036] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, worin der Pilz aus der Gattung Fusarium ist.

[0037] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Erzeugen eines Saatguts bereitzustellen, worin die Pflanze, die aus dem Saatgut kultiviert wird, Pilz-resistent ist, wobei das Verfahren das Selbsten oder Auskreuzen der Pflanze der Erfindung umfaßt.

[0038] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, das vorstehende Verfahren bereitzustellen, worin das Saatgut resistent gegen einen Pilz aus der Gattung Fusarium ist.

[0039] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Selektion von transformierten Wirtszellen bereitzustellen, wobei das Verfahren folgendes umfaßt:
Transformieren einer Wirtszelle mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das eine Trichothecen-3-O-acetyltransferase codiert, und
Kultivieren der transformierten Wirtszelle in Gegenwart eines Trichothecen-selektiven Mittels.

[0040] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Selektieren von transformierten Wirtszellen bereitzustellen, worin die Wirtszellen Pflanzenzellen oder mikrobielle Zellen sind, insbesondere worin die mikrobiellen Zellen Pilzzellen sind.

[0041] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Selektieren von transformierten Wirtszellen, wie vorstehend beschrieben, bereitzustellen, worin die Wirtszelle ferner mit einem zweiten Polynukleotid von Interesse transformiert ist.

[0042] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zum Selektieren von transformierten Wirtszellen bereitzustellen, worin das Trichothecen aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus T-2-Toxin, HT-2-Toxin, Isotrichodermol, DAS, 3-Desacetylcalonectrin, 3,15-Didesacetylcalonectrin, Scirpentriol, Neosolaniol; Typ B: 15-Acetyldesoxynivalenol, Nivalenol, 4-Acetylnivalenol (Fusarenon-X), 4,15-Diacetylnivalenol, 4,7,15-Acetylnivalenol und DON besteht.

[0043] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Trichothecenresistente Pflanze bereitzustellen, die durch das Verfahren der Erfindung erhalten wird.

[0044] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Pilz-resistente Pflanze bereitzustellen, die durch das Verfahren der Erfindung erhalten wird.

[0045] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, ein Pflanzensaatgut bereitzustellen, das durch das Verfahren der Erfindung erhalten wird.

[0046] Zur Klarheit werden bestimmte, in der Beschreibung verwendete Begriffe wie folgt definiert und dargestellt:
"Expression" bezeichnet die Transkription und/oder Translation eines endogenen Gens oder eines Transgens in Pflanzen. Im Falle von antisense-Konstrukten kann Expression z. B. allein die Transkription der Antisense-DNA bezeichnen.

[0047] "Funktionsfähig verbunden/assoziiert" bei Bezugnahme auf eine regulatorische DNA-Sequenz, die "funktionsfähig verbunden ist mit" oder "assoziiert ist mit" einer DNA-Sequenz, die für eine RNA oder ein Protein codiert, bezeichnet die zwei Sequenzen, die so lokalisiert sind, daß die regulatorische DNA-Sequenz die Expression der codierenden DNA-Sequenz beeinflusst.

[0048] Der Begriff "heterologes Polynukleotid" oder "heterologe DNA", wie hier verwendet, bezeichnet jeweils ein Nukleinsäuremolekül, das nicht natürlich mit einer Wirtszelle assoziiert ist, in die es eingeführt wird, einschließlich genetischer Konstrukte, nicht-natürlich vorkommender multipler Kopien eines natürlich vorkommenden Nukleinsäuremoleküls; und eines ansonsten homologen Nukleinsäuremoleküls, das funktionsfähig mit einem nicht-nativen Nukleinsäuremolekül verbunden ist. Somit schließt ein heterologes Gen in einer Wirtszelle ein Gen ein, das endogen für die besondere Wirtszelle ist, aber durch z. B. Verwendung von DNA-Shuffling modifiziert wurde. Somit umfassen die Begriffe ein DNA-Segment, das fremd oder heterolog für die Zelle ist oder homolog für die Zelle ist, aber in einer Position innerhalb der Wirtszell-Nukleinsäure ist, in der das Element nicht gewöhnlich gefunden wird.

[0049] Die Begriffe "Nukleinsäure" oder "Polynukleotid" bezeichnen Desoxyribonukleotide oder Ribonukleotide und Polymere davon in entweder einzel- oder doppelsträngiger Form. Wenn nicht spezifisch darauf beschränkt, umfaßt der Begriff Nukleinsäuren, die bekannte Analoga von natürlichen Nukleotiden enthalten, die ähnliche Bindungseigenschaften wie die Referenz-Nukleinsäure haben und in einer Weise metabolisiert werden, die ähnlich den natürlich vorkommenden Nukleotiden ist. Wenn nicht anders angegeben, umfaßt eine besondere Nukleinsäuresequenz auch implizit konservativ modifizierte Varianten davon (z. B. degenerierte Codon-Substitutionen) und komplementäre Sequenzen sowie die explizit angegebene Sequenz. Spezifisch können degenerierte Codon-Substitutionen durch Erzeugung von Sequenzen erreicht werden, in den die dritte Position eines oder mehrerer ausgewählter (oder aller) Codonen mit gemischten Basen- und/oder Desoxyinosin-Resten substituiert ist (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260: 2605–2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8: 91–98 (1994)). Die Begriffe "Nukleinsäure" oder "Nukleinsäuresequenz" oder "Polynukleotid" können auch austauschbar mit Gen, cDNA und mRNA, die durch ein Gen codiert wird, verwendet werden.

[0050] In seinem breitesten Sinn bedeutet der Begriff "im wesentlichen ähnlich", wenn hier in Bezug auf ein Nukleinsäuremolekül verwendet, ein Nukleinsäuremolekül, das einer Referenz-Nukleotidsequenz entspricht, worin das entsprechende Nukleinsäuremolekül ein Polypeptid mit im wesentlichen der gleichen Struktur und Funktion wie das durch die Referenz-Nukleotidsequenz codierte Polypeptid codiert, z. B. wenn nur Veränderungen in Aminosäuren, die nicht die Polypeptidfunktion beeinflussen, auftreten. Wünschenswert codiert das im wesentlichen ähnliche Nukleinsäuremolekül das durch die Referenz-Nukleotidsequenz codierte Polypeptid. Der Begriff "im wesentlichen ähnlich" soll spezifisch Nukleinsäuremoleküle einschließen, in denen die Sequenz modifiziert wurde, um die Expression in besonderen Zellen, z. B. in Pflanzenzellen, zu optimieren. Der Prozentwert der Identität zwischen dem im wesentlichen ähnlichen Nukleinsäuremolekül und der Referenz-Nukleotidsequenz ist wünschenswert wenigstens 45%, besonders wünschenswert wenigstens 65%, besonders wünschenswert wenigstens 75%, vorzugsweise wenigstens 85%, besonders bevorzugt wenigstens 90%, noch mehr bevorzugt wenigstens 95%, noch mehr bevorzugt wenigstens 99%. Bevorzugt existiert der Prozentwert der Identität über eine Region der Sequenzen, die wenigstens ca. 50 Reste lang ist, besonders bevorzugt über eine Region von wenigstens ca. 100 Resten, und am meisten bevorzugt sind die Sequenzen im wesentlichen ähnlich über wenigstens ca. 150 Reste. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform sind die Sequenzen im wesentlichen ähnlich über die gesamte Länge der codierenden Regionen. Sequenzvergleiche können

unter Verwendung eines Smith-Waterman-Sequenzangleichungsalgorithmus und wie nachfolgend in größerem Detail beschrieben durchgeführt werden (siehe z. B. M. S. Waterman, Introduction to Computational Biology: Maps, sequences und genomes. Chapman & Hall. London: 1995. ISBN 0-412-99391-0, oder in http://www-hto.usc.edu/software/seqaln/index.html). Das lokale S-Programm, Version 1.16, wird mit den folgenden Parametern verwendet: Übereinstimmung: 1, Fehlübereinstimmungsstrafe: 0,33, offene Lückenstrafe: 2, ausgedehnte Lückenstrafe: 2.

[0051] Ein anderer Hinweis, daß eine Nukleinsäuresequenz eine im wesentlichen ähnliche Nukleinsäure der Erfindung ist, besteht darin, daß sie mit einem Nukleinsäuremolekül der Erfindung unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Begriff "spezifisch hybridisierend mit" bezeichnet die Bindung, Duplexierung oder Hybridisierung eines Moleküls nur mit einer besonderen Nukleotidsequenz unter stringenten Bedingungen, wenn diese Sequenz in einer komplexen Mischung aus (z. B. vollzellulärer) DNA oder RNA vorhanden ist. "Bindet im wesentlichen" bezeichnet die komplementäre Hybridisierung zwischen einer Sonden-Nukleinsäure und einer Ziel-Nukleinsäure und umfaßt geringfügige Fehlübereinstimmungen, die durch Reduzierung der Stringenz der Hybridisierungsmedien berücksichtigt werden können, um die gewünschte Detektion der Ziel-Nukleinsäuresequenz zu erreichen.

[0052] "Stringente Hybridisierungsbedingungen" und "stringente Hybridisierungs-Spülbedingungen" im Zusammenhang von Nukleinsäure-Hybridisierungsexperimenten wie Southern- und Northern-Hybridisierungen sind sequenzabhängig und sind unter unterschiedlichen Umweltparametern verschieden. Längere Sequenzen hybridisieren spezifisch bei höheren Temperaturen. Ein umfassender Leitfaden für die Hybridisierung von Nukleinsäuren wird gefunden in Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology – Hybridization with Nucleic Acid Probes, Teil I, Kapitel 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, New York. Allgemein werden hochstringente Hybridisierungs- und Spülbedingungen ausgewählt, um ca. 5°C niedriger als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH zu sein. Typischerweise wird eine Sonde unter "stringenten Bedingungen" mit ihrer Ziel-Untersequenz hybridisieren, aber nicht mit anderen Sequenzen.

[0053] T_m ist die Temperatur (unter definierter Ionenstärke und definiertem pH), bei der 50% der Zielsequenz mit einer perfekt übereinstimmenden Sonde hybridisieren. Sehr stringente Bedingungen werden ausgewählt, um gleich dem T_m für eine besonders Sonde zu sein. Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen zur Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren, die mehr als 100 komplementäre Reste haben, auf einem Filter in einem Southern- oder Northern-Blot sind 50% Formamid mit 1 mg Heparin bei 42°C, wobei die Hybridisierung über Nacht durchgeführt wird. Ein Beispiel für hochstringente Spülbedingungen sind 0,15 M NaCl bei 72°C für ca. 15 Minuten. Ein Beispiel für stringente Spülbedingungen sind eine 0,2 × SSC-Spülung bei 65°C für 15 Minuten (siehe Sambrook, unten, für eine Beschreibung von SSC-Puffer). Häufig geht einer Spülung mit hoher Stringenz eine Spülung mit geringer Stringenz voraus, um Hintergrund-Sondensignal zu entfernen. Eine exemplarische mittlere Stringenzspülung für einen Duplex von z. B. mehr als 100 Nukleotiden ist 1 × SSC bei 45°C für 15 Minuten. Eine exemplarische geringe Stringenzspülung für einen Duplex von z. B. mehr als 100 Nukleotiden ist 4–6 × SSC bei 40°C für 15 Minuten. Für kurze Sonden (z. B. ca. 10 bis 50 Nukleotide) beinhalten stringente Bedingungen typischerweise Salzkonzentrationen von weniger als ca. 1,0 M Na-Ionen, typischerweise ca. 0,01 bis 1,0 M Na-Ionenkonzentration (oder andere Salze) bei pH 7,0 bis 8,3, und die Temperatur ist typischerweise wenigstens ca. 30°C. Stringente Bedingungen können auch mit der Zugabe von destabilisierenden Mitteln wie Formamid erreicht werden. Allgemein zeigt ein Signal-Rausch-Verhältnis vom 2-fachen (oder höher) desjenigen, das für eine nicht verwandte Sonde im besonderen Hybridiserungstest beobachtet wird, die Detektion einer spezifischen Hybridisierung an. Nukleinsäuren, die nicht miteinander unter stringenten Bedingungen hybridisieren, sind noch im wesentlichen ähnlich, falls die Proteine, die sie codieren, im wesentlichen ähnlich sind. Dies tritt z. B. auf, wenn eine Kopie einer Nukleinsäure unter Verwendung der maximalen Codon-Degeneriertheit geschaffen wird, die durch den genetischen Code erlaubt wird.

[0054] Nachfolgend sind Beispiele für Sätze von Hybridisierungs-/Spülbedingungen aufgeführt, die zur Identifizierung von homologen Nukleotidsequenzen verwendet werden können, die im wesentlichen ähnlich mit Referenz-Nukleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung sind: eine Testsequenz, die mit der Referenz-Nukleotidsequenz in 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C unter Spülen in 2 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C, besonders wünschenswert in 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C unter Spülen in 1 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C, noch mehr wünschenswert in 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C unter Spülen in 0,5 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C, vorzugsweise in 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C unter Spülen in 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C, besonders bevorzugt in 7% Natriumdodecylphosphat (SDS), 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C unter Spülen in 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C hybridisiert. Das Polynukleotid der Erfindung, das unter den

obigen Bedingungen hybridisiert, umfaßt vorzugsweise wenigstens 80 Basenpaare, besonders bevorzugt wenigstens 50 Basenpaare und insbesondere wenigstens 21 und ganz besonders 18 Basenpaare. Bevorzugte Homologe zur Verwendung in der Erfindung schließen Nukleinsäuremoleküle ein, die eine Aminosäuresequenz codieren, die zu wenigstens 45% identisch mit SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 gemäß Messung unter Verwendung der nachfolgend beschriebenen Parameter ist, worin die durch das Homolog codierte Aminosäuresequenz Trichothecenresistenzaktivität besitzt, z. B. 3-O-Acetyltransferase-Aktivität.

[0055] Der Begriff "im wesentlichen ähnlich", wenn er hier in Bezug auf ein Protein verwendet wird, bedeutet ein Protein, das einem Referenzprotein entspricht, worin das Protein im wesentlichen die gleiche Struktur und Funktion wie das Referenzprotein hat, z. B. wenn nur Veränderungen in der Aminosäuresequenz erfolgen, die nicht die Polypeptidfunktion beeinflussen. Bei Verwendung für ein Protein oder eine Aminosäuresequenz ist der Prozentwert der Identität zwischen dem im wesentlichen ähnlichen und dem Referenzprotein oder der Referenz-Aminosäuresequenz wünschenswert wenigstens 45% Identität, besonders wünschenswert wenigstens 65%, noch wünschenswerter wenigstens 75%, bevorzugt wenigstens 85%, besonders bevorzugt wenigstens 90%, noch mehr bevorzugt wenigstens 95%, noch mehr bevorzugt wenigstens 99%, unter Verwendung von standardmäßigen BLAST-Analyseparametern und wie in größerem Detail nachfolgend beschrieben.

[0056] Bevorzugte Homologe des Polypeptids zur Verwendung in der Erfindung umfassen diejenigen mit Aminosäuresequenzen, die wenigstens zu 45% identisch mit SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 sind, worin die durch das Homolog codierte Aminosäuresequenz Trichothecenresistenzaktivität besitzt, z. B. 3-O-Acetyltransferase-Aktivität.

[0057] Eine optimale Angleichung der Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen zum Vergleich kann wie oben beschrieben und z. B. durch den lokalen Homologiealgorithmus von Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), durch den Homologie-Angleichungsalgorithmus von Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), durch das Verfahren der Suche nach Ähnlichkeit von Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), durch computerisierte Implementationen dieser Algorithmen (GAP, BESTFIT, FASIA und TFASTA im Wisconsin Genetics Softwarepaket, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) oder durch visuelle Inspektion (siehe allgemein Ausubel et al., unten) durchgeführt werden.

[0058] Ein Beispiel für einen Algorithmus, der geeignet zur Bestimmung der prozentualen Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit ist, ist der BLAST-Algorithmus, der beschrieben wird in Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403–410 (1990). Software zur Durchführung von BLAST-Analysen ist öffentlich erhältlich durch das National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Dieser Algorithmus beinhaltet zuerst die Identifizierung von Sequenzpaaren mit hoher Bewertung ("high scoring sequence pairs", HSPs) durch Identifizieren von kurzen Worten der Länge W in der Suchsequenz, die entweder eine Grenzwertbewertung T mit positivem Wert erfüllen oder ihr genügen, bei Angleichung mit einem Wort der gleichen Länge in einer Datenbanksequenz. T wird als Nachbarschaftswort-Bewertungsgrenzwert bezeichnet (Altschul et al., 1990). Diese anfänglichen Nachbarschafts-Worttreffer wirken als Keime zum Einleiten von Recherchen, um längere HSPs zu finden, die sie enthalten. Die Worttreffer werden dann in beiden Richtungen entlang jeder Sequenz so weit erweitert, wie die kumulative Angleichungsbewertung erhöht werden kann. Kumulative Bewertungen werden für Nukleotidsequenzen unter Verwendung der Parameter M (Belohnungsbewertung für ein Paar von übereinstimmenden Resten; immer > 0) und N (Bestrafungsbewertung für fehlübereinstimmende Reste; immer < 0) berechnet. Für Aminosäuresequenzen wird eine Bewertungsmatrix durch Berechnung der kumulativen Bewertung verwendet. Die Ausdehnung der Worttreffer in jede Richtung wird angehalten, wenn die kumulative Angleichungsbewertung um die Größe X von ihrem maximal erreichten Wert abfällt, die kumulative Bewertung auf null oder darunter aufgrund der Ansammlung einer oder mehrerer Resteangleichungen mit negativer Bewertung fällt oder das Ende einer Sequenz erreicht ist. Die BLAST-Algorithmusparameter W, T und X bestimmen die Empfindlichkeit und Geschwindigkeit der Angleichung. Das BLASTN-Programm (für Nukleotidsequenzen) verwendet als Standardeinstellungen eine Wortlänge (W) von 11, eine Erwartung (E) von 10, einen Grenzwert von 100, M = 5, N = –4 und einen Vergleich beider Stränge. Für Aminosäuresequenzen verwendet das BLASTP-Programm als Standardeinstellungen eine Wortlänge (W) von 3, eine Erwartung (E) von 10 und die BLOSUM62-Bewertungsmatrix (siehe Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915 (1989)).

[0059] Zusätzlich zur Berechnung der prozentualen Sequenzidentität führt der BLAST-Algorithmus auch eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen durch (siehe z. B. Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873–5787 (1993)). Ein Maß für die Ähnlichkeit, das durch den BLAST-Algorithmus bereitgestellt wird, ist die kleinste Summenwahrscheinlichkeit (P(N)), die eine Angabe für die Wahrscheinlichkeit liefert, mit der eine Übereinstimmung zwischen zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen zufällig auftreten würde. Zum Beispiel wird eine Test-Nukleinsäuresequenz als mit einer Referenzsequenz ähnlich betrachtet,

falls die kleinste Summenwahrscheinlichkeit in einem Vergleich der Test-Nukleinsäuresequenz mit der Referenz-Nukleinsäure weniger als ca. 0,1 ist, besonders bevorzugt weniger als ca. 0,01 und am meisten bevorzugt weniger als ca. 0,001.

[0060] Ein weiterer Hinweis, daß zwei Nukleinsäuresequenzen oder Proteine im wesentlichen ähnlich sind, ist derjenige, daß das durch die erste Nukleinsäure codierte Protein immunologisch kreuzreaktiv mit dem durch die zweite Nukleinsäure codierten Protein ist oder spezifisch daran bindet. So ist ein Protein typischerweise im wesentlichen ähnlich mit einem zweiten Protein, wenn beispielsweise die zwei Proteine sich nur durch konservative Substitutionen unterscheiden.

[0061] Der Begriff "bindet spezifisch (oder selektiv) an einen Antikörper" oder "spezifisch (oder selektiv) immunreaktiv mit" bei Bezugnahme auf ein Protein oder Peptid bezeichnet eine Bindungsreaktion, die bestimmend für die Gegenwart des Proteins in Gegenwart einer heterogenen Population von Proteinen und anderen biologischen Stoffen ist. So binden unter angegebenen Immuntestbedingungen die angegebenen Antikörper an ein besonderes Protein und binden nicht in einer signifikanten Menge an andere in der Probe vorhandene Proteine. Die spezifische Bindung an einen Antikörper unter solchen Bedingungen kann einen Antikörper erfordern, der auf seine Spezifität für ein besonderes Protein ausgewählt wird. Zum Beispiel können Antikörper, die gegen das Protein mit der Aminosäuresequenz erzeugt werden, die durch eine der Nukleinsäuresequenzen der Erfindung codiert wird, ausgewählt werden, um Antikörper zu erhalten, die spezifisch immunreaktiv mit dem Protein und nicht mit anderen Proteinen sind, ausgenommen polymorphen Varianten. Eine Vielzahl von Immuntestformaten kann zur Auswahl von Antikörpern verwendet werden, die spezifisch immunreaktiv mit einem besonderen Protein sind. Zum Beispiel werden Festphasen-ELISA-Immuntests, Western-Bluts oder Immunohistochemie routinemäßig zur Auswahl monoklonaler Antikörper verwendet, die spezifisch immunreaktiv mit einem Protein sind. Siehe Harlow und Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Barbor Publications, New York ("Harlow and Lane") für eine Beschreibung von Immuntestformaten und die Bedingungen, die zur Bestimmung von spezifischer Immunreaktivität verwendet werden können. Typischerweise wird eine spezifische oder selektive Reaktion wenigstens zweimal das Hintergrundsignal oder Rauschen und besonders typisch mehr als 10- bis 100-mal der Hintergrund sein.

[0062] "Konservativ modifizierte Variationen" einer besonderen Nukleinsäuresequenz bezeichnet diejenigen Nukleinsäuresequenzen, die identische oder im wesentlichen identische Aminosäuresequenzen codieren, oder wenn die Nukleinsäuresequenz keine Aminosäuresequenz codiert, im wesentlichen identische Sequenzen. Wegen der Entartung des genetischen Codes codiert eine große Anzahl funktionell identischer Nukleinsäuren jedes gegebene Polypeptid. Zum Beispiel codieren die Codonen CGT, CGC, CGA, CGG, AGA und AGG alle die Aminosäure Arginin. So kann das Codon in jeder Position, in der ein Arginin durch ein Codon angegeben wird, zu jedem der entsprechenden beschriebenen Codonen verändert werden, ohne das codierte Protein zu verändern. Solche Nukleinsäure-Variationen sind "stumme Variationen", die eine Art von "konservativ modifizierten Variationen" sind. Jede hier beschriebene Nukleinsäuresequenz, die ein Protein codiert, beschreibt auch jede mögliche stumme Variation, ausgenommen wenn ansonsten angegeben. Ein Fachmann wird erkennen, daß jedes Codon in einer Nukleinsäure (ausgenommen ATG, das gewöhnlich das einzige Codon für Methionin ist) zur Lieferung eines funktionell identischen Moleküls durch Standardtechniken modifiziert werden kann. Entsprechend ist jede "stumme Variation" eine Nukleinsäure, die ein Protein codiert, implizit ähnlich jeder beschriebenen Sequenz.

[0063] Außerdem wird ein Fachmann erkennen, daß individuelle Substitutionen, Deletionen oder Additionen, die eine einzelne Aminosäure oder einen kleinen Prozentanteil von Aminosäuren (typischerweise weniger als 5%, besonders typisch weniger als 1%) in einer codierten Sequenz verändern, addieren oder deletieren, "konservativ modifizierte Variationen" sind, wenn die Veränderungen zur Substitution einer Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure führen. Konservative Substitutionstabellen, die funktionell ähnliche Aminosäuren liefern, sind allgemein fachbekannt. Die folgenden fünf Gruppen enthalten jeweils Aminosäuren, die konservative Substitutionen für einander sind: aliphatisch: Glycin (G), Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I); aromatisch: Phenylalamin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W); schwefelhaltig: Methionin (M), Cystein (C); basisch: Arginin (R), Lysin (K), Histidin (H); sauer: Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E), Asparagin (N), Glutamin (Q). Siehe auch Creighton (1984) Proteins, W. H. Freeman and Company. Zusätzlich sind individuelle Substitutionen, Deletionen oder Additionen, die eine einzelne Aminosäure oder einen geringen Prozentanteil von Aminosäuren in einer codierten Sequenz verändern, addieren oder deletieren, auch "konservativ modifizierte Variationen".

[0064] Eine "Untersequenz" bezeichnet eine Sequenz von Nukleinsäuren oder Aminosäuren, die einen Teil einer längeren Sequenz von Nukleinsäuren bzw. Aminosäuren (z. B. Protein) umfaßt.

[0065] Nukleinsäuren sind "verlängert", wenn zusätzliche Nukleotide (oder andere analoge Moleküle) in der Nukleinsäure aufgenommen sind. Am häufigsten wird dies mit einer Polymerase (z. B. einer DNA-Polymerase) durchgeführt, z. B. mit einer Polymerase, die Sequenzen am 3'-Terminus der Nukleinsäure addiert.

[0066] Zwei Nukleinsäuren sind "rekombiniert", wenn Sequenzen aus jeder der zwei Nukleinsäuren in einer Nachkommenschafts-Nukleinsäure kombiniert sind. Zwei Sequenzen sind "direkt" rekombiniert, wenn beide Nukleinsäuren Substrate zur Rekombination sind. Zwei Sequenzen sind "indirekt rekombiniert", wenn die Sequenzen unter Verwendung einer Zwischenstufe, wie z. B. mit einem Cross-Over-Oligonukleotid, rekombiniert werden. Zur indirekten Rekombination ist nicht mehr als eine der Sequenzen ein tatsächliches Substrat zur Rekombination, und in manchen Fällen ist keine Sequenz ein Substrat zur Rekombination.

[0067] Eine "spezifische Bindungsaffinität" zwischen zwei Molekülen, z. B. einem Ligand und einem Rezeptor, bedeutet eine bevorzugte Bindung eines Moleküls für ein anderes in einer Mischung von Molekülen. Die Bindung der Moleküle kann als spezifisch betrachtet werden, falls die Bindungsaffinität ca. 1×10^4 M^{-1} bis ca. 1×10^6 M^{-1} oder größer ist.

[0068] Substrat: Ein Substrat ist das Molekül, das ein Enzym natürlich erkennt und zu einem Produkt im biochemischen Reaktionsweg umwandelt, in dem das Enzym natürlich seine Funktion durchführt, oder ist eine modifizierte Version des Moleküls, die auch durch das Enzym erkannt wird und durch das Enzym zu einem Produkt in einer. enzymatischen Reaktion umgewandelt wird, die ähnlich der natürlich vorkommenden Reaktion ist.

[0069] Transformation: Ein Prozess zur Einführung heterologer DNA in eine Zelle, ein Gewebe oder ein Insekt. Transformierte Zellen, Gewebe oder Insekten werden so verstanden, daß sie nicht nur das Endprodukt eines Transformationsprozesses umfassen, sondern auch transgene Nachkommenschaft davon.

[0070] "Transformiert", "transgen" und "rekombinant" bezeichnen einen Wirtsorganismus wie ein Bakterium oder eine Pflanze, in das/die ein heterologes Nukleinsäuremolekül eingeführt wurde. Das Nukleinsäuremolekül kann stabil in das Genom des Wirtes integriert sein, oder das Nukleinsäuremolekül kann auch als extrachromosomales Molekül vorhanden sein. Ein solches extrachromosomales Molekül kann selbst-vervielfältigend sein. Transformierte Zellen, Gewebe oder Pflanzen werden so verstanden, daß sie nicht nur das Endprodukt eines Transformationsprozesses umfassen, sondern auch transgene Nachkommenschaft davon. Ein "nicht-transformierter", "nicht-transgener" oder "nicht-rekombinanter" Wirt bezeichnet einen Organismus vom Wildtyp, z. B. ein Bakterium oder eine Pflanze, der nicht das heterologe Nukleinsäuremolekül enthält.

[0071] Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Wirte, insbesondere transgene Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzensamen und Pflanzenzellen, die ein heterologes Polynukleotid umfassen, das ein Genprodukt codiert, worin das Genprodukt Trichothecen-Resistenzaktivität umfaßt, und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben. Trichothecen-Resistenzaktivität, wie hier verwendet, bezeichnet eine Aktivität, die die Phytotoxizität eines Trichothecens, insbesondere gegen einen Pilz und/oder eine Pflanze, reduziert oder inhibiert, in einer besonderen Ausführungsform der Erfindung betrifft Trichothecen-Resistenzaktivität eine Aktivität, die ein Acetat auf die C-3-Position eines Trichothecens überträgt.

[0072] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung transgene Wirte, insbesondere transgene Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzensamen und Pflanzenzellen, die ein heterologes Polynukleotid exprimieren, das ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt Trichothecen-Resistenzaktivität aufweist, insbesondere ein Acetyltransferase-Genprodukt, insbesondere ein 3-O-Acetyltransferase-Genprodukt, ganz besonders ein Trichothecen-3-O-acetyltransferase-Genprodukt, und Verfahren zur Herstellung und Verwendung derselben. Die Expression des heterologen Polynukleotids der Erfindung umfaßt die Synthese von RNA und kann durch Northern-Blot-Analyse detektiert werden. Insbesondere kann die Expression des heterologen Polynukleotids detektiert werden, wenn eine markierte Sonde, die aus dem heterologen Nukleotid abstammt, insbesondere aus SEQ ID NOs: 1, 5 oder 7, mit RNA hybridisiert, die aus einer transgenen Pflanze der Erfindung isoliert ist, in 7% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,0, 1 mM EDTA, 10 mg/ml BSA bei 65°C unter Spülen in 0,5% BSA (Fraktion V), 5% SDS, 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,25 M Natriumchlorid bei 65°C, bevorzugt in 1% SDS, 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,125 M Natriumchlorid bei 65°C und vorzugsweise in 1% SDS, 40 mM Natriumphosphat, pH 7,0, 1 mM EDTA bei 65°C.

[0073] Ferner betrifft die Erfindung transgene Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzensamen und Pflanzenzellen, die ein heterologes Polynukleotid exprimieren, worin die Pflanze, Pflanzenzelle, das Pflanzengewebe oder der Pflanzensamen trichothecenresistent ist. Trichothecenresistente Pflanzen, Pflanzenzellen, Pflanzengewe-

be und Pflanzensamen, wie hier verwendet, sind diejenigen, die zum Stoffwechsel in Gegenwart eines Trichothecens fähig sind, was, wie im nachfolgenden Beispiel 7 beschrieben, bestimmt werden kann. In einer besonderen Ausführungsform haben trichothecenresistente Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzenzellen und Pflanzensamen eine spezifische Enzymaktivität von wenigstens 10 nmol Triacetoxyscirpenol (hier nachfolgend "TAS")/Mikrogramm Protein/15 min Inkubation bei Sättigungssubstratspiegeln, insbesondere bei wenigstens 5 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere wenigstens 1 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere wenigstens 0,8 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere wenigstens 0,5 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere eine spezifische Aktivität von 0,25 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere eine spezifische Aktivität von 0,1 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min, insbesondere eine spezifische Aktivität von 0,05 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min und ganz besonders eine spezifische Aktivität von 0,01 nmol TAS/Mikrogramm Protein/15 min oberhalb Hintergrundspiegeln der Aktivität, die in einer Kontrolle vom Wildtyp natürlich vorkommen, insbesondere gemäß Bestimmung in einem Test wie im nachfolgenden Beispiel 6 beschrieben.

[0074] Trichothecenresistente Pflanzen der Erfindung umfassen diejenigen mit einem größeren Prozentwert der Sattgutkeimung und Bildung von Wurzeln in Gegenwart eines Trichothecens als das Saatgut aus einer Kontrolle vom Wildtyp, worin das Trichothecen in einer Konzentration von wenigstens 5 Mikrogramm/ml vorhanden ist, besonders bevorzugt wenigstens 10 Mikrogramm/ml, besonders bevorzugt wenigstens 15 Mikrogramm/ml, besonders bevorzugt wenigstens 20 Mikrogramm/ml und besonders bevorzugt wenigstens 25 Mikrogramm/ml. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen trichothecenresistente Pflanzen der Erfindung diejenigen, von denen wenigstens 10% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 20% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 30% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 40% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 50% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 60% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 70% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 80% mehr Saatgut und besonders bevorzugt wenigstens 90% mehr Saatgut keimen und Wurzeln bilden in Gegenwart eines Trichothecens als das Saatgut einer Kontrolle vom Wildtyp.

[0075] Trichothecene werden häufig in mehrere unterschiedliche Struktur-Gruppen unterteilt. Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf Trichothecene der Gruppe A und B. Gruppen A und B umfassen die Fusarium-Trichothecene und werden primär durch die Abwesenheit (Gruppe A) oder Gegenwart (Gruppe B) einer funktionellen Carbonyl-Gruppe in Position C-8 differenziert. Das Trichothecen der Gruppe B, DON, umfaßt entsprechend eine Carbonyl-Gruppe in der Position C-8.

[0076] Die vorliegende Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Resistenz gegen Trichothecene beschrieben, die ein C-3-Hydroxyl enthalten. Solche Trichothecene schließen T-2-Toxin, HT-2-Toxin, Isotrichodermol, DAS, 3-Desacetylcalonectrin, 3,15-Didesacetylcalonectrin, Scirpentriol, Neosolaniol; 15-Acetyldesoxynivalenol, Nivalenol, 4-Acetylnivalenol (Fusarenon-X), 4,15-Diacetylnivalenol, 4,7,15-Acetylnivalenol und DON und ihre verschiedenen acetylierten Derivate ein.

[0077] In einer besonderen Ausführungsform ist die/das trichothecenresistente Pflanze, Zelle, Gewebe oder Saatgut davon resistent gegen einen Trichothecen-erzeugenden Pilz, insbesondere einen Pilz der Gattung Fusarium. Pilzresistenz, wie hier verwendet, bezeichnet keine Einleitung der Infektion nach Pilzbeimpfung oder reduzierte Ausbreitung der Infektion nach Pilzbeimpfung im Vergleich mit einer Kontrolle vom Wildtyp.

[0078] In einer bevorzugten Ausführungsform ist eine pilzresistente transgene Pflanze der Erfindung eine Getreidepflanze und umfaßt unter Pilzkontakt weniger infizierte Körner oder Samen im Vergleich mit einer Kontrolle vom Wildtyp, bevorzugt wenigstens eine 10%ige Abnahme von infizierten Körnern oder Samen im Vergleich mit der gleichen Anzahl von Körnern oder Samen, die in einer Kontrolle vom Wildtyp ausgewertet werden, besonders bevorzugt wenigstens eine 20%ige Abnahme, besonders bevorzugt wenigstens eine 40%ige Abnahme und besonders bevorzugt wenigstens eine 50%ige Abnahme der infizierten Körner im Vergleich mit der gleichen Anzahl von Körnern oder Samen in einer Kontrolle vom Wildtyp. Die pilzresistenten transgenen Getreidepflanzen der Erfindung umfassen ohne Beschränkung Mais, Weizen, Gerste, Reis und Hafer.

[0079] In Weizen kann die Pilzausbreitung in der Ähre, wie im nachfolgenden Beispiel 9 beschrieben, ausgewertet werden, indem die Anzahl von symptomatischen und asymptomatischen Ährchen an jeder beimpften Ähre gezählt und der Prozentwert der Ährchen an jeder Ähre, die symptomatisch sind, berechnet wird. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der pilzresistente Weizen der Erfindung unter Pilzkontakt weniger infizierte Ährchen als die Kontrolle vom Wildtyp, bevorzugt wenigstens eine 10%ige Abnahme an infizierten Ährchen im Vergleich mit der gleichen Anzahl von Ährchen, die in einer Kontrolle vom Wildtyp ausgewertet werden, besonders bevorzugt wenigstens eine 20%ige Abnahme, besonders bevorzugt wenigstens eine 40%ige

Abnahme und besonders bevorzugt wenigstens eine 50%ige Abnahme an infizierten Ährchen im Vergleich mit der gleichen Anzahl von Ährchen in einer Kontrolle vom Wildtyp.

[0080] In Mais kann die Pilzausbreitung im Kolben durch visuelle Abschätzung des Prozentwertes der infizierten Körner, wie weiter im nachfolgenden Beispiel 9 beschrieben, ausgewertet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der pilzresistente Mais der Erfindung unter Pilzkontakt weniger infizierte Körner als die Kontrolle vom Wildtyp, bevorzugt wenigstens eine 10%ige Abnahme an infizierten Körnern im Vergleich mit der Anzahl von infizierten Körnern in der gleichen Anzahl von Kolben, sichtbar abgeschätzt in einer Kontrolle vom Wildtyp, besonders bevorzugt wenigstens eine 20%ige Abnahme, besonders bevorzugt wenigstens eine 30%ige Abnahme, besonders bevorzugt wenigstens eine 40%ige Abnahme und besonders bevorzugt wenigstens eine 50%ige Abnahme an infizierten Körnern im Vergleich mit der gleichen Anzahl von Kolben, sichtbar abgeschätzt in einer Kontrolle vom Wildtyp. In Mais kann die interne Pilzausbreitung im Stengel visuell durch Aufspalten des Stengels und Bewerten der Verfärbungsmenge ausgewertet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt der transgene Mais der Erfindung weniger interne und/oder externe Verfärbung des Stengels im Vergleich mit einer Kontrolle vom Wildtyp.

[0081] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfassen pilzresistente Pflanzen der Erfindung diejenigen, von denen ein größerer Prozentwert des Saatguts in Gegenwart von Pilzkontakt keimt, als er in der Kontrolle vom Wildtyp keimt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen pilzresistente Pflanzen der Erfindung diejenigen, von denen wenigstens 10% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 20% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 30% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 40% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 50% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 60% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 70% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 80% mehr Saatgut und besonders bevorzugt wenigstens 90% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 100% mehr Saatgut, besonders bevorzugt wenigstens 150% mehr Saatgut in Gegenwart von Fusarium keimt als Saatgut aus der Kontrolle vom Wildtyp.

[0082] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden pilzresistente transgene Pflanzen, die Saatgut oder Körner mit weniger Mykotoxin, z. B. Trichothecen-Kontamination, als das Saatgut einer Kontrolle vom Wildtyp erzeugen, bereitgestellt.

[0083] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Kulturpflanzen und insbesondere Getreidepflanzen, die Saatgut mit wenigstens 10% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 20% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 30% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 40% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 50% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 60% weniger Trichothecen, besonders bevorzugt wenigstens 70% weniger Trichothecen und besonders bevorzugt wenigstens 80% weniger Trichothecen-Termination als eine Kontrolle vom Wildtyp erzeugen, bereitgestellt. Trichothecen-Kontamination kann wie im nachfolgenden Beispiel 10 beschrieben bestimmt werden.

[0084] Die Polynukleotide zur Verwendung in der Erfindung schließen heterologe Polynukleotide ein, die Acetyltransferasen codieren, insbesondere diejenigen, die Acetyltransferasen codieren, die Trichothecenresistenz verleihen können, insbesondere diejenigen, die Trichothecen-3-O-acetyltransferasen codieren. In einer besonderen Ausführungsform können die heterologen Polynukleotide ohne Beschränkung aus pilzlichem Ursprung stammen, insbesondere aus Fusarium-, Trichothecium- und Myrothecium-Ursprung, insbesondere aus einer Fusarium-Art wie F. acuminatum, F. crookwellense, F. culmorum, F. equiseti, F. graminearum (Giberella zeae), F. lateritium, F. pose, F. sambucinum (G. pilicaris) und F. sporotrichioides. Heterologe Polynukleotide zur Verwendung in der Erfindung schließen SEQ ID NO: 1, 5 und/oder 7 und zu SEQ ID NO: 1, 5 und/oder 7 im wesentlichen ähnliche Sequenzen ein.

[0085] Ein Polynukleotid zur Verwendung in der Erfindung kann in Wirtszellen wie Pflanzen-, Pilz- oder bakteriellen Zellen unter Verwendung herkömmlicher rekombinanter DNA-Technik aufgenommen werden. Allgemein beinhaltet dies das Inserieren des Polynukleotids in ein Expressionssystem, für das das Polynukleotid heterolog ist, unter Verwendung von fachbekannten Standard-Klonierungsverfahren. Der Vektor enthält die notwendigen Elemente für die Transkription und Translation des Polynukleotids zur Verwendung in der Erfindung in einer Wirtszelle, die den Vektor enthält. Eine große Anzahl von fachbekannten Vektorsystemen wie Plasmide, Bakteriophagenviren und andere modifizierte Viren kann verwendet werden. Die Komponenten des Expressionssystems können auch zur Erhöhung der Expression modifiziert werden. Zum Beispiel können trunkierte Sequenzen, Nukleotid-Substitutionen, Nukleotid-Optimierung oder andere Modifikationen eingesetzt werden. Fachbekannte Expressionssysteme können zur Transformation praktisch jeder Kulturpflanzenzelle

unter geeigneten Bedingungen verwendet werden. Ein heterologes Polynukleotid der Erfindung wird bevorzugt stabil transformiert und in das Genom der Wirtszellen integriert. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform befindet sich das heterologe Polynukleotid der Erfindung auf einem selbst-vervielfältigenden Vektor. Beispiele für selbst-vervielfältigende Vektoren sind Viren, insbesondere Gemini-Viren. Transformierte Zellen können zu ganzen Pflanzen regeneriert werden, so daß die gewählte Form des Polynukleotids Trichothecenresistenz in den transgenen Pflanzen verleiht.

[0086] Ein zur Expression in transgenen Pflanzen gedachtes Polynukleotid der Erfindung wird zuerst in einer Expressionskassette hinter einem geeigneten Promotor, der in Pflanzen exprimierbar ist, zusammengebaut. Die Expressionskassetten können auch etwaige weitere Sequenzen umfassen, die für die Expression des heterologen Polynukleotids der Erfindung erforderlich oder ausgewählt sind. Solche Sequenzen schließen ohne Beschränkung Transkriptionsterminatoren, Fremdsequenzen zur Steigerung der Expression wie Introns, vitale Sequenzen und zur Ausrichtung des Genprodukts auf spezifische Organellen und Zellkompartimente gedachte Sequenzen ein. Diese Expressionskassetten können dann leicht auf die unten beschriebenen Pflanzentransformationsvektoren übertragen werden. Es folgt eine Beschreibung verschiedener Komponenten typischer Expressionskassetten.

[0087] Die Auswahl des in den Expressionskassetten verwendeten Promotors wird das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des heterologen Polynukleotids der Erfindung in der transformierten Pflanze bestimmen. Ausgewählte Promotoren werden heterologe Polynukleotide der Erfindung in spezifischen Zelltypen (wie Blattepidermiszellen, Mesophyllzellen, Wurzelkortexzellen) oder in spezifischen Geweben oder Organen (Wurzeln, Blätter oder Blüten beispielsweise) exprimieren, und die Auswahl wird den gewünschten Ort der Anreichung des Genprodukts widerspiegeln. Alternativ kann der ausgewählte Promotor die Expression des Gens unter verschiedenen induzierenden Bedingungen antreiben. Promotoren variieren in ihrer Stärke, d. h. in ihrer Fähigkeit zur Förderung der Transkription. In Abhängigkeit vom verwendeten Wirtszellsystem kann jeder aus einer Anzahl geeigneter fachbekannter Promotoren verwendet werden. Zum Beispiel kann zur konstitutiven Expression der CaMV 35S-Promotor, der Reis-Actin-Promotor oder der Ubiquitin-Promotor verwendet werden. Zur regulierbaren Expression kann der chemisch induzierbare PR-1-Promotor aus Tabak oder Arabidopsis verwendet werden (siehe z. B. US-PS 5,689,044).

[0088] Eine Vielzahl von Transkriptionsterminatoren sind zur Verwendung in Expressionskassetten verfügbar. Diese sind verantwortlich für die Termination der Transkription über das heterologe Polynukleotid der Erfindung hinaus und seine korrekte Polyadenylierung. Geeignete Transkriptionsterminatoren sind diejenigen, die dafür bekannt sind, in Pflanzen zu funktionieren, und schließen den CaMV 35S-Terminator, den tml-Terminator, den Nopalinsynthase-Terminator und den rbcS E9-Terminator aus Erbse sein. Diese können in sowohl einkeimblättrigen als auch zweikeimblättrigen Pflanzen verwendet werden.

[0089] Es wurde festgestellt, daß zahlreiche Sequenzen die Genexpression aus der Transkriptionseinheit heraus steigern, und diese Sequenzen können in Verbindung mit den Polynukleotiden dieser Erfindung zur Steigerung ihrer Expression in transgenen Pflanzen verwendet werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, daß verschiedene Intronsequenzen wie Introns des Mais-AdhI-Gens die Expression steigern, insbesondere in einkeimblättrigen Zellen. Zusätzlich sind eine Reihe von nicht-translatierten Leitsequenzen, die aus Viren stammen, ebenfalls dafür bekannt, die Expression zu steigern, und diese sind besonders wirksam in zweikeimblättrigen Zellen.

[0090] Die codierende Sequenz des ausgewählten Gens wird gegebenenfalls gentechnisch durch Veränderung der codierenden Sequenz zur optimalen Expression in der Kulturpflanzenart von Interesse manipuliert. Verfahren zur Modifizierung von codierenden Sequenzen zum Erreichen einer optimalen Expression in einer besonderen Kulturpflanzenart sind wohlbekannt (siehe z. B. Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3324 (1991); und Koziel et al., Bio/technol. 11: 194 (1993); Fennoy und Bailey-Serres. Nucl. Acids Res. 21: 5294–5300 (1993)). Verfahren zur Modifizierung von codierenden Sequenzen durch Berücksichtigung der Codonenverwendung in Pflanzengenen und in höheren Pflanzen, Grünalgen und Cyanobakterien sind wohlbekannt (siehe Tabelle 4 in: Murray et al. Nucl. Acids Res. 17: 477–498 (1989); Campbell und Gowri Plant Physiol. 92: 1–11 (1990)).

[0091] Von verschiedene Mechanismen zur Ausrichtung von Genprodukten ist bekannt, daß sie in Pflanzen existieren, und die Sequenzen, die das Funktionieren dieser Mechanismen kontrollieren, wurden in einem gewissen Detail charakterisiert. Zum Beispiel wird die Ausrichtung der Genprodukte auf den Chloroplasten durch eine Signalsequenz kontrolliert, die am Aminoterminalen Ende verschiedener Proteine gefunden wird, die während des Chloroplastenimports abgespalten wird, um das reife Protein zu liefern (z. B. Comai et al. J. Biol.

Chem. 263: 15104–15109 (1988)). Andere Genprodukte befinden sich in anderen Organellen wie dem Mitochondrium und dem Peroxisom (z. B. Unger et al. Plant Molec. Biol. 13: 411–418 (1989)). Die cDNAs, die diese Produkte codieren, können auch manipuliert werden, um die Ausrichtung von heterologen Produkten, die durch DNA-Sequenzen codiert werden, auf diese Organellen zu bewirken. Zusätzlich wurden Sequenzen charakterisiert, die die Ausrichtung von Produkten, die durch DNA-Sequenzen codiert werden, auf andere Zellkompartimente verursachen. Amino-terminale Sequenzen sind verantwortlich für die Ausrichtung auf das endoplasmatische Retikulum, den Apoplast und die extrazelluläre Sekretion aus Aleuronzellen (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769–783 (1990)). Zusätzlich sind Amino-terminale Sequenzen in Verbindung mit Carboxy-terminalen Sequenzen verantwortlich zur vakuolaren Ausrichtung von Genprodukten (Shinshi et al. Plant Molec. Biol. 14: 357–368 (1990)). Durch die Fusion der oben beschriebenen geeigneten Ausrichtungssequenzen mit einem heterologen Polynukleotid der Erfindung ist es möglich, ein resultierendes Produkt auf jede Organelle oder jedes Zellkompartiment auszurichten.

[0092] Zahlreiche Transformationsvektoren, die zur Pflanzentransformation verfügbar sind, sind dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der Pflanzentransformation bekannt, und die für diese Erfindung relevanten Polynukleotide können in Verbindung mit allen solchen Vektoren verwendet werden. Die Auswahl des Vektors wird von der bevorzugten Transformationstechnik und der Zielart zur Transformation abhängen. Für bestimmte Zielarten können unterschiedliche Selektionsmarker bevorzugt sein. Selektionsmarker, die routinemäßig in der Transformation verwendet werden, schließen das nptII-Gen ein, das Resistenz gegen Kanamycin und verwandte Antibiotika verleiht (Messing & Vierra. Gene 19: 259–268 (1982); Bevan et al., Nature 304: 184–187 (1983)), das bar-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (White et al., Nucl. Acids Res. 18: 1062 (1990), Spencer et al. Theor. Appl. Genet. 79: 625–631 (1990)), das hph-Gen, das Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleiht (Blochinger & Diggelmann, Mol. Cell Biol. 4: 2929–2931), und das dhfr-Gen, das Resistenz gegen Methotrexat verleiht (Bourouis et al., EMBO J. 2(7): 1099–1104 (1983)), und das EPSPS-Gen, das Resistenz gegen Glyphosat verleiht (US-PSen 4,940,935 und 5,188,642), das Phosphomannoseisomerase-Gen, manA, das einen selektiven Stoffwechselvorteil in Gegenwart von Mannose verleiht (US-Patentanmeldung Nr. 5,767,378 und Miles & Guest, GENE, 32: 41–48 (1984)). PAT-selektierbare Marker, die Resistenz gegen BASTA verleihen (Sung H. Park et al., In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 34: 117–121 (1998)).

[0093] Viele Vektoren sind zur Transformation unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens verfügbar. Diese tragen typischerweise wenigstens eine t-DNA-Randsequenz und schließen Vektoren wie pBIN19 ein (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)). Typische Vektoren, die zur Agrobacterium-Transformation geeignet sind, schließen die binären Vektoren pCIB200 und pCIB2001 sowie den binären Vektor pCIB10 und Hygromycin-Selektionsderivate davon ein (siehe z. B. US-PS 5,639,949).

[0094] Die Transformation ohne die Verwendung von Agrobacterium tumefaciens umgeht das Erfordernis für T-DNA-Sequenzen im gewählten Transformationsvektor, und entsprechend können Vektoren, denen diese Sequenzen fehlen, zusätzlich zu Vektoren wie den oben beschriebenen verwendet werden, die T-DNA-Sequenzen enthalten. Transformationstechniken, die nicht auf Agrobacterium beruhen, schließen die Transformation über Partikelbombardierung, Protoplastenaufnahme (z. B. PEG und Elektroporation) und Mikroinjektion ein. Die Wahl des Vektors hängt weitgehend von der bevorzugten Selektion der zu transformierenden Art ab. Typische Vektoren, die zur Nicht-Agrobacterium-Transformation geeignet sind, schließen pCIB3064, pSOG19 und pSOG35 ein. (Siehe z. B. US-PS 5,369,949).

[0095] Sobald das Polynukleotid von Interesse in ein Expressionssystem kloniert wurde, wird es in eine Pflanzenzelle transformiert. Verfahren zur Transformation und Regeneration von Pflanzen sind allgemein fachbekannt. Zum Beispiel wurden Ti-Plasmidvektoren zur Übertragung von Fremd-DNA sowie die direkte DNA-Aufnahme, Liposomen, Elektroporation, Mikroinjektion und Mikroprojektile verwendet. Zusätzlich können Bakterien aus der Gattung Agrobacterium zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet werden.

[0096] Transformationstechniken für zweikeimblättrige Pflanzen sind allgemein fachbekannt und schließen Agrobacterium-basierte Technik und Techniken ein, die kein Agrobacterium erfordern. Nicht-Agrobacterium-Techniken beinhalten die Aufnahme von exogenem genetischem Material direkt durch Protoplasten oder Zellen. Dies kann durch PEG- oder Elektroporationvermittelte Aufnahme, Partikelbombardierung-vermittelte Übertragung oder Mikroinjektion erreicht werden. In jedem Fall werden die transformierten Zellen zu ganzen Pflanzen unter Verwendung von fachbekannten Standardtechniken regeneriert.

[0097] Die Transformation der meisten einkeimblättrigen Arten ist jetzt Routine geworden. Bevorzugte Techniken schließen den direkten Gentransfer in Protoplasten unter Verwendung von PEG- oder Elektroporationstechniken, die Partikelbombardierung in Callusgewebe sowie die Agrobacterium-vermittelte Transformati-

on ein. Zielgewebe können aus solchen Quellen wie Weizen Sorte UC703 oder Mais Genotyp CG000526 abgeleitet werden. Zum Beispiel kann die Agrobacterium-vermittelte Transformation von Mais wie in US-Patentanmeldung 09/089,111 beschrieben durchgeführt werden, das entsprechend als WO 98/54961 veröffentlicht wurde, und die von Gerste kann durchgeführt werden wie beschrieben von: M. Cho, J. Wong, C. Marx, W. Jiang, P. Lemaux und B. Buchanan (1999), Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. PNAS 96: 14641–14646; S. Zhang, M. Cho, T. Koprek, R. Yun, P. Bregitzer und P. Lemaux (1999). Genetic transformation of commercial cultivars of oat (Avena Sativa L.) and barley (Hordeum vulgare L.) using in vitro shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. Plant Cell Rep. 18: 959–966; P. Bregitzer, S. Harlbert und P. Lemaux (1998). Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. TAG 96: 421–425; M. Cho, W. Jiang und P. Lemaux (1998). Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Sci. 138: 229–244; P. Lemaux, M. Cho, S. Zang und P. Bregitzer (1998). Transgenic cereals: Hordeum vulgare L. – current status and future prospects. In: Vasil I., Philips R (Hrsg) Molecular Improvement of Cereal Crops, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Niederlande, Seiten 255–316; S. Zhang, R. Williams-Carrier, D. Jackson und P. Lemaux (1998). Expression of CDC2Zm and KNOTTED1 during in vitro auxillary shoot meristem proliferation and adventitious shoot meristem formation in maize (Zea mays L.) and barley (Hordeum vulgare L.). Planta 204: 542–549; D. McElroy, J. Louwerse, S. McElroy und P. Lemaux (1997). Development of a simple transient assay for Ac/Ds activity in cells of intact barley tissue. Plant J. 11: 157–165; S. Tingay, D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thornton und R. Brettell (1997). Agrobacterium tumefaciens-mediated bareley transformation. The Plant J. 11: 1369–1376; J. Qureshi, Z. Basri, R. Singh, R. Burton, M. Dalton, J. Kollmorgen und G. Fincher. 1988. Agrobacteriummediated transformation of two varieties of barlay (Hordeum vulgare L.) Proc. 42nd. Conference of Australian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 28. September bis 1. Oktober 1998, Adelaide, Australien; J. Qureshi, R. Singh, Z. Basri, R. Stewart, R. Burton, J. Kollmorgen und G. Fincher (1997). Strategies for genetic transformation of elite Australian barley varieties. Proc. 8th. Aust. Barley Technical Symp. Gold Coast, Queensland, 7. bis 12. September 1997. 2: 8.9–11; P. Lemaux, M. Cho, J. Louwerse, R. Williams und Y. Wan (1996). Bombardment-mediated transformation methods for barley. Bio-Rad US/EG Bull 2007: 1–6; T. Koprek, R. Hansch, A. Nerlich, R. Mendel und J. Schulze (1996). Fertile transgenic barley of differenz cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. Plant Sci. 119: 79–91; T. Hagio, T. Hirabayashi, H. Machii und H. Tomutsune (1995). Production of fertile transgenic barley (Hordeum vulgare L.) plants using the hygromycinresistance marker. Plant Cell Rep. 14: 329–334; H. Funatsuki, H. Kuroda, M. Kihara, P. Lazzeri, E. Muller, H. Lorz und I. Kishinami (1995). Fertile transgenic barley regenerated by direct DNA transfer to protoplasts. TAG 91: 707–712; A. Jahne, D. Becker, R. Brettschneider und H. Lorz (1994). Regeneration of transgenic, microscpore-derived, fertile barley. TAG 89: 525–533; Y. Wan und P. Lemaux (1994). Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol. 104: 37–48.

[0098] Die Polynukleotide der Erfindung können zum Verleihen von Trichothecenresistenz auf eine große Vielzahl von Pflanzenzellen, einschließlich derjenigen von Nacktsamern, Einkeimblättrigen und Zweikeimblättrigen, verwendet werden. Obwohl das heterologe Polynukleotid der Erfindung in jede Pflanzenzelle inseriert, z. B. transformiert, werden kann, die in diese breiten Klassen fällt, ist es besonders nützlich in Kulturpflanzenzellen wie Reis, Weizen, Gerste, Roggen, Mais, Hafer, Kartoffel, Süßkartoffel, Rübe, Kürbis ("squash"), Kürbis ("pumpkin"), Zucchini, Melone, Sojabohne und Sorghum. Die Polynukleotide zur Verwendung in der Erfindung, die eine Pflanze trichothecenresistent machen, können in Kombination mit anderen Eigenschaften verwendet werden, die wichtig für Produktion und Qualität sind. Die Polynukleotide der Erfindung können in Pflanzenlinien durch Züchtungsansätze und fachbekannte Techniken eingefügt werden.

[0099] Wenn ein trichothecenresistentes Gen-Allel durch Transformation in eine Kulturpflanze oder Pflanzenzellkultur, aus der eine Kulturpflanze regeneriert werden kann, erhalten wird, wird es in kommerzielle Sorten unter Verwendung herkömmlicher Züchtungstechniken bewegt, um einen trichothecenresistenten Anbau ohne die Notwendigkeit zur gentechnischen Manipulation des Allels und Transformation in die Pflanze zu entwickeln.

[0100] Die verschiedenen Züchtungsschritte sind durch einen wohldefinierten menschlichen Eingriff wie die Selektion der zu kreuzenden Linien, die Ausrichtung der Bestäubung der Elternlinien oder die Selektion geeigneter Nachkommenschaftspflanzen gekennzeichnet. In Abhängigkeit von den gewünschten Eigenschaften werden unterschiedliche Züchtungsmaßnahmen ergriffen. Die relevanten Techniken sind allgemein fachbekannt und schließen ohne Beschränkung Hybridisierung, Inzucht, Rückkreuzungszüchtung, Multilinienzüchtung, Sortenmischung, Interartenhybridisierung, aneuploide Techniken etc. ein. Hybridisierungstechniken schließen auch die Sterilisation von Pflanzen ein, um männlich- oder weiblich-sterile Pflanzen durch mechanische, chemische oder biochemische Mittel zu erzielen. Die Kreuzbestäubung einer männlich-sterilen Pflanze mit Pollen einer unterschiedlichen Linie stellt sicher, daß das Genom der männlich-sterilen, aber weib-

lich-fruchtbaren Pflanze gleichförmig Eigenschaften beider Elternlinien erhalten wird. So können die erfindungsgemäßen transgenen Samen und Pflanzen zur Züchtung von verbesserten Pflanzenlinien verwendet werden, die kein oder ein reduziertes Pilzwachstum auf der Pflanze, dem Pflanzengewebe oder Saatgut aufweisen, wodurch die Mykotoxin-Kontamination der Pflanze, des Pflanzengewebes oder Saatguts verhindert und/oder reduziert wird.

[0101] Die in die oben erwähnten transgenen Samen und Pflanzen manipulierte Trichothecenresistenz wird durch geschlechtliche Vermehrung oder vegetatives Wachstum weitergeführt und kann somit in Nachkommenschaftspflanzen aufrechterhalten und vermehrt werden. Allgemein machen die Aufrechterhaltung und Vermehrung Gebrauch von bekannten landwirtschaftlichen Verfahren, die entwickelt wurden, um für spezifische Zwecke wie die Bodenbearbeitung, das Aussäen oder Ernten zu passen. Da der wachsende Anbau anfällig für Befall und Schädigungen ist, die durch Insekten oder Infektionen verursacht werden, werden Maßnahmen ergriffen, um Pflanzenkrankheiten, Insekten, Nematoden und andere nachteilige Bedingungen zur Verbesserung des Ertrags zu bekämpfen. Diese schließen mechanische Maßnahmen wie die Bodenbearbeitung oder die Entfernung von infizierten Pflanzen sowie die Ausbringung von Agrochemikalien wie Fungiziden, Gametoziden, Nematoziden, Wachstumsregulatoren, Reifungsmitteln und Insektiziden ein.

[0102] In der Saatgutproduktion sind die Keimungsqualität und Gleichförmigkeit von Samen wesentliche Produkteigenschaften, wohingegen die Keimungsqualität und Gleichförmigkeit von Samen, die geerntet und vom Landwirt verkauft werden, nicht wichtig sind. Da es schwierig ist, einen Anbau frei von anderen Anbau- und Unkrautsamen zu halten, saatgutbürtige Krankheiten zu bekämpfen und Saatgut mit guter Keimung zu erzeugen, wurden relativ umfangreiche und wohldefinierte Saatgutproduktionspraktiken von den Saatgutherstellern entwickelt, die erfahren auf dem Gebiet der Kultivierung, Konditionierung und Vermarktung von reinem Saatgut sind. So ist es übliche Praxis für den Landwirt, zertifiziertes Saatgut zu kaufen, das spezifische Qualitätsstandards erfüllt, anstelle Saatgut zu verwenden, das von seinem eigenen Anbau geerntet wurde. Fortpflanzungsmaterial zur Verwendung als Samen wird üblicherweise mit einem Schutzüberzug behandelt, der Herbizide, Insektizide, Fungizide, Bakterizide, Nematozide, Molluskizide oder Mischungen daraus umfaßt. üblicherweise verwendete Schutzüberzüge umfassen Verbindungen wie Captan, Carboxin, Thiram (TMTD®), Methalaxyl (Apron®) und Pirimiphos-methyl (Actillic®). Nach Wunsch werden diese Verbindungen zusammen mit weiteren Trägern, Tensiden oder die Ausbringung unterstützenden Hilfsstoffen formuliert, die herkömmlich auf dem Gebiet der Formulierung eingesetzt werden, um Schutz gegen Schädigung bereitzustellen, die durch bakterielle, pilzliche oder tierische Schädlinge verursacht wird. Die Schutzüberzüge können durch Imprägnieren von Fortpflanzungsmaterial mit einer flüssigen Formulierung oder durch Überziehen mit einer kombinierten nassen oder trockenen Formulierung aufgetragen werden. Andere Auftragungsverfahren sind ebenfalls möglich, wie z. B. die auf die Knospen oder Frucht gerichtete Behandlung.

[0103] Es ist ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung neue landwirtschaftliche Verfahren wie die oben exemplarisch dargestellten Verfahren, die durch die Verwendung von transgenen Pflanzen, transgenem Pflanzenmaterial oder transgenem Saatgut gemäß der vorliegenden Erfindung gekennzeichnet sind, bereitzustellen.

[0104] In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein(e) transgene(s) Pflanzenzelle, Gewebe, Organ, Saatgut oder Pflanzenteile, die aus der transgenen Pflanze erhalten werden. Ebenfalls eingeschlossen innerhalb der Erfindung sind transgene Nachfahren der Pflanze sowie transgene Pflanzenzellen, Gewebe, Organe, Samen und Pflanzenteile, die aus den Nachkommen erhalten werden.

[0105] In einer anderen Ausführungsform kann das heterologe Polynukleotid zur Verwendung in der Erfindung auch als selektierbarer Marker in Transformationsverfahren verwendet werden. In diesem Aspekt wird die Wirtszelle mit einem zweiten heterologen Polynukleotid von Interesse sowie einem heterologen Polynukleotid der Erfindung, das ein Genprodukt codiert, das Trichothecenresistenzaktivität umfaßt, unter Verwendung von Expressionskassetten und Transformationstechniken transformiert, die oben exemplarisch dargestellt wurden und fachbekannt sind. Nach der Transformation werden die transformierten Zellen auf ihre Fähigkeit zum Überleben bei Kontakt mit einem Trichothecen, insbesondere DAS oder DON oder T-2-Toxin, selektiert. Die Wirtszelle kann eine eukaryontische oder prokaryontische Wirtszelle unter Verwendung von fachbekannten Transformations- und Expressionssystemen sein. Die Wirtszelle kann eine Pflanzenzelle, eine Pilzzelle, eine bakterielle Zelle, eine Hefezelle, eine tierische Zelle oder eine Insektenzelle sein.

[0106] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Polynukleotid, das ein Genprodukt codiert, das Trichothecenresistenzaktivität umfaßt, als selektierbarer Marker in Pflanzenzelltransformationsverfahren verwendet. Zum Beispiel können Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzensamen oder Pflan-

zenzellen, die wenigstens eine zweite heterologe DNA-Sequenz von Interesse exprimieren, auch zur Expression einer Sequenz transformiert werden, die ein Polypeptid codiert, das eine Sequenz umfaßt, die im wesentlich ähnlich derjenigen von SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 ist. Die transformierten Zellen werden auf ein Medium überführt, das ein phytotoxisches Trichothecen enthält, insbesondere DAS und/oder DON und/oder T-2-Toxin, in einer Menge, die ausreichend zur Inhibierung des Wachstums oder der Überlebensfähigkeit von Pflanzenzellen ist, die nicht das Polypeptid exprimieren, das im wesentlichen ähnlich demjenigen mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 ist, worin nur die transformierten Zellen wachsen werden oder unverkrüppelt sein werden. Konzentrationen von Trichothecenen, die nützlich zur Selektion von Pflanzen sind, die das Polypeptid exprimieren, das im wesentlichen ähnlich demjenigen mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2, 6 oder 8 ist, reichen von 1 bis 90 µg/ml. Das Verfahren ist anwendbar für jede Pflanzenzelle, die ein Polynukleotid exprimieren kann, das eine Nukleotidsequenz umfaßt, die im wesentlichen ähnlich derjenigen von SEQ ID NO: 1, 5 oder 7 ist, und kann mit jeder heterologen DNA-Sequenz von Interesse verwendet werden. Die Expression der zweiten heterologen DNA-Sequenz und des heterologen Polynukleotids der Erfindung und wie hier beschrieben kann durch den gleichen Promotor angetrieben werden, der in Pflanzenzellen funktionell ist, oder durch separate Promotoren.

Beschreibung der Sequenzen:

SEQ ID NO: 1 ist eine cDNA-Sequenz aus Fusarium sporotrichioides, die ein Polypeptid der Erfindung mit Trichothecenresistenzaktivität codiert.
SEQ ID NO: 2 ist das Polypeptid mit Trichothecenresistenzaktivität, das durch SEQ ID NO: 1 codiert wird.
SEQ ID NO: 3 ist ein DNA-Primer.
SEQ ID NO: 4 ist ein DNA-Primer.
SEQ ID NO: 5 ist eine DNA-Sequenz aus Fusarium graminearum, die ein Polypeptid der Erfindung mit Trichothecenresistenzaktivität codiert.
SEQ ID NO: 6 ist das Polypeptid mit Trichothecenresistenzaktivität, das durch SEQ ID NO: 3 codiert wird.
SEQ ID NO: 7 ist eine DNA-Sequenz aus Saccharomyces cerevisiae, die ein Polypeptid der Erfindung mit Trichothecenresistenzaktivität codiert.
SEQ ID NO: 8 ist das Polypeptid mit Trichothecenresistenzaktivität, das durch SEQ ID NO: 5 codiert wird.
SEQ ID NO: 9 ist die DNA-Sequenz von pCIB9818.
SEQ ID NO: 10 ist die DNA-Sequenz von pAgroTRIr.
SEQ ID NO: 11 ist die DNA-Sequenz von pNOV1704.

Beispiele

[0107] Die folgenden Beispiele beschreiben ferner die Materialien und Methoden, die bei der Durchführung der Erfindung und in den anschließenden Ergebnissen verwendet wurden. Sie werden zur Veranschaulichung angeboten, und ihre Aufführung sollte nicht als Beschränkung der beanspruchten Erfindung betrachtet werden.

Beispiel 1: Zusammensetzung von pNOV1700, pCIB9818, pAgroTRIr und pNov1704

1. pNOV1700:

[0108] pNOV1700 wurde unter den Bedingungen des Budapester Vertrages am 19. März 1999 bei dem Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 Northern University Street, Peoria, Illinois 61604, USA hinterlegt und der Eingangsnummer NRRL B-30117 zugewiesen.

[0109] Entsprechend umfaßt pNOV1700 SEQ ID NO: 1, funktionsfähig verbunden mit dem Z. mays Ubiquitin-Promotor, einschließlich eines Teils des Exons und Introns, und mit dem Nopalinsynthase-Polyadenylierungssignal.

2. pCIB9818

[0110] Plasmid pCIB9818 ist ein ringförmiges Plasmid mit 6111 Basenpaaren mit einer DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 9. Der Z. mays Ubiquitin-Protomor, Basen 12 bis 1993 von SEQ ID NO: 9, einschließlich eines Teils des Exons, Basen 896 bis 1011, und das Intron, Basen 1047 bis 1993, ist funktionsfähig mit dem selektierbaren Phosphatmannoseisomerase-Marker, Basenpaare 2090 bis 3193, dem invertierten PEPC-Intron #9 von Base 3248 bis 3355 und der Terminationssequenz des CaMV 35S-Gens, Basen 3357 bis 3434, verbunden.

3. pAgroTRIr

[0111] Plasmid pAgroTRIr ist ein ringförmiger binärer Vektor mit 13.737 Basenpaaren mit einer DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 10. Entsprechend umfaßt pAgroTRIr einen selektierbaren Marker, der funktionsfähig mit einem Promotor und einer Terminationssequenz verbunden ist, und die Polynukleotidregion von SEQ ID NO: 1 hinter und im Raster mit dem Arabidopsis thaliana UBI 3-Promotor (S. Norris, S. Meyer und J. Callus, Plant Molecular Biology 22: 895–906, (1993)) und vor und im Raster mit dem nos-Polyadenylierungssignal.

4. pNov1704

[0112] Plasmid pNOV1704 ist ein ringförmiger binärer Vektor mit 12949 Basenpaaren mit einer DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 11. Der Z. mays Ubiquitin-Promotor, Basen 11 bis 1992 von SEQ ID NO: 11 (einschließlich Exon 1: 895 bis 1010 und Intron 1: 1046 bis 1992), ist funktionsfähig mit der selektierbaren Phosphatmannoseisomerase-Markersequenz, Basen 2089 bis 3192, und der Nopalinsynthase-Terminationssequenz, Basen 3557 bis 3688, verbunden. pNOV1704 umfaßt ferner den Z. mays Ubiquitin-Promotor, Basen 9218 bis 11218 (einschließlich Exon 1:10110 bis 10224 und Intron 1:10225 bis 11218), funktionsfähig verbunden mit der Trichothecen-3-O-acetyltransferase-Sequenz von SEQ ID NO: 1 bei Base 11234 bis 12662 und der nos-Terminationssequenz 12667 bis 12935.

Beispiel 2: Weizentransformation, -selektion und -regeneration Transformation

[0113] Unreife zygotische Embryos (0,75–1,25 mm) werden von oberflächensterilisierten Weizenkaryopsen (10% Chlorox × 10 Minuten) seziert, dann mit dem Scutellum nach oben auf ein MS-basiertes Medium ausplattiert (Murashige und Skoog, (1962) Physiol. Plant 15: 473–439), das mit 3% Saccharose, 3 mg/l 2,4-D (Dichlorphenoxyessigsäure), 150 mg/l Glutamin und 75 mg/l Asparagin ergänzt und mit 0,7% Phytagar verfestigt ist (3MS3S-Medium). Die Embryos werden in der Dunkelheit bei 28°C für 5–10 Tage vor der Bombardierung inkubiert. Die optimale Zeit für die Bombardierung ist 6–7 Tage nach dem Ausplattieren. 4 Stunden vor der Bombardierung werden die Embryos auf ein Plasmolysemedium gesetzt (das gleiche Medium wie oben beschrieben, aber mit 15% Maltose versetzt, anstelle der Saccharose) und in einem Kreis mit 2,5 cm Durchmesser mit dem Scutellum nach oben angeordnet.

[0114] pNOV1700, oben beschrieben in Beispiel 1, wird mit PvuII und XmnI verdaut, und ein 4117 bp Fragment, das eine Polynukleotidregion mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 sowie den Ubiquitin-Promotor und NOS-Polyadenylierungssignal umfaßt, wird isoliert. pCIB9818, ebenfalls oben in Beispiel 1 beschrieben, wird mit AscI verdaut, und das 4246 bp Fragment wird isoliert, das den UBI-Maispromotor, einen selektierbaren Marker und eine CaMV 35S-Terminationssequenz umfaßt.

[0115] Die isolierten DNA-Fragmente werden auf 0,3 µm Goldpartikel unter Verwendung des standardmäßigen Stanford-Verfahrens präzipitiert. Unter kontinuierlichem Verwirbeln werden 5 µg der isolierten Fragment-DNA pro Konstrukt, 50 µl 2,5 M $CaCl_2$ und 20 µl 0,1 M Spermidin zu einem Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben, das 50 µl 50%iges Glycerin und 3 mg Gold enthält. Die DNA/Gold-Mischung wird zweimal mit Ethanol gespült. Nach Verwerfen des Überstands aus der letzten Spülung wird Ethanol auf ein Endvolumen von 70 µl hinzugegeben. Dies liefert sechs Schüsse pro Röhrchen mit Gold/DNA. Die Zielplatten werden zweimal beschossen, so daß es eine Übertragung von ca. 3 µg DNA (falls 5 µg jedes der zwei Konstrukte verwendet werden, was gewöhnlich der Fall ist) und 1,0 mg Gold pro Zielplatte ergibt. Der verwendete Berstdruck beträgt 7,584 MPa (1100 psi). Nach der Bombardierung werden die Zielplatten über Nacht in die Dunkelheit zurückgebracht. Nach ca. 24 Stunden Plasmolyse werden die Embryos auf 3MS3S entfernt und für 3 Wochen zur Callus-Einleitung in die Dunkelheit zurückgebracht. Keine Subkultivierung erfolgt während dieses Zeitraums.

Selektion/Regeneration

[0116] Das embryogene Gewebe, das sich während des 3-wöchigen Einleitungszeitraums entwickelt, wird vom nicht-embryogenen Gewebe wegseziert und auf ein Regenerations-/Selektionsmedium plaziert. Das grundsätzliche Regenerationsmedium ist 3MS3S ohne 2,4-D, aber mit stattdessen hinzugegebenem 1 mg/l GA3 (Gibberellin A_3), NAA (1-Naphthalinessigsäure) und NAA (als NG-Medium bezeichnet). 10 g/l Mannose und 5 g/l Saccharose werden hinzugegeben (NG1M.5S). Das Gewebe wird dieser Anfangsphase der Regeneration und Selektion für 2 Wochen unterworfen. Für den Großteil des 2-wöchigen Zeitraums befindet sich das Gewebe im hellen Raum. Die Schösslings- und Wurzelentwicklung beginnt während dieser Phase, und nach 2 Wochen wird das gesamte Gewebe in die nächste Stufe überführt.

[0117] Für die zweite Phase der Regeneration und Selektion mit Mannose-Selektion wird Mannose auf 5 g/l verringert und die Saccharose auf 20 g/l erhöht (MS2S.5M). Das Gewebe bleibt normalerweise auf diesen Medien für ca. 4 Wochen, wobei eine weitere Schösslings- und Wurzelentwicklung erfolgt.

[0118] Kräftig wachsende Pflänzchen mit guter Farbe und Wurzel- und Schösslingsentwicklung werden von den Platten entfernt und in größere, als GA7 bezeichnete Behälter plaziert. Dies ist die Endstufe der Selektion und Regeneration. Das Medium enthält nur 1/2 MS-Salze und 15 g/l Mannose. Der beste Indikator, daß eine Pflanze transformiert werden kann, ist die Beobachtung von aktivem Wurzelwachstum in das Medium. Blattgewebe aus aktiv wachsenden Pflänzchen wird gesammelt, und eine PCR-Reaktion wird für entweder das Gen von Interesse oder den selektierbaren Marker vor der Überführung in das Gewächshaus durchgeführt.

Beispiel 3: Arabidopsis-Transformation

[0119] Das vorstehend in Beispiel 1 beschriebene binäre Vektorkonstrukt pAgroTRIr wird in dem Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3101 (N. Bechtold et al., CR Acad. Sci. Paris, Science de la vie, 316; 1194–1199 (1993)) durch Elektroporation (W. J. Dower, Mol. Biol. Rep. 1: 5 (1987)) transformiert. Eine 25 ml-Kultur einer einzelnen Kolonie des GV3101-Agrobacteriums, enthaltend pAgroTRIr-Plasmide, in YEB + Rifampicin 100 und Kanamycin 100, wird bei 30°C über Nacht inkubiert. Größere Kulturen werden durch Animpfen von 500 ml des gleichen Mediums mit 5 ml der kleinen Kultur gestartet und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Kultur-OD bei 600 nm wird bestimmt und die Kulturen werden dann bei 5 K im GSA-Rotor für 15 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen werden in "IM-modifizierten Infiltrationsmedium" resuspendiert, um eine End-OD bei 600 nm von 0,08 zu erreichen. 200 Mikroliter an Silwet pro Liter suspendierter Zellen wird zugesetzt. Drei Gefäße von vorzeitig Samen-bildender Arabidopsis var Columbia-Pflanzen, ungefähr 4 Pflanzen pro Gefäß, werden in etwa 500 ml einer Zellsuspension invertiert. Die Blüten werden in der Zellsuspension geschüttelt, um die Luftblasen zu entfernen, und die Pflanzen werden in der Zellsuspension für 15 Minuten inkubiert. Eine Haube wird auf das Tablett gesetzt, um die Pflanzen über Nacht unter Feuchtigkeit zu belassen.

[0120] Den Pflanzen wird ermöglicht etwa 3 bis 4 Wochen zu wachsen, wobei die Pflanzen danach für bis zu 1 Woche nicht gewäßert werden. Samenhülsen werden gesammelt und in einem Trockenraum für etwa 1 1/2 Wochen getrocknet. Die Samen werden gepflanzt und es ihnen ermöglicht für etwa 2 Wochen zu wachsen. Die Pflanzen werden mit dem Selektionsmittel besprüht und erneut 2 und 4 Tage später besprüht. Nach etwa 3 Tagen können die überlebenden Pflanzen in neue Töpfe umgesetzt werden.

Beispiel 4: Biolistische Maistransformation

[0121] Embryonale Kallus-Kulturen vom Typ I (Green et al. 1983, Somatic cell genetic systems in corn. A. Fazelahmad, K. Downey, J. Schultz, R. W. Voellmy, Hrsg. Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposium Series, Bd. 20, Academic Press, NY) werden aus unreifen Mais-Embryonen initiiert, die 1,5 bis 2,0 mm in Länge sind, von im Gewächshaus gewachsenen Material. Die Embryos werden aseptisch aus den Oberflächen-sterilisierten Kolben ungefähr 14 Tage nach Bestäubung herausgeschnitten. Die Embryos werden auf D-Kallus-Initiationsmedium (Duncan et al. (1985), Plants 165: S. 322–332) mit 2% Saccharose und 5 mg/l Chloramben gesetzt. Die Embryos und embryogenen Kulturen werden anschließend im Dunkeln kultiviert. Die embryogenen Reaktionen werden von den Explantaten nach etwa 14 Tagen herausgeschnitten. Die Reaktionen werden auf D-Kallus-Beibehaltungsmedium mit 2% Saccharose und 0,5 mg/l 2,4-D gesetzt. Nach etwa 6 Wochen einer wöchentlichen selektiven Subkultur in frisches Beibehaltungsmedium werden hochqualitative kompakte embryogene Kulturen gebildet. Aktiv wachsende embryogene Kallus-Stücke werden als Zielgewebe für die Genübertragung ausgewählt. Die Kallus-Stücke werden auf Zielplatten, enthaltend Beibehaltungsmedium mit 12% Saccharose, ca. 4 Stunden vor der Genübertragung gesetzt.

[0122] Die Kallus-Stücke werden in Kreisen angeordnet, mit Durchmessern von 8 und 10 mm ausgehend vom Zentrum der Zielplatte.

[0123] pNOV1700, vorstehend in Beispiel 1 beschrieben, wird mit PvuII und XmnI verdaut und ein Fragment von 4117 bp, umfassend eine Polynukleotidregion mit einer Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 1 sowie einen Promotor und ein Polyadenylierungssignal, wird isoliert. pCIB9818, ebenfalls vorstehend in Beispiel 1 beschrieben, wird mit AscI verdaut und das Fragment von 4246 bp, umfassend das Marker-Gen, den Promotor und das Terminationssignal, wird isoliert. Die isolierten DNA-Fragmente werden auf einen Gold-Mikroträger, wie in dem Biolistics-Handbuch von DuPont beschrieben, präzipitiert. 2 bis 3 µg jedes Plasmidkonstrukts wird in jeder der 6 Schußmikroträger ("shot microcarrier")-Zubereitungen verwendet. Die Polynukleotide der Erfin-

dung werden unter Verwendung der PDS-1000He-Biolistic-Vorrichtung in die Ziel-Gewebezelle übertragen. Die Einstellungen der Biolistic-Vorrichtungen sind wie folgt: 8 mm zwischen der Berstscheibe und dem Makroträger, 10 mm zwischen dem Makroträger und dem Sperrfilter und 7 cm zwischen dem Sperrfilter und dem Ziel. Jede Zielplatte wird zweimal unter Verwendung von Berstscheiben bei 4,482 mPa (650 psi) beschossen. Ein 200 × 200-Siebgewebe aus rostfreiem Stahl (McMaster-Carr, New Brunswick, NJ) wird zwischen den Sperrfilter und dem Zielgewebe plaziert. 7 Tage nach der Genübertragung werden die Zielgewebestücke aus dem hochosmotischen Medium in ein Selektionsmedium überführt.

[0124] Das Zielgewebe wird auf ein Beibehaltungsmedium gesetzt, das keine Saccharose und 1% Mannose enthält. Nach 3 bis 5 Wochen werden die wachsenden Kallus-Stücke zum Beibehaltungsmedium subkultiviert, das keine Saccharose und 1,5% Mannose enthält. Der embryogene Kallus, der auf dem Selektionsmedium wächst, wird alle zwei Wochen für 6 bis 10 Wochen subkultiviert, bis genug Kallus produziert wird, um 10 bis 20 Pflanzen zu erzeugen. Gewebe, das ausgehend vom ursprünglichen Zielgewebestück die Selektion überlebt, wird als eine Einzelkolonie subkultiviert und als ein unabhängiges Transformationsereignis bestimmt. Kolonien werden in ein modifiziertes MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962 (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Pysiol. Plant 15: 473–497) überführt, das 2% Saccharose und 1% Mannose (MS2S + 1M) mit 0,25 mg/l Ancymidol und 0,5 mg/l Kinetin enthält. Nach 2 Wochen werden die regenerierten Kolonien dann in MS2S + 1M ohne Hormone überführt. Die regenerierten Sprößlinge mit oder ohne Wurzeln aller Kolonien werden in Magentakisten überführt, die MS3S-Medium enthalten, und kleine Pflanzen mit Wurzeln werden gewonnen und in Erdboden im Gewächshaus überführt.

Beispiel 5: Analysen der transgenen Pflanzenexpression

[0125] Gewebe aus transformierten Pflanzen wird auf Gegenwart eines Polynukleotids analysiert, das die Sequenz von SEQ ID NO: 1 umfaßt. DNA wird aus transformierten Pflanzen extrahiert, und PCR-Analysen werden gemäß Standardprotokollen durchgeführt. Die für die Amplifikation der Genkonstrukte verwendeten Primer sind (5'-acgaatcattcaccgaggag-3') (SEQ ID NO: 3) und (5'-ctcacactctcaggcttacc-3') (SEQ ID NO: 4). Ein 650 nt-Fragment innerhalb der Sequenz von SEQ ID NO: 1 in Weizen, erhalten gemäß dem obigen Beispiel 2, wird detektiert.

b. Northern-Analyse

[0126] Transformierte Pflanzen werden auf Gegenwart von RNA durch Northern-Blot-Hybridisierung analysiert. Für die Northern-Blot-Analyse wird aus Pflanzengewebe extrahierte RNA nach Größe getrennt und auf eine Nylon-Membran getüpfelt. Diese Membran wird anschließend mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert, die aus dem 429 nt StyI-Fragment des Polynukleotids gemäß SEQ ID NO: 1 abgeleitet ist. RNA wird in Weizenpflanzen und Arabidopsis-Pflanzen detektiert, die gemäß den obigen Beispielen 2 und 3 transformiert wurden.

Beispiel 6: Enzymatischer Test auf Trichothecen-3-O-acetyltransferase-Aktivität.

(a) Extraktion von Pflanzengewebe für Enzymtests:

[0127] Drei Blattstücke mit 1 × 3,175 mm (1/8 in) (ca. 50 mg) aus transgenen Pflanzen der Erfindung und wie hier beschrieben, einschließlich derjenigen, die gemäß den obigen Beispielen 2–4 transformiert und regeneriert wurden, werden ausgewählt.

(b) Glasperlenmühle:

[0128] Gewebe wird in ein rundbödiges 2 ml-Reagenzglas gegeben und der Deckel geschlossen. Das Reagenzglas wird in flüssigen Stickstoff getaucht und über Nacht bei –80°C inkubiert. Das Reagenzglas wird auf Saws-all 24 Sekunden geschüttelt, und 0,4 ml Natriumphosphatpuffer werden hinzugegeben. Das Reagenzglas wird für ca. 10 Sekunden verwirbelt und auf Eis gestellt. Das Reagenzglas wird für weitere 5 Minuten verwirbelt und dann mit 14.000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und in ein sauberes Reagenzglas gegeben.

[0129] Die folgenden Komponenten werden vermischt:
Trichothecensubstrat, 2 µl DAS (20% Aceton in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0). DON kann auch verwendet werden.
Acetyl-CoA-Substrat, 2 µl [^{14}C]-Acetyl-CoA, NEN-Katalog # NEC313 (60 mCi/mmol und 0,02 mCi/ml)

Puffer auf ein Endvolumen von 50 µl mit Natriumphosphatpuffer, pH 7,0.
Der Test wird durch Zugabe der folgenden Enzymzubereitung eingeleitet und bei 30°C für 15 Minuten inkubiert. Enzymzubereitung, 10 µl Pflanzenextrakt in Natriumphosphatpuffer, pH 7.0.

[0130] Nach 15 Minuten werden 100 µl Ethylacetat hinzugegeben, und das Reagenzglas wird zweimal für mehrere Sekunden verwirbelt. Das Reagenzglas wird für 2 Minuten bei 14.000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. 50 µl der Ethylacetatphase werden entfernt und in ein Fläschchen gegeben, das eine Szintillationsmischung enthält. Das Reagenzglas wird für 2 min unter Verwendung eines Szintillationszählers gezählt.

[0131] Zwanzig separate Weizenpflanzen, erhalten gemäß dem obigen Beispiel 2 und mit spezifischen Aktivitäten von 0,60 bis 13,4 nmol acetyliertes Produkt/µg Protein/15 min, werden identifiziert. Die spezifischen Aktivitäten in den transformierten Weizenpflanzen sind signifikant größer als die Negativkontrolle. Die Negativkontrolle ist eine nicht-transformierte Weizensorte, die eine spezifische Aktivität von 0,1 bis 0,2 nmol acetyliertes Produkt/µg Protein/15 min hat.

[0132] Fünf separate Arabidopsis-Pflanzen, erhalten gemäß dem obigen Beispiel 2 und mit spezifischen Aktivitäten von 3,8 bis 28 nmol acetyliertes Produkt/µg Protein/15 min, werden identifiziert. Die spezifischen Aktivitäten in den transformierten Pflanzen sind signifikant größer als die Negativkontrolle. Die Negativkontrolle ist eine Arabidopsis thaliana var Colubia, die mit einem Nukleinsäurekonstrukt für die Expression des selektierbaren Markers transformiert ist, die eine spezifische Aktivität von weniger als 0,1 nbmol acetyliertes Produkt/µg Protein/15 min hat.

[0133] Maispflanzen von wenigstens zwei unterschiedlichen Transformaten, erhalten gemäß dem obigen Beispiel 4 und mit spezifischen Aktivitäten von 11,1 bis 17,9 nmol acetyliertes Produkt/ug Protein/15 min, werden identifiziert. Die spezifischen Aktivitäten in den transformierten Pflanzen sind signifikant größer als die Negativkontrolle. Die Negativkontrolle ist eine nicht-transformierte Maissorte, die eine spezifische Aktivität von weniger als 0,2 nmol acetyliertes Produkt/ug Protein/15 min hat.

[0134] Maispflanzen von wenigstens 16 verschieden Transformanten, erhalten durch Verwendung einer Agrobacterium-vermittelten Transformation von pNOV1704, mit spezifischen Aktivitäten im Bereich von 17 bis 183 µmol/µg/15 min werden identifiziert.

Beispiel 7: Biotest auf Trichothecenresistenz in transgenen Pflanzen

[0135] 250 ml CPR-Medium mit den folgenden Komponenten wird hergestellt und der pH auf 6,5 mit KOH eingestellt.
1/2 MS-Salze 0,54 g
1/2 MS-Vitamine 1,25 ml
Saccharose 1% (optional) 2,50 g

[0136] Agarose wird zum obigen Medium auf eine Konzentration von 1% hinzugegeben (2,50 g), und das Medium wird autoklaviert. 25 ml von 50 mg/ml Chlorphenolrot werden zum Medium hinzugegeben.

[0137] Während das Medium auf 55°C gehalten wird, wird DAS oder DON in Aceton mit verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben (d. h. DON mit 4, 8 oder 16 µl von 10 mg/ml oder DAS mit 2, 4 oder 6 µl von 50 mg/ml DAS auf 1,7 ml). Ca. 0,5 ml Medium werden in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 48 Vertiefungen abgeteilt.

[0138] Stücke von transformiertem Blattgewebe mit 8,467 mm × 3,175 mm (1/3 × 1/8 Zoll) werden zu den Vertiefungen der Mikrotiterplatte sowie Kontrollgewebe aus untransformierten Kontrollen vom Wildtyp gegeben. Man lässt die Blattstücke in eine Petrischale fallen und drückt sie mit Pinzetten in das Medium in den Vertiefungen in der Mikrotiterplatte. Die Mikrotiterplatten werden für 2 bis 4 Tage bei 20°C unter Licht inkubiert. Der Blattstückstoffwechsel führt zu einer Farbveränderung (Abfall des pH) von Rot nach Gelb. Trichothecenresistenzaktivität oder eine reduzierte Empfindlichkeit für Trichothecene durch die Transformanten führt zu gelb gefärbten Vertiefungen in Gegenwart von DAS oder DON.

[0139] Eine Farbveränderung von Rot nach Gelb im Vergleich mit der Kontrolle, die rot bleibt, wird in Weizenpflanzen der Erfindung und wie hier beschrieben beobachtet. Außerdem besitzen die individuellen Blattstücke eine signifikant geringere Chlorose als die entsprechende Kontrolle.

Beispiel 8: Keimungstest

A. Trichothecenresistenz-Keimungstest

[0140] Saatgut aus transgenen Pflanzen der Erfindung wird unter Selektionsdruck aus dem Selektionsmittel kultiviert, und die resultierenden Pflanzen werden geselbstet. Das resultierende Saatgut wird auf MS3S-Medium (MS-Salze 4,3 g/l, MS-Vitamine 100X, Saccharose 30 g/l und Phytagar 8 g/l) ausplattiert und mit entweder DAS oder DON (mit 20 mg/ml) in einer Dichte von 1.000 bis 1.200 Samen/Petrischale (100 mm Durchmesser) ergänzt. Nach Inkubation im Licht für 4 Tage werden die Platten auf Sämlingswachstum untersucht.

[0141] Arabidopsis-Saatgut aus Pflanzen, erhalten gemäß dem obigen Beispiel 3 und kultiviert in Medium, das DAS umfaßt, weist zahlreiche Pflanzen auf, mit sowohl Wurzel- als auch Sprößlingsentwicklung. Während Kontrollsaatgut (parentale Arabidopsis-Linie, var. Colubia) schwach keimt und keine Wurzel ausbildet, wenn in DAS-ergänzten Medium kultiviert. Es werden keine Unterschiede zwischen transformierten und Kontrollsaatgut beobachtet, die im gleichen Medium ohne DAS kultiviert werden.

B. Pilzresistenz-Keimungstest zur Detektion von Resistenz gegen Streifenkrankheit ("Seedling Blight")

1. Pilzresistenz-Keimungstest für Weizen:

[0142] Pilzresistenz-Keimungstests in Weizen werden im wesentlichen wie von R. H. Proctor, T. M. Hohn und S. P. McCormick beschrieben durchgeführt (Reduced virulence of Gibberella zaea caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. Mol. Plant-Microbe Interact. 8(4): 593–601, 1995).

[0143] Inokulum besteht aus Makrokonidien of F. graminearum, verdünnt in Wasser auf 1×10^6 Konidien pro ml. Inokulum wird durch Spülen der Makrokonidien aus V-8-Juice-Agar-Kulturen hergestellt, die unter weißem und nahem UV-Fluoreszenzlicht für 7–10 Tage kultiviert wurden. In Sämlingstests werden Samen aus zwei unterschiedlichen transgenen Weizenereignissen aus dem obigen Beispiel 2 und der Kontrolle vom Wildtyp durch Spülen in einer Lösung mit 10% Bleiche und 0,05% Tween für ca. 15 min oberflächensterilisiert und fünfmal mit sterilem destilliertem Wasser gespült. Die Samen werden in einer Suspension der Makrokonidien für ca. 10 min getränkt und dann in Vermiculit ausgesät, das in 10 cm-Plastiktöpfen enthalten ist (20 Samen pro Topf). Vor dem Aussäen werden die Töpfe zu ca. 3/4 mit Vermiculit gefüllt und in 2–4 cm Wasser gestellt, bis die Oberseite des Vermiculits nass ist. Nach dem Aussäen werden die Samen mit zusätzlichen 1–2 cm Vermiculit bedeckt, und die Töpfe werden individuell in Kunststoffbeutel gestellt und in einer Wachstumskammer bei 22°C mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit für 1 Woche inkubiert. Nach etwa 1 Woche werden die Töpfe aus den Beuteln entfernt, und nach 2 Wochen wird die Krankheit durch Zellen der Anzahl der Sämlinge ausgewertet, die in jedem Topf aufgehen. Kontrollen werden wie oben beschrieben behandelt, außer daß die Samen in sterilem Wasser getränkt werden und 40 Samen verwendet werden.

[0144] 50% und 43% des Saatguts aus den zwei unterschiedlichen transgenen Pflanzenereignissen keimen im Vergleich mit dem gleichen transgenen Saatgut, das mit Wasser behandelt wurde, wohingegen 17% der Kontrolle vom Wildtyp im Vergleich mit dem gleichen Saatgut keimen, das mit Wasser behandelt wurde.

2. Pilzresistenz-Keimungstest für Mais:

[0145] Ein Inokulum wird aus F. graminearum-Kulturen, kultiviert auf Mung-Bohnen-Agar (hergestellt aus Flüssigkeit von gekochten Mung-Buhen) unter über 12 h wechselnden Licht- und Dukelheits-Zyklen bei 25°C, hergestellt. Sporen werden zunächst durch Überschwemmen der Platte mit sterilem Wasser und dann durch Schaben der Platte unter Verwendung eines Glasstabs geernetet. Die Lösung wird gesammelt und die Spurenkonzentration auf 1×10^6 Sporen/ml mit 2-fach destilliertem sterilem Wasser ab dem Tag der Animpfung eingestellt.

[0146] Erdboden, bestehend aus einem sterilisierten Gemisch aus Erdboden, Torf und Vermikulit, wird mit 1 ml an Spurenlösung pro Liter Erdboden in 5 l-Sandbänke angeimpft, und der angeimpfte Erdboden wird in einem Zementmischer für 2 Minuten pro Ladung gemischt. Die Kontrollbehandlungen bestehen aus nicht-befallenem Erdboden. Die Sandbänke werden jeweils mit 30 Körnern des erfindungsgemäßen transgenen Saatguts oder mit Wildtypkontrolle bepflanzt und in Gewächskammern inkubiert, gehalten unter halbgesättigten Erdbodenbedingungen bei 12,8°C (55°F) für bis zu 4 Wochen. Die Lichtmengen sind unter 24 Stunden Dunkelheit für 14 Tage nach Pflanzung und 12 Stunden Licht 15 bis 24 Tage nach Pflanzung. Markierte Stangen werden zu den Sandbänken gegeben, und die Sandbänke werden in die Gewächskammer umgesetzt und randomi-

siert.

[0147] Die Pflanzenzählungen werden intiiert sobald das Hervortreten beginnt und werden täglich oder alle zwei Tage durchgeführt, bis es keine weitere Änderung im Pflanzenhervortreten gibt.

[0148] Symptome von visueller Verfärbung und Umfallkrankheit (damping-off) des Keimlingauswuchses werden bestimmt und zum Charakterisieren des Grads der Pflanzenresistenz im Vergleich zu den Wildtypkontrollen verwendet. Pflanzen mit weniger visueller Verfärbung und/oder Umfallkrankheit des Keimlingauswuchses als die Wildtypkontrolle werden ausgewählt.

Beispiel 9: Pilzresistenztest

A. Untersuchung von transgenen Weizenpflanzen

[0149] Weizen-Weißährigkeit ("head blight", "head scab") wird durch Fusarium graminearum verursacht (Teleomorph: Gibberella zeae). F. graminearum-Kulturen werden auf V-8-Agar-Medium, hergestellt mit V-8-Juice) oder auf Mungbohnenagar (hergestellt mit Flüssigkeit aus gekochten Mungbohnen) unter 12-stündigen abwechselnden Hell-/Dunkel-Zyklen bei 25°C kultiviert. Sporen werden geerntet, indem zuerst die Platte mit sterilem Wasser geflutet und dann die Platte unter Verwendung eines Glasstabs abgeschabt wird. Die Lösung wird aufgefangen und die Spurenkonzentration auf 5×10^4 Sporen/ml mit doppelt destilliertem, sterilem Wasser am Tag der Inkubation eingestellt.

[0150] Transgene Pflanzen werden wie im obigen Beispiel 2 beschrieben erhalten, und Kontrollpflanzen können im Gewächshaus bis zur Blütezeit oder Ährenbildung kultiviert werden. Ähren werden durch Injizieren von ca. 20 µl (ca. 1.000 Sporen) Inokulum zwischen das Lemma und die Palea einer Blüte nahe der Mitte der Ähre beimpft. Einige Ähren werden unbeimpft belassen oder werden mit sterilem Wasser als Kontrollen beimpft. Die Pflanzen werden dann in eine Wachstumskammer gebracht und unter hoher Feuchtigkeit für bis zu 21 Tage inkubiert, oder Pflanzen werden zuerst in einer Nebelkammer für 72 h bei 18,3 bis 21,1°C (65 bis 70°F) inkubiert und dann im Gewächshaus für weitere 18 Tage inkubiert.

[0151] Transgene Pflanzen der Erfindung und wie hier beschrieben und Kontrollpflanzen können auch auf dem Feld kultiviert werden, wo die Ähren durch Besprühen beimpft werden.

[0152] Die Krankheit wird durch Zählen der Anzahl von symptomatischen und asymptomatischen Ährchen auf jeder beimpften Ähre auf einer repräsentativen Anzahl von transgenen Ähren und Kontrollähren vom Wildtyp und daraus durch Berechnung des Prozentanteils von Ährchen auf jeder Ähre, die symptomatisch sind, ausgewertet. Symptome bestehend aus einem verfrühten Weißwerden im Vergleich mit den Kontrollpflanzen und in manchen Fällen in der Nekrose von Ährchen. Pflanzen mit weniger symptomatischen Ährchen als die Kontrolle vom Wildtyp werden selektiert.

[0153] Sechs unterschiedliche transgene Pflanzen mit unterschiedlichen Kopiezahlen von SEQ ID NO: 1 und unterschiedlichen Zahlen von Insertionsorten gemäß Southern-Daten haben einen durchschnittlichen Prozentwert von symptomatischen Ährchen pro Ähre im Bereich von 10,40% bis 31,20% im Vergleich mit 44,75% für die Kontrolle vom Wildtyp, wenn die transgenen Pflanzen und Kontrollen im Gewächshaus, wie oben beschrieben, inkubiert werden. Die gleichen transgenen Pflanzen haben enzymatische Aktivitäten, gemessen wie im obigen Beispiel 6 beschrieben, im Bereich von 0,874 bis 29,1 nmol/µg/15 min.

B. Testen der transgenen Maispflanzen

Test auf Maisährenverwesung

[0154] Getreideährenverwesung wird durch Fusarium graminearum (teleomorph: Gibberella zeae) verursacht. F. graminearum-Kulturen werden auf V-8-Agarmedium (hergestellt mit V-8-Saft) unter 12-stündigem Wechsel von Licht- und Dunkelheitszyklen bei 25°C kultiviert. Sporen werden zunächst durch Überschwemmen der Platten mit sterilem Wasser und dann durch Schaben der Platten mit einem Glasstab geerntet. Die Lösung wird gesammelt und die Sporenkonzentration auf 5×10^5 Sporen/ml mit zweifach destilliertem sterilem Wasser am Tag der Animpfung eingestellt. Die transgenen Pflanzen und Kontrollpflanzen werden im Gewächshaus oder auf dem Feld gezüchtet. Bei Züchtung im Gewächshaus verbleiben die transgenen und Kontrollpflanzen im Gewächshaus 4 bis 7 Tage nach Seidenauswuchs, wenn eine 2 ml-Sporensuspension in den Seidenkanal (innerhalb der Schotenhülle und oberhalb des Kolbens) eingeführt wird. Dies wird unter Verwendung

einer hyperdermischen 18-Gauge-Nadel aus rostfreiem Stahl, die mit einer großen Spritze verbunden ist, erreicht. Zusätzlich zur Seidenkanalanimpfung wird das Kornanimpfungsverfahren verwendet, um Krankheitsresistenz zu testen. Die Kornanimpfung beinhaltet das Einführen der Sporensuspension (ca. 0,4 ml) in einer Gruppe von vier Körnern durch mehrfache Injektion mit einer 18-Gaugenadel, die mit einer Spritze verbunden ist. Die Erkrankung wird durch visuelle Inspektion der Ähren, die 5 bis 7 Wochen nach Animpfung geerntet werden, auf sichtlich imfizierte Körner beurteilt. Die Beurteilungsskala der Krankheit für Ähren mit einer Hülse basiert auf einer visuellen Schätzung des Prozentsatzes an sichtlich infizierten Körnern auf einer Ähre wie folgt: 1 ist 0%; 2 ist 1 bis 3%; 3 ist 4 bis 10%, 4 ist 11 bis 25%; 5 ist 26 bis 50%, 6 ist 51 bis 75%; 7 ist 76 bis 100%. Maispflanzen werden ausgewählt, die einen niedrigen Prozentsatz an sichtlich infizierten Körnern aufweisen im Vergleich zur Wildtypkontrolle.

Beispiel 10: Mykotoxin-Kontaminationstest

[0155] Proben werden zur Mykotoxin-Konzentrationsanalyse wie folgt hergestellt. Saatgut wird aus transgenen Pflanzen der Erfindung und wie hier beschrieben gesammelt, gewogen und vereinigt. Wenn Weizensaatgut getestet wird, wird Weizensaatgut aus den Ähren der gleichen transgenen Pflanzen der Erfindung und wie hier beschrieben gesammelt und gewogen und vereinigt. Wenn transgener Mais untersucht wird, werden Maiskolben auf ein niedriges Feuchtigkeitsniveau getrocknet, die von Hand geschält und die Körner von den Kolben der gleichen transgenen Pflanze gewonnen und zusammengegeben. Jede Saatgut- oder Körnerprobe wird sorgfältig zur Unterstützung einer zufälligen Verteilung des Saatguts vermischt. Eine Saatgut- oder Körnerprobe von 50 g wird zu einem feinen Pulver in einer Mühle gemahlen (z. B. Retsch Ultrazentrifugenmühle, Typ ZM1, Brinkman Instruments, Inc., Rexdale, Ontario, Romer Series II Mill, Union, Missouri, USA). Die Konzentration des Mykotoxins von Interesse, wie z. B. DON, wird dann unter Verwendung der handelsüblichen Tests, wie DONtest TAG™ Mykotoxin-Testsystem (VICAM, LP, 313 Pleasant Street, Watertown, MA 02472), bestimmt oder durch eine kommerzielle Analysenfirma analysiert (z. B. Romer Labs, Inc., Union, Missouri, USA oder Trilogy Analytical Laboratory, Inc., Beaufort, Missouri, USA). Die Herstelleranleitungen werden für alle Aspekte der Analyse befolgt. Für das DONtest TAG™ Mykotoxin-Testsystem wird eine letzte fluorometrische Messung für DON durchgeführt. Pflanzen, die Saatgut mit weniger Mykotoxin, wie DON, als die Kontrolle vom Wildtyp erzeugen, werden selektiert.

Beispiel 11: Verwendung eines Polynukleotids gemäß SEQ ID.NO: 1 als einen selektierbarer Marker

A. Selektierbarer Marker in Pilzzellen

[0156] Ashbya gossypi wird unter Verwendung von Standard-Pilztransformationstechniken mit einem DNA-Konstrukt, das ein Polynukleotid mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 funktionsfähig verbunden mit dem Galactosidase-Promotor umfaßt, transformiert. Transformierte Zellen wachsen in einem Medium, das DAS bei einer Konzentration im Bereich von 1,56 ng/ml bis 196 pg/ml umfaßt, während die untransformierten Wildtyp-Pilzzellen dies nicht tun.

Selektierbarer Marker in Pflanzenzellen

[0157] Saatgut von Arabidopsis-Pflanzen, die gemäß dem obigen Beispiel 3 transformiert sind, jedoch noch nicht einer Selektion unterzogen wurden, werden in einem 0,1%igen Agarosemedium, enthaltend 0, 5 oder 10 µg/ml DAS, ausplattiert. Nach Inkubation in einem Gewächsraum bei 22°C mit 16 h Licht und 8 h Dunkelheit für 2 Wochen werden die größeren nicht verstümmelten Pflanzen von einer DAS-Platte und eine entsprechende Anzahl wird von der Kontrollplatte verpflanzt.

[0158] Blätter der Arabidopsis-Pflanzen, die von der 5 µg/ml-Platte verpflanzt werden, werden auf enzymatische Aktivität nach einem zweiwöchigen Wachstumszeitraum untersucht, und es ist gezeigt, daß 11 von 11 unverstümmelten Pflanzen enzymatisch aktiv waren, wie durch Beispiel 6 gemessen, während 9 von 10 Pflanzen, die nicht durch DAS selektiert waren, negativ im gleichen Test waren. Die eine nicht-selektierte Pflanze, die enzymatisch aktiv war, war weitaus weniger aktiv als jede der DAS-selektierten getesteten Pflanzen.

[0159] Die oben offenbarten Ausführungsformen sind illustrativ.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Hohn, T.
Salmeron, J.
Peters, C.
Kendra, D.
Reinders, J.
Kuznia, R.
Dill-Mackey, R.

<120> Transgene Pflanze und Verfahren

<130> Sequenzliste

<140>
<141>

<160> 11

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1
<211> 1403
<212> DNA
<213> Fusarium sporotrichioides

<400> 1

atcaaaatgg ccgcaacaag cagcacaagc agccagtctt ttgacataga gctcgacatc 60
atcggccagc aaccgcctct tctttcaatc tacacccaga tcagtctcgt ttaccccgtc 120
tctgatccct cccagtatcc caccatcgtc agcacccttg aggaaggcct aaaacgcctc 180
tctcaaacct tcccatgggt cgcgggccag gtcaagaccg agggcatcag cgaaggaaac 240
acaggaactt ccaagatcat tccatatgag gagacacccc gtcttgtggt gaaagacctc 300
cgtgatgatt cctcagcgcc aacgatcgag gggttgagaa aggcgggttt ccccttagag 360
atgtttgacg agaacgtcgt cgctccgagg aagacattag ctatcggacc tggcaatggc 420
cccaacgacc cgaagcctgt gttgctattg cagctcaact tcattaaggg cggactcatt 480
ctcaccgtca acggacaaca tggtgctatg gacatgacag gacaagatgc aattattcgt 540
cttctctcca aggcgtgccg caacgaatca ttcaccgagg aggaaatctc ggccatgaac 600
ctcgatcgca agacggtagt ccctctcctt gaaaactaca aagttggtcc tgagctagac 660
caccagatcg ccaaacctgc gcctgctggc gacgctccac ccgcaccggc caaggcaagc 720
tgggcgttct tttcattcac tcccaaggcc ctctcggagc tgaaagacgc agccacaaag 780
actcttgacg cgtcgtccaa gtttgtgtca actgatgatg ctctttcggc gtttatctgg 840
caatcaacct cgcgcgtacg tctcgcaaga ttggatgctt ccacacctac tgaattctgc 900
cgcgctgtcg acatgcgggg cccaatgggc gtatcaagca catacccagg ccttcttcaa 960
aacatgacct accatgactc gaccgtcgcc gaaatcgcca acgaaccact tggcgcaaca 1020
gcatcacgcc tgcgctcgga actcaacagt gatcgtttgc gcagacgaac acaagctttg 1080
gcgacgtaca tgcatggcct gcctgacaag tcgagcgtct ccctgaccgc cgatgcgaat 1140
ccgtcaagca gcatcatgct gagttcctgg gccaaggtgg gatgctggga gtatgacttt 1200
gggtttggac tgggtaagcc tgagagtgtg agaagacctc gctttgaacc ttttgagagt 1260
ttgatgtact ttatgcccaa gaagcctgat ggggagttta cggcgtccat ttctctgagg 1320
gatgaggata tggagagact aaaggcggat gaggagtgga caaagtacgc aaagtatatt 1380
gggtagatag tttactagac tac 1403

<210> 2
<211> 459
<212> PRT
<213> Fusarium sporotrichioides

<400> 2

```
Met Ala Ala Thr Ser Ser Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asp Ile Glu Leu
 1               5                  10                  15

Asp Ile Ile Gly Gln Gln Pro Pro Leu Leu Ser Ile Tyr Thr Gln Ile
            20                  25                  30

Ser Leu Val Tyr Pro Val Ser Asp Pro Ser Gln Tyr Pro Thr Ile Val
        35                  40                  45

Ser Thr Leu Glu Glu Gly Leu Lys Arg Leu Ser Gln Thr Phe Pro Trp
    50                  55                  60

Val Ala Gly Gln Val Lys Thr Glu Gly Ile Ser Glu Gly Asn Thr Gly
65                  70                  75                  80

Thr Ser Lys Ile Ile Pro Tyr Glu Glu Thr Pro Arg Leu Val Val Lys
                85                  90                  95

Asp Leu Arg Asp Asp Ser Ser Ala Pro Thr Ile Glu Gly Leu Arg Lys
            100                 105                 110

Ala Gly Phe Pro Leu Glu Met Phe Asp Glu Asn Val Val Ala Pro Arg
        115                 120                 125

Lys Thr Leu Ala Ile Gly Pro Gly Asn Gly Pro Asn Asp Pro Lys Pro
    130                 135                 140

Val Leu Leu Leu Gln Leu Asn Phe Ile Lys Gly Gly Leu Ile Leu Thr
145                 150                 155                 160

Val Asn Gly Gln His Gly Ala Met Asp Met Thr Gly Gln Asp Ala Ile
                165                 170                 175

Ile Arg Leu Leu Ser Lys Ala Cys Arg Asn Glu Ser Phe Thr Glu Glu
            180                 185                 190

Glu Ile Ser Ala Met Asn Leu Asp Arg Lys Thr Val Val Pro Leu Leu
        195                 200                 205

Glu Asn Tyr Lys Val Gly Pro Glu Leu Asp His Gln Ile Ala Lys Pro
    210                 215                 220

Ala Pro Ala Gly Asp Ala Pro Pro Ala Pro Ala Lys Ala Ser Trp Ala
225                 230                 235                 240

Phe Phe Ser Phe Thr Pro Lys Ala Leu Ser Glu Leu Lys Asp Ala Ala
                245                 250                 255

Thr Lys Thr Leu Asp Ala Ser Ser Lys Phe Val Ser Thr Asp Asp Ala
            260                 265                 270
```

Leu Ser Ala Phe Ile Trp Gln Ser Thr Ser Arg Val Arg Leu Ala Arg
275 280 285

Leu Asp Ala Ser Thr Pro Thr Glu Phe Cys Arg Ala Val Asp Met Arg
290 295 300

Gly Pro Met Gly Val Ser Ser Thr Tyr Pro Gly Leu Leu Gln Asn Met
305 310 315 320

Thr Tyr His Asp Ser Thr Val Ala Glu Ile Ala Asn Glu Pro Leu Gly
325 330 335

Ala Thr Ala Ser Arg Leu Arg Ser Glu Leu Asn Ser Asp Arg Leu Arg
340 345 350

Arg Arg Thr Gln Ala Leu Ala Thr Tyr Met His Gly Leu Pro Asp Lys
355 360 365

Ser Ser Val Ser Leu Thr Ala Asp Ala Asn Pro Ser Ser Ser Ile Met
370 375 380

Leu Ser Ser Trp Ala Lys Val Gly Cys Trp Glu Tyr Asp Phe Gly Phe
385 390 395 400

Gly Leu Gly Lys Pro Glu Ser Val Arg Arg Pro Arg Phe Glu Pro Phe
405 410 415

Glu Ser Leu Met Tyr Phe Met Pro Lys Lys Pro Asp Gly Glu Phe Thr
420 425 430

Ala Ser Ile Ser Leu Arg Asp Glu Asp Met Glu Arg Leu Lys Ala Asp
435 440 445

Glu Glu Trp Thr Lys Tyr Ala Lys Tyr Ile Gly
450 455

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer
<400> 3
acgaatcatt caccgaggag 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA-Primer

<400> 4
ctcacactct caggcttacc 20

<210> 5
<211> 1356
<212> DNA
<213> Fusarium graminearum

<400> 5

atggctttca agatacagct cgacaccctc ggccagctac caggcctcct ttcgatctac 60
acccaaatca gtctcctcta ccccgtctct gattcctctc aatatcccac tattgtcagc 120
accttcgagc aaggtcttaa gcgcttctcc gaagccgtcc catgggtcgc aggccaggtc 180
aaagccgagg gcattagcga gggaaacaca ggaacttcct ttatcgtccc ttttgaggac 240
gttcctcgtg ttgtagtgaa agacctccgc gatgatcctt cagcgcccac gatcgagggt 300
atgagaaagg cgggataccc tatggcgatg tttgacgaga acatcatcgc gccaaggaag 360
acgttaccta ttggacctgg tactggtccc gacgacccaa agcctgtaat tctattgcag 420
ctcaacttca tcaagggcgg actcatcctc actgtcaacg gacagcacgg tgctatggat 480
atggtaggcc aagatgcggt gatccgtcta ctctccaagg cgtgccgtaa cgacccattc 540
accgaagagg aaatgacggc catgaacctc gatcgcaaga cgatagttcc ttaccttgaa 600
aactatacga ttggccccga ggtagatcat cagattgtca aagctgatgt agctggtggt 660
gacgctgttc tcacgccggt cagtgcaagc tgggcgttct tcacattcag ccccaaggcc 720
atgtcagagc tcaaggatgc tgctaccaag actcttgacg catcaacaaa gttcgtgtcg 780
actgacgatg ctctttcggc gttcatctgg aaatcggcct ctcgcgtgcg tctcgaaaga 840
atcgatggct ctgcacctac cgagttctgc cgtgctgttg atgctcgacc ggcaatgggt 900
gtctcgaaca actacccagg ccttcttcaa aacatgacct accacaactc gaccatcggc 960
gaaatcgcca acgagtcact cggcgcaaca gcatcacgcc ttcgttcaga actcgacccc 1020
gcgagcatgc gccagcgaac aagaggtctc gcgacgtacc tgcacaacaa ccccgacaag 1080
tccaacgtat ccctgacggc tgatgcggac ccatctacca gcgtcatgct gagttcttgg 1140
gccaaggtgg gactctggga ttacgacttt gggctcggac tgggtaagcc cgagactgtg 1200
agacggccaa tctttgagcc tgttgagagc ttgatgtact ttatgcccaa gaagcctgat 1260
ggcgagttct gtgcggcgct ttctctgagg gatgaggata tggaccgatt gaaggcggat 1320
aaggagtgga ccaagtatgc gcagtacgtt ggttag 1356

<210> 6
<211> 451
<212> PRT
<213> Fusarium graminearum

<400> 6

Met Ala Phe Lys Ile Gln Leu Asp Thr Leu Gly Gln Leu Pro Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ile Tyr Thr Gln Ile Ser Leu Leu Tyr Pro Val Ser Asp Ser
20 25 30

Ser Gln Tyr Pro Thr Ile Val Ser Thr Phe Glu Gln Gly Leu Lys Arg
35 40 45

Phe Ser Glu Ala Val Pro Trp Val Ala Gly Gln Val Lys Ala Glu Gly
50 55 60

Ile Ser Glu Gly Asn Thr Gly Thr Ser Phe Ile Val Pro Phe Glu Asp
65 70 75 80

Val Pro Arg Val Val Val Lys Asp Leu Arg Asp Asp Pro Ser Ala Pro
85 90 95

```
Thr Ile Glu Gly Met Arg Lys Ala Gly Tyr Pro Met Ala Met Phe Asp
            100                 105                 110

Glu Asn Ile Ile Ala Pro Arg Lys Thr Leu Pro Ile Gly Pro Gly Thr
        115                 120                 125

Gly Pro Asp Asp Pro Lys Pro Val Ile Leu Leu Gln Leu Asn Phe Ile
    130                 135                 140

Lys Gly Gly Leu Ile Leu Thr Val Asn Gly Gln His Gly Ala Met Asp
145                 150                 155                 160

Met Val Gly Gln Asp Ala Val Ile Arg Leu Leu Ser Lys Ala Cys Arg
                165                 170                 175

Asn Asp Pro Phe Thr Glu Glu Glu Met Thr Ala Met Asn Leu Asp Arg
            180                 185                 190

Lys Thr Ile Val Pro Tyr Leu Glu Asn Tyr Thr Ile Gly Pro Glu Val
        195                 200                 205

Asp His Gln Ile Val Lys Ala Asp Val Ala Gly Gly Asp Ala Val Leu

    210                 215                 220

Thr Pro Val Ser Ala Ser Trp Ala Phe Phe Thr Phe Ser Pro Lys Ala
225                 230                 235                 240

Met Ser Glu Leu Lys Asp Ala Ala Thr Lys Thr Leu Asp Ala Ser Thr
                245                 250                 255

Lys Phe Val Ser Thr Asp Asp Ala Leu Ser Ala Phe Ile Trp Lys Ser
            260                 265                 270

Ala Ser Arg Val Arg Leu Glu Arg Ile Asp Gly Ser Ala Pro Thr Glu
        275                 280                 285

Phe Cys Arg Ala Val Asp Ala Arg Pro Ala Met Gly Val Ser Asn Asn
    290                 295                 300

Tyr Pro Gly Leu Leu Gln Asn Met Thr Tyr His Asn Ser Thr Ile Gly
305                 310                 315                 320

Glu Ile Ala Asn Glu Ser Leu Gly Ala Thr Ala Ser Arg Leu Arg Ser
                325                 330                 335

Glu Leu Asp Pro Ala Ser Met Arg Gln Arg Thr Arg Gly Leu Ala Thr
            340                 345                 350

Tyr Leu His Asn Asn Pro Asp Lys Ser Asn Val Ser Leu Thr Ala Asp
        355                 360                 365

Ala Asp Pro Ser Thr Ser Val Met Leu Ser Ser Trp Ala Lys Val Gly
    370                 375                 380

Leu Trp Asp Tyr Asp Phe Gly Leu Gly Leu Gly Lys Pro Glu Thr Val
385                 390                 395                 400

Arg Arg Pro Ile Phe Glu Pro Val Glu Ser Leu Met Tyr Phe Met Pro
                405                 410                 415

Lys Lys Pro Asp Gly Glu Phe Cys Ala Ala Leu Ser Leu Arg Asp Glu
            420                 425                 430

Asp Met Asp Arg Leu Lys Ala Asp Lys Glu Trp Thr Lys Tyr Ala Gln
        435                 440                 445

Tyr Val Gly
    450
```

<210> 7
<211> 1425
<212> DNA
<213> Saccharomyces cerevisiae
<400> 7

atgtttagag tcaagatcat ctctcagaaa cgtacaaaaa gtgtacagat gctagaaaac 60
gatcaacttg atattttggg acaacaacct tcgctataca aactatacac tcaaatatgc 120
tctatctacc gtgtaccaga tccttctgct catgaccata tcgtaaatac cttaacaaga 180
ggacttgaaa cattggctaa aaatttccag tggctagcag gaaatgtcgt aaatgaaggt 240
gctgacgaag gtaacactgg tacctacaga attgtcccgt cagacaaaat tccacttatc 300
gtccaagatc ttcgagaaga tctgtctgcc ccaacaatgg attcgcttga aaaagctgac 360
tttcctatct acatgttaga cgaaaagact tttgcgcctt gcatgactat caatccacct 420

ggaaacacta taggtatggc cgccaagagt gggcctgtat ttgcagttca agcaaacttt 480
atctccggcg gcctcgtctt aactattgtc gggcagcaca atattatgga tataacagga 540
caggaaagta tcatcaactt gctcaataaa tcttgccacc aaaaaccttt ctctgatgaa 600
gaactgctca ttggaaatat agataaaagc aaatctattc ctttgtttga tgaaacttgg 660
gaacccgaca ccacgctagt tcatgaaata gtggaaacct ctagaaatac aagtggagag 720
gaaaaggaac agtcttgttc ttcgaactct acttgggctt atgttgaatt ttctgctatc 780
tcattgcaga atctgaggat tttggcaatg cagacatgta cttctggcac aaaatttgtc 840
tccactgatg atatcgtcac tgctttcatc tggaaatcag tttctcgagc ccgtttatct 900
cgacttaaac cagaaacgaa atcaaattta gggcgtgctg tggatgttag aaaacggcta 960
ggactccccg aaacgtatcc agggttatta gtcaacatga cctttaatac aggttccctg 1020
aaaagcttgg atcataaaag tttgggcgtt cttgcatcac agattcgcag gaagctagac 1080
cctaaagtct tcgatttggc ctataataca tgcgcacttg ctacgctcct tagccgatgc 1140
ccggacaaga ctaaggtttc tatacctcaa ccaattgata ctttatctgg aattatggtc 1200
agttcgtggg caaaagtcag cctgtatgac gttgatttca atctagggct tgggaagccc 1260
aagagtgtac gacggccgcg cttcatttcc cttgagagcc taatatattt tatgcctaga 1320
tcctccagag gtgaaatggt ggttgctctt tgccttagag ataaagattg ggagtgcctg 1380
aatgcggata aagaatggac aaattatgct acacatatag gatga 1425

<210> 8
<211> 474
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 8

Met Phe Arg Val Lys Ile Ile Ser Gln Lys Arg Thr Lys Ser Val Gln
1 5 10 15

Met Leu Glu Asn Asp Gln Leu Asp Ile Leu Gly Gln Gln Pro Ser Leu
20 25 30

Tyr Lys Leu Tyr Thr Gln Ile Cys Ser Ile Tyr Arg Val Pro Asp Pro
35 40 45

Ser Ala His Asp His Ile Val Asn Thr Leu Thr Arg Gly Leu Glu Thr
50 55 60

Leu Ala Lys Asn Phe Gln Trp Leu Ala Gly Asn Val Val Asn Glu Gly
65 70 75 80

Ala Asp Glu Gly Asn Thr Gly Thr Tyr Arg Ile Val Pro Ser Asp Lys
85 90 95

Ile Pro Leu Ile Val Gln Asp Leu Arg Glu Asp Leu Ser Ala Pro Thr
100 105 110

Met Asp Ser Leu Glu Lys Ala Asp Phe Pro Ile Tyr Met Leu Asp Glu
115 120 125

```
Lys Thr Phe Ala Pro Cys Met Thr Ile Asn Pro Pro Gly Asn Thr Ile
    130                 135                 140

Gly Met Ala Ala Lys Ser Gly Pro Val Phe Ala Val Gln Ala Asn Phe
145                 150                 155                 160

Ile Ser Gly Gly Leu Val Leu Thr Ile Val Gly Gln His Asn Ile Met
                165                 170                 175

Asp Ile Thr Gly Gln Glu Ser Ile Ile Asn Leu Leu Asn Lys Ser Cys
            180                 185                 190

His Gln Lys Pro Phe Ser Asp Glu Glu Leu Leu Ile Gly Asn Ile Asp
        195                 200                 205

Lys Ser Lys Ser Ile Pro Leu Phe Asp Glu Thr Trp Glu Pro Asp Thr
    210                 215                 220

Thr Leu Val His Glu Ile Val Glu Thr Ser Arg Asn Thr Ser Gly Glu
225                 230                 235                 240

Glu Lys Glu Gln Ser Cys Ser Ser Asn Ser Thr Trp Ala Tyr Val Glu
                245                 250                 255

Phe Ser Ala Ile Ser Leu Gln Asn Leu Arg Ile Leu Ala Met Gln Thr
            260                 265                 270

Cys Thr Ser Gly Thr Lys Phe Val Ser Thr Asp Asp Ile Val Thr Ala
        275                 280                 285

Phe Ile Trp Lys Ser Val Ser Arg Ala Arg Leu Ser Arg Leu Lys Pro
    290                 295                 300

Glu Thr Lys Ser Asn Leu Gly Arg Ala Val Asp Val Arg Lys Arg Leu
305                 310                 315                 320

Gly Leu Pro Glu Thr Tyr Pro Gly Leu Leu Val Asn Met Thr Phe Asn
                325                 330                 335

Thr Gly Ser Leu Lys Ser Leu Asp His Lys Ser Leu Gly Val Leu Ala
            340                 345                 350

Ser Gln Ile Arg Arg Lys Leu Asp Pro Lys Val Phe Asp Leu Ala Tyr
        355                 360                 365

Asn Thr Cys Ala Leu Ala Thr Leu Leu Ser Arg Cys Pro Asp Lys Thr
    370                 375                 380

Lys Val Ser Ile Pro Gln Pro Ile Asp Thr Leu Ser Gly Ile Met Val
385                 390                 395                 400

Ser Ser Trp Ala Lys Val Ser Leu Tyr Asp Val Asp Phe Asn Leu Gly
                405                 410                 415

Leu Gly Lys Pro Lys Ser Val Arg Arg Pro Arg Phe Ile Ser Leu Glu
            420                 425                 430

Ser Leu Ile Tyr Phe Met Pro Arg Ser Ser Arg Gly Glu Met Val Val
        435                 440                 445
```

Ala Leu Cys Leu Arg Asp Lys Asp Trp Glu Cys Leu Asn Ala Asp Lys
450 455 460

Glu Trp Thr Asn Tyr Ala Thr His Ile Gly
465 470

<210> 9
<211> 6111
<212> DNA

<400> 9
aagcttgcat gcctgcagtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga gataatgagc 60
attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatttttt ttgtcacact tgtttgaagt 120
gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat ataatctata 180
gtactacaat aatatcagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatggtcta 240
aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatcttttta gtgtgcatgt 300
gttctccttt ttttttgcaa atagcttcac ctatataata cttcatccat tttattagta 360
catccattta gggtttaggg ttaatggttt ttatagacta atttttttag tacatctatt 420
ttattctatt ttagcctcta aattaagaaa actaaaactc tattttagtt tttttattta 480
ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacaa atacccttta 540
agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg ccagcctgtt 600
aaacgccgtc gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc 660
aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagttccg 720
ctccaccgtt ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg agcggcagac 780
gtgagccggc acggcaggcg gcctcctcct cctctcacgg caccggcagc tacgggggat 840
tcctttccca ccgctccttc gctttccctt cctcgcccgc cgtaataaat agacaccccc 900
tccacaccct ctttccccaa cctcgtgttg ttcggagcgc acacacacac aaccagatct 960
cccccaaatc cacccgtcgg cacctccgct tcaaggtacg ccgctcgtcc tcccccccccc 1020
cccctctcta ccttctctag atcggcgttc cggtccatgg ttagggcccg gtagttctac 1080
ttctgttcat gtttgtgtta gatccgtgtt tgtgttagat ccgtgctgct agcgttcgta 1140
cacggatgcg acctgtacgt cagacacgtt ctgattgcta acttgccagt gtttctcttt 1200
ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga tcgatttcat gatttttttt 1260
gtttcgttgc atagggtttg gtttgccctt ttcctttatt tcaatatatg ccgtgcactt 1320
gtttgtcggg tcatcttttc atgcttttt ttgtcttggt tgtgatgatg tggtctggtt 1380
gggcggtcgt tctagatcgg agtagaattc tgtttcaaac tacctggtgg atttattaat 1440
tttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagttac gaattgaaga tgatggatgg 1500
aaatatcgat ctaggatagg tatacatgtt gatgcgggtt ttactgatgc atatacagag 1560
atgcttttg ttcgcttggt tgtgatgatg tggtgtggtt gggcggtcgt tcattcgttc 1620
tagatcggag tagaatactg tttcaaacta cctggtgtat ttattaattt tggaactgta 1680
tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg gatggaaata tcgatctagg 1740
ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcatata catgatggca tatgcagcat 1800
ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgttttataa 1860
ttattttgat cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatttttt 1920
tagccctgcc ttcatacgct atttatttgc ttggtactgt ttcttttgtc gatgctcacc 1980
ctgttgtttg gtgttacttc tgcagggatc cccgatcatg caaaaactca ttaactcagt 2040
gcaaaactat gcctggggca gcaaaacggc gttgactgaa ctttatggta tggaaaatcc 2100
gtccagccag ccgatggccg agctgtggat gggcgcacat ccgaaaagca gttcacgagt 2160
gcagaatgcc gccggagata tcgtttcact gcgtgatgtg attgagagtg ataaatcgac 2220
tctgctcgga gaggccgttg ccaaacgctt tggcgaactg cctttcctgt tcaaagtatt 2280
atgcgcagca cagccactct ccattcaggt tcatccaaac aaacacaatt ctgaaatcgg 2340
ttttgccaaa gaaaatgccg caggtatccc gatggatgcc gccgagcgta actataaaga 2400
tcctaaccac aagccggagc tggtttttgc gctgacgcct ttccttgcga tgaacgcgtt 2460
tcgtgaattt tccgagattg tctccctact ccagccggtc gcaggtgcac atccggcgat 2520
tgctcacttt ttacaacagc ctgatgccga acgtttaagc gaactgttcg ccagcctgtt 2580
gaatatgcag ggtgaagaaa aatcccgcgc gctggcgatt ttaaaatcgg ccctcgatag 2640
ccagcagggt gaaccgtggc aaacgattcg tttaatttct gaattttacc cggaagacag 2700
cggtctgttc tccccgctat tgctgaatgt ggtgaaattg aaccctggcg aagcgatgtt 2760
cctgttcgct gaaacaccgc acgcttacct gcaaggcgtg gcgctggaag tgatggcaaa 2820
ctccgataac gtgctgcgtg cgggtctgac gcctaaatac attgatattc cggaactggt 2880
tgccaatgtg aaattcgaag ccaaaccggc taaccagttg ttgacccagc cggtgaaaca 2940

aggtgcagaa ctggacttcc cgattccagt ggatgatttt gccttctcgc tgcatgacct 3000
tagtgataaa gaaaccacca ttagccagca gagtgccgcc attttgttct gcgtcgaagg 3060
cgatgcaacg ttgtggaaag gttctcagca gttacagctt aaaccgggtg aatcagcgtt 3120
tattgccgcc aacgaatcac cggtgactgt caaaggccac ggccgtttag cgcgtgttta 3180
caacaagctg taagagctta ctgaaaaaat taacatctct tgctaagctg ggagctctag 3240
atctgttctg cacaaagtgg agtagtcagt catcgatcag gaaccagaca ccagactttt 3300
attcatacag tgaagtgaag tgaagtgcag tgcagtgagt tgctggtttt tgtacaactt 3360
agtatgtatt tgtatttgta aaatacttct atcaataaaa tttctaattc ctaaaaccaa 3420
aatccagtgg gtaccgaatt cactggccgt cgttttacaa cgtcgtgact gggaaaaccc 3480
tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatcccccc ttcgccagct ggcgtaatag 3540
cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg 3600
cctgatgcgg tattttctcc ttacgcatct gtgcggtatt tcacaccgca tatggtgcac 3660
tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag ccccgacacc cgccaacacc 3720

cgctgacgcg ccctgacggg cttgtctgct cccggcatcc gcttacagac aagctgtgac 3780
cgtctccggg agctgcatgt gtcagaggtt ttcaccgtca tcaccgaaac gcgcgagacg 3840
aaagggcctc gtgatacgcc tatttttata ggttaatgtc atgataataa tggtttctta 3900
gacgtcaggt ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatttgtt tatttttcta 3960
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaatggcg 4020
cgccgcggcc gcttaagaat attgaaaaag gaagagtatg agtattcaac atttccgtgt 4080
cgcccttatt ccctttttttg cggcattttg ccttcctgtt tttgctcacc cagaaacgct 4140
ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt gggtgcacga gtgggttaca tcgaactgga 4200
tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa gaacgttttc caatgatgag 4260
cacttttaaa gttctgctat gtggcgcggt attatcccgt attgacgccg ggcaagagca 4320
actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga 4380
aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgcca taaccatgag 4440
tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc 4500
ttttttgcac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cgttgggaac cggagctgaa 4560
tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt 4620
gcgcaaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc cggcaacaat taatagactg 4680
gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg gcccttccgg ctggctggtt 4740
tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattg cagcactggg 4800
gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggggagtc aggcaactat 4860
ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact 4920
gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa 4980
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt 5040
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt 5100
ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg 5160
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca 5220
gataccaaat actgtccttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt 5280
agcaccgcct acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga 5340
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc 5400
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact 5460
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga 5520
caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg 5580
aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt 5640
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt 5700
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga 5760
ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac 5820
gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cttaagcggc cgcggcgcgc 5880
cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac 5940
gacaggtttc ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc 6000
actcattagg caccccaggc tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt gtgtggaatt 6060
gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc c 6111

<210> 10
<211> 13737
<212> DNA
<213> Plasmid

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Plasmid

<400> 10

gatccagaat tcgtgatcaa atggccgcaa caagcagcac aagcagccag tcttttgaca 60
tagagctcga catcatcggc cagcaaccgc ctcttctttc aatctacacc cagatcagtc 120
tcgtttaccc cgtctctgat ccctcccagt atcccaccat cgtcagcacc cttgaggaag 180
gcctaaaacg cctctctcaa accttcccat gggtcgcggg ccaggtcaag accgagggca 240
tcagcgaagg aaacacagga acttccaaga tcattccata tgaggagaca ccccgtcttg 300
tggtgaaaga cctccgtgat gattcctcag cgccaacgat cgaggggttg agaaaggcgg 360
gtttcccctt agagatgttt gacgagaacg tcgtcgctcc gaggaagaca ttagctatcg 420
gacctggcaa tggccccaac gacccgaagc ctgtgttgct attgcagctc aacttcatta 480
agggcggact cattctcacc gtcaacggac aacatggtgc tatggacatg acaggacaag 540
atgcaattat tcgtcttctc tccaaggcgt gccgcaacga atcattcacc gaggaggaaa 600
tctcggccat gaacctcgat cgcaagacgg tagtccctct ccttgaaaac tacaaagttg 660
gtcctgagct agaccaccag atcgccaaac ctgcgcctgc tggcgacgct ccacccgcac 720
cggccaaggc aagctgggcg ttcttttcat tcactcccaa ggccctctcg gagctgaaag 780
acgcagccac aaagactctt gacgcgtcgt ccaagtttgt gtcaactgat gatgctcttt 840
cggcgtttat ctggcaatca acctcgcgcg tacgtctcgc aagattggat gcttccacac 900
ctactgaatt ctgccgcgct gtcgacatgc ggggcccaat gggcgtatca agcacatacc 960
caggccttct tcaaaacatg acctaccatg actcgaccgt cgccgaaatc gccaacgaac 1020
cacttggcgc aacagcatca cgcctgcgct cggaactcaa cagtgatcgt ttgcgcagac 1080
gaacacaagc tttggcgacg tacatgcatg gcctgcctga caagtcgagc gtctccctga 1140
ccgccgatgc gaatccgtca agcagcatca tgctgagttc ctgggccaag gtgggatgct 1200
gggagtatga ctttgggttt ggactgggta agcctgagag tgtgagaaga cctcgctttg 1260
aacctttga gagtttgatg tactttatgc ccaagaagcc tgatggggag tttacggcgt 1320
ccatttctct gagggatgag gatatggaga gactaaaggc ggatgaggag tggacaaagt 1380
acgcaaagta tattgggtag atagtttact agactactgc agggatatcg tggatccccc 1440
gaatttcccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc 1500
cggtcttgcg atgattatca tctaatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa 1560
catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata 1620
catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc 1680
ggtgtcatct atgttactag atccgggaat tcggcgcgcc caattgattt aaatggccgc 1740
tgcggccaat tcctgcagcg ttgcggttct gtcagttcca aacgtaaaac ggcttgtccc 1800
gcgtcatcgg cgggggtcat aacgtgactc ccttaattct ccgctcatga tcagattgtc 1860
gtttcccgcc ttcagtttaa actatcagtg tttgacagga tatattggcg ggtaaaccta 1920
agagaaaaga gcgtttatta gaataatcgg atatttaaaa gggcgtgaaa aggtttatcc 1980
gttcgtccat ttgtatgtgc atgccaacca cagggttccc cagatctggc gccggccagc 2040
gagacgagca agattggccg ccgcccgaaa cgatccgaca gcgcgcccag cacaggtgcg 2100
caggcaaatt gcaccaacgc atacagcgcc agcagaatgc catagtgggc ggtgacgtcg 2160
ttcgagtgaa ccagatcgcg caggaggccc ggcagcaccg gcataatcag gccgatgccg 2220
acagcgtcga gcgcgacagt gctcagaatt acgatcaggg gtatgttggg tttcacgtct 2280
ggcctccgga ccagcctccg ctggtccgat tgaacgcgcg gattctttat cactgataag 2340
ttggtggaca tattatgttt atcagtgata aagtgtcaag catgacaaag ttgcagccga 2400
atacagtgat ccgtgccgcc ctggacctgt tgaacgaggt cggcgtagac ggtctgacga 2460
cacgcaaact ggcggaacgg ttgggggttc agcagccggc gctttactgg cacttcagga 2520
acaagcgggc gctgctcgac gcactggccg aagccatgct ggcggagaat catacgcatt 2580
cggtgccgag agccgacgac gactggcgct catttctgat cgggaatgcc cgcagcttca 2640
ggcaggcgct gctcgcctac cgcgatggcg cgcgcatcca tgccggcacg cgaccgggcg 2700
caccgcagat ggaaacggcc gacgcgcagc ttcgcttcct ctgcgaggcg ggtttttcgg 2760
ccggggacgc cgtcaatgcg ctgatgacaa tcagctactt cactgttggg gccgtgcttg 2820
aggagcaggc cggcgacagc gatgccggcg agcgcggcgg caccgttgaa caggctccgc 2880
tctcgccgct gttgcgggcc gcgatagacg ccttcgacga agccggtccg gacgcagcgt 2940
tcgagcaggg actcgcggtg attgtcgatg gattggcgaa aaggaggctc gttgtcagga 3000
acgttgaagg accgagaaag ggtgacgatt gatcaggacc gctgccggag cgcaacccac 3060
tcactacagc agagccatgt agacaacatc ccctcccccc ttccaccgcg tcagacgccc 3120
gtagcagccc gctacgggct ttttcatgcc ctgccctagc gtccaagcct cacggccgcg 3180
ctcggcctct ctggcggcct tctggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg actcgctgcg 3240
ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc 3300
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag 3360
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt tttccatagg ctccgccccc ctgacgagca 3420

tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca 3480
ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg 3540
atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt ttccgctgca taaccctgct 3600
tcggggtcat tatagcgatt ttttcggtat atccatcctt tttcgcacga tatacaggat 3660
tttgccaaag ggttcgtgta gactttcctt ggtgtatcca acggcgtcag ccgggcagga 3720
taggtgaagt aggcccaccc gcgagcgggt gttccttctt cactgtccct tattcgcacc 3780
tggcggtgct caacgggaat cctgctctgc gaggctggcc ggctaccgcc ggcgtaacag 3840
atgagggcaa gcggatggct gatgaaacca agccaaccag gaagggcagc ccacctatca 3900
aggtgtactg ccttccagac gaacgaagag cgattgagga aaaggcggcg gcggccggca 3960
tgagcctgtc ggcctacctg ctggccgtcg gccagggcta caaaatcacg ggcgtcgtgg 4020
actatgagca cgtccgcgag ctggcccgca tcaatggcga cctgggccgc ctgggcggcc 4080
tgctgaaact ctggctcacc gacgacccgc gcacggcgcg gttcggtgat gccacgatcc 4140
tcgccctgct ggcgaagatc gaagagaagc aggacgagct tggcaaggtc atgatgggcg 4200
tggtccgccc gagggcagag ccatgacttt tttagccgct aaaacggccg gggggtgcgc 4260
gtgattgcca agcacgtccc catgcgctcc atcaagaaga gcgacttcgc ggagctggtg 4320
aagtacatca ccgacgagca aggcaagacc gagcgccttt gcgacgctca ccgggctggt 4380
tgccctcgcc gctgggctgg cggccgtcta tggccctgca aacgcgccag aaacgccgtc 4440
gaagccgtgt gcgagacacc gcggccggcc gccggcgttg tggatacctc gcggaaaact 4500
tggccctcac tgacagatga ggggcggacg ttgacacttg aggggccgac tcacccggcg 4560
cggcgttgac agatgagggg caggctcgat ttcggccggc gacgtggagc tggccagcct 4620
cgcaaatcgg cgaaaacgcc tgattttacg cgagtttccc acagatgatg tggacaagcc 4680
tggggataag tgccctgcgg tattgacact tgaggggcgc gactactgac agatgagggg 4740
cgcgatcctt gacacttgag gggcagagtg ctgacagatg aggggcgcac ctattgacat 4800
ttgaggggct gtccacaggc agaaaatcca gcatttgcaa gggtttccgc ccgtttttcg 4860
gccaccgcta acctgtcttt taacctgctt ttaaaccaat atttataaac cttgttttta 4920
accagggctg cgccctgtgc gcgtgaccgc gcacgccgaa ggggggtgcc ccccttctc 4980
gaaccctccc ggcccgctaa cgcgggcctc ccatcccccc aggggctgcg cccctcggcc 5040
gcgaacggcc tcaccccaaa aatggcagcg ctggcagtcc ttgccattgc cgggatcggg 5100
gcagtaacgg gatgggcgat cagcccgagc gcgacgcccg gaagcattga cgtgccgcag 5160
gtgctggcat cgacattcag cgaccaggtg ccgggcagtg agggcggcgg cctgggtggc 5220
ggcctgccct tcacttcggc cgtcggggca ttcacggact tcatggcggg gccggcaatt 5280
tttaccttgg gcattcttgg catagtggtc gcgggtgccg tgctcgtgtt cgggggtgcg 5340
ataaacccag cgaaccattt gaggtgatag gtaagattat accgaggtat gaaaacgaga 5400
attggacctt tacagaatta ctctatgaag cgccatattt aaaaagctac caagacgaag 5460
aggatgaaga ggatgaggag gcagattgcc ttgaatatat tgacaatact gataagataa 5520
tatatctttt atatagaaga tatcgccgta tgtaaggatt tcaggggca aggcataggc 5580
agcgcgctta tcaatatatc tatagaatgg gcaaagcata aaaacttgca tggactaatg 5640
cttgaaaccc aggacaataa ccttatagct tgtaaattct atcataattg ggtaatgact 5700
ccaacttatt gatagtgttt tatgttcaga taatgcccga tgactttgtc atgcagctcc 5760
accgattttg agaacgacag cgacttccgt cccagccgtg ccaggtgctg cctcagattc 5820
aggttatgcc gctcaattcg ctgcgtatat cgcttgctga ttacgtgcag ctttcccttc 5880
aggcgggatt catacagcgg ccagccatcc gtcatccata tcaccacgtc aaagggtgac 5940
agcaggctca taagacgccc cagcgtcgcc atagtgcgtt caccgaatac gtgcgcaaca 6000
accgtcttcc ggagactgtc atacgcgtaa aacagccagc gctggcgcga tttagccccg 6060
acatagcccc actgttcgtc catttccgcg cagacgatga cgtcactgcc cggctgtatg 6120
cgcgaggtta ccgactgcgg cctgagtttt ttaagtgacg taaaatcgtg ttgaggccaa 6180
cgcccataat gcgggctgtt gcccggcatc caacgccatt catggccata tcaatgattt 6240
tctggtgcgt accgggttga gaagcggtgt aagtgaactg cagttgccat gttttacggc 6300
agtgagagca gagatagcgc tgatgtccgg cggtgctttt gccgttacgc accaccccgt 6360
cagtagctga acaggaggga cagctgatag acacagaagc cactggagca cctcaaaaac 6420
accatcatac actaaatcag taagttggca gcatcaccca taattgtggt ttcaaaatcg 6480
gctatggctg gaaggaaagc tgcctgttcc aaaggtcctg cactttgaac ggcatgatgg 6900
ctggagcaat ctgctcatga gtgaggccga tggcgtcctt tgctcggaag agtatgaaga 6960
tgaacaaagc cctgaaaaga ttatcgagct gtatgcggag tgcatcaggc tctttcactc 7020
catcgacata tcggattgtc cctatacgaa tagcttagac agccgcttag ccgaattgga 7080
ttacttactg aataacgatc tggccgatgt ggattgcgaa aactgggaag aagacactcc 7140
atttaaagat ccgcgcgagc tgtatgattt tttaaagacg gaaaagcccg aagaggaact 7200
tgtcttttcc cacggcgacc tgggagacag caacatcttt gtgaaagatg gcaaagtaag 7260
tggctttatt gatcttggga gaagcggcag ggcggacaag tggtatgaca ttgccttctg 7320
cgtccggtcg atcagggagg atatcgggga agaacagtat gtcgagctat tttttgactt 7380

actggggatc aagcctgatt gggagaaaat aaaatattat attttactgg atgaattgtt 7440
ttagtaccta gatgtggcgc aacgatgccg gcgacaagca ggagcgcacc gacttcttcc 7500
gcatcaagtg ttttggctct caggccgagg cccacggcaa gtatttgggc aaggggtcgc 7560
tggtattcgt gcagggcaag attcggaata ccaagtacga gaaggacggc cagacggtct 7620
acgggaccga cttcattgcc gataaggtgg attatctgga caccaaggca ccaggcgggt 7680
caaatcagga ataagggcac attgccccgg cgtgagtcgg ggcaatcccg caaggagggt 7740
gaatgaatcg gacgtttgac cggaaggcat acaggcaaga actgatcgac gcggggtttt 7800
ccgccgagga tgccgaaacc atcgcaagcc gcaccgtcat gcgtgcgccc cgcgaaacct 7860
tccagtccgt cggctcgatg gtccagcaag ctacggccaa gatcgagcgc gacagcgtgc 7920
aactggctcc ccctgccctg cccgcgccat cggccgccgt ggagcgttcg cgtcgtctcg 7980
aacaggaggc ggcaggtttg gcgaagtcga tgaccatcga cacgcgagga actatgacga 8040
ccaagaagcg aaaaaccgcc ggcgaggacc tggcaaaaca ggtcagcgag gccaagcagg 8100
ccgcgttgct gaaacacacg aagcagcaga tcaaggaaat gcagctttcc ttgttcgata 8160
ttgcgccgtg gccggacacg atgcgagcga tgccaaacga cacggcccgc tctgccctgt 8220
tcaccacgcg caacaagaaa atcccgcgcg aggcgctgca aaacaaggtc attttccacg 8280
tcaacaagga cgtgaagatc acctacaccg gcgtcgagct gcgggccgac gatgacgaac 8340
tggtgtggca gcaggtgttg gagtacgcga agcgcacccc tatcggcgag ccgatcacct 8400
tcacgttcta cgagctttgc caggacctgg gctggtcgat caatggccgg tattacacga 8460
aggccgagga atgcctgtcg cgcctacagg cgacggcgat gggcttcacg tccgaccgcg 8520
ttgggcacct ggaatcggtg tcgctgctgc accgcttccg cgtcctggac cgtggcaaga 8580
aaacgtcccg ttgccaggtc ctgatcgacg aggaaatcgt cgtgctgttt gctggcgacc 8640
actacacgaa attcatatgg gagaagtacc gcaagctgtc gccgacggcc cgacggatgt 8700
tcgactattt cagctcgcac cgggagccgt acccgctcaa gctggaaacc ttccgcctca 8760
tgtgcggatc ggattccacc cgcgtgaaga agtggcgcga gcaggtcggc gaagcctgcg 8820
aagagttgcg aggcagcggc ctggtggaac acgcctgggt caatgatgac ctggtgcatt 8880
gcaaacgcta gggccttgtg gggtcagttc cggctggggg ttcagcagcc agcgctttac 8940
tggcatttca ggaacaagcg ggcactgctc gacgcacttg cttcgctcag tatcgctcgg 9000
gacgcacggc gcgctctacg aactgccgat aaacagagga ttaaaattga caattgtgat 9060
taaggctcag attcgacggc ttggagcggc cgacgtgcag gatttccgcg agatccgatt 9120
gtcggccctg aagaaagctc cagagatgtt cgggtccgtt tacgagcacg aggagaaaaa 9180
gcccatggag gcgttcgctg aacggttgcg agatgccgtg gcattcggcg cctacatcga 9240
cggcgagatc attgggctgt cggtcttcaa acaggaggac ggccccaagg acgctcacaa 9300
ggcgcatctg tccggcgttt tcgtggagcc cgaacagcga ggccgagggg tcgccggtat 9360
gctgctgcgg gcgttgccgg cgggtttatt gctcgtgatg atcgtccgac agattccaac 9420
gggaatctgg tggatgcgca tcttcatcct cggcgcactt aatatttcgc tattctggag 9480
cttgttgttt atttcggtct accgcctgcc gggcggggtc gcggcgacgg taggcgctgt 9540
gcagccgctg atggtcgtgt tcatctctgc cgctctgcta ggtagcccga tacgattgat 9600
ggcggtcctg ggggctattt gcggaactgc gggcgtggcg ctgttggtgt tgacaccaaa 9660
cgcagcgcta gatcctgtcg gcgtcgcagc gggcctggcg ggggcggttt ccatggcgtt 9720
cggaaccgtg ctgacccgca agtggcaacc tcccgtgcct ctgctcacct ttaccgcctg 9780
gcaactggcg gccggaggac ttctgctcgt tccagtagct ttagtgtttg atccgccaat 9840
cccgatgcct acaggaacca atgttctcgg cctggcgtgg ctcggcctga tcggagcggg 9900
tttaacctac ttcctttggt tccgggggat ctcgcgactc gaacctacag ttgtttcctt 9960
actgggcttt ctcagcccca gatctggggt cgatcagccg gggatgcatc aggccgacag 10020
tcggaacttc gggtccccga cctgtaccat tcggtgagca atggataggg gagttgatat 10080
cgtcaacgtt cacttctaaa gaaatagcgc cactcagctt cctcagcggc tttatccagc 10140
gatttcctat tatgtcggca tagttctcaa gatcgacagc ctgtcacggt taagcgagaa 10200
atgaataaga aggctgataa ttcggatctc tgcgagggag atgatatttg atcacaggca 10260
gcaacgctct gtcatcgtta caatcaacat gctaccctcc gcgagatcat ccgtgtttca 10320
aacccggcag cttagttgcc gttcttccga atagcatcgg taacatgagc aaagtctgcc 10380
gccttacaac ggctctcccg ctgacgccgt cccggactga tgggctgcct gtatcgagtg 10440
gtgattttgt gccgagctgc cggtcgggga gctgttggct ggctggtggc aggatatatt 10500
gtggtgtaaa caaattgacg cttagacaac ttaataacac attgcggacg tttttaatgt 10560
actgcggtac ggccatgctg gccgcccggg caccggtaaa tttcctgcag ggctagcgaa 10620
ttcgagctcg gtacccctgg attttggttt taggaattag attattgata gaagtatttt 10680
acaaatacaa atacatacta agggtttctt atatgctcaa cacatgagcg aaaccctata 10740
agaaccctaa ttcccttatc tgggaactac tcacacatta ttatagagag agatagattt 10800
gtagagagag actggtgatt tcagcgggca tgcctgcagg tcgactcaga tctgggtaac 10860
tggcctaact ggccttggag gagctggcaa ctcaaaatcc ctttgccaaa aaccaacatc 10920
atgccatcca ccatgcttgt atccagctgc gcgcaatgta ccccgggctg tgtatcccaa 10980

```
agcctcatgc aacctaacag atggatcgtt tggaaggcct ataacagcaa ccacagactt 11040
aaaaccttgc gcctccatag acttaagcaa atgtgtgtac aatgtggatc ctaggcccaa 11100
cctttgatgc ctatgtgaca cgtaaacagt actctcaact gtccaatcgt aagcgttcct 11160
agccttccag ggcccagcgt aagcaatacc agccacaaca ccctcaacct cagcaaccaa 11220
ccaagggtat ctatcttgca acctctctag atcatcaatc cactcttgtg gtgtttgtgg 11280
ctctgtccta aagttcactg tagacgtctc aatgtaatgg ttaacgatat cacaaaccgc 11340
ggccatatca gctgctgtag ctggcctaat ctcaactggt ctcctctccg gagacatgtc 11400
gactctagag gatccccggg taccctgtcc tctccaaatg aaatgaactt ccttatatag 11460
aggaagggtc ttgcgaagga tagtgggatt gtgcgtcatc ccttacgtca gtggagatat 11520
cacatcaatc cacttgcttt gaagacgtgg ttggaacgtc ttctttttcc acgatgctcc 11580
tcgtgggtgg gggtccatct ttgggaccac tgtcggcaga ggcatcttca acgatggcct 11640

ttcctttatc gcaatgatgg catttgtagg agccaccttc cttttccact atcttcacaa 11700
taaagtgaca gatagctggg caatggaatc cgaggaggtt tccggatatt acccttttgtt 11760
gaaaagtctc aattgccctt tggtcttctg agactgtatc tttgatattt ttggagtaga 11820
caagcgtgtc gtgctccacc atgttgacga agatattctt cttgtcattg agtcgtaaga 11880
gactctgtat gaactgttcg ccagtcttta cggcgagttc tgttggtcct ctatttgaat 11940
ctttgactcc atgggaattg agatctctcg aggtttaaac gggccacgcc tgcggccgcc 12000
tcgaggtacc ggatttggag ccaagtctca taaacgccat tgtggaagaa agtcttgagt 12060
tggtggtaat gtaacagagt agtaagaaca gagaagagag agagtgtgag atacatgaat 12120
tgtcgggcaa caaaaatcct gaacatctta ttttagcaaa gagaaagagt tccgagtctg 12180
tagcagaaga gtgaggagaa atttaagctc ttggacttgt gaattgttcc gcctcttgaa 12240
tacttcttca atcctcatat attcttcttc tatgttacct gaaaaccggc atttaatctc 12300
gcgggtttat tccggttcaa catttttttt gttttgagtt attatctggg cttaataacg 12360
caggcctgaa ataaattcaa ggcccaactg ttttttttt taagaagttg ctgttaaaaa 12420
aaaaaaaagg gaattaacaa caacaacaaa aaaagataaa gaaaataata acaattactt 12480
taattgtaga ctaaaaaaac atagatttta tcatgaaaaa aagagaaaag aaataaaaac 12540
ttggatcaaa aaaaaaaaca tacagatctt ctaattatta acttttctta aaaattaggt 12600
ccttttccc aacaattagg tttagagttt tggaattaaa ccaaaaagat tgttctaaaa 12660
aatactcaaa tttggtagat aagtttcctt attttaatta gtcaatggta gatacttttt 12720
tttcttttct ttattagagt agattagaat cttttatgcc aagttttgat aaattaaatc 12780
aagaagataa actatcataa tcaacatgaa attaaaagaa aaatctcata tatagtatta 12840
gtattctcta tatatattat gattgcttat tcttaatggg ttgggttaac caagacatag 12900
tcttaatgga aagaatcttt tttgaacttt ttccttattg attaaattct tctatagaaa 12960
agaaagaaat tatttgagga aaagtatata caaaaagaaa aatagaaaaa tgtcagtgaa 13020
gcagatgtaa tggatgacct aatccaacca ccaccatagg atgtttctac ttgagtcggt 13080
cttttaaaaa cgcacggtgg aaaatatgac acgtatcata tgattccttc ctttagtttc 13140
gtgataataa tcctcaactg atatcttcct ttttttgttt tggctaaaga tattttattc 13200
tcattaatag aaaagacggt tttgggcttt tggtttgcga tataaagaag accttcgtgt 13260
ggaagataat aattcatcct ttcgtctttt tctgactctt caatctctcc caaagcctaa 13320
agcgatctct gcaaatctct cgcgactctc tctttcaagg tatattttct gattcttttt 13380
gtttttgatt cgtatctgat ctccaatttt tgttatgtgg attattgaat cttttgtata 13440
aattgctttt gacaatattg ttcgtttcgt caatccagct tctaaatttt gtcctgatta 13500
ctaagatatc gattcgtagt gtttacatct gtgtaatttc ttgcttgatt gtgaaattag 13560
gattttcaag gacgatctat tcaatttttg tgttttcttt gttcgattct ctctgtttta 13620
ggtttcttat gtttagatcc gtttctcttt ggtgttgttt tgatttctct tacggctttt 13680
gatttggtat atgttcgctg attggtttct acttgttcta ttgttttatt tcaggtg    13737
```

<210> 11
<211> 12949
<212> DNA
<213> Plasmid

<400> 11

agcttgcatg cctgcagtgc agcgtgaccc ggtcgtgccc ctctctagag ataatgagca 60
ttgcatgtct aagttataaa aaattaccac atatttttt tgtcacactt gtttgaagtg 120
cagtttatct atctttatac atatatttaa actttactct acgaataata taatctatag 180
tactacaata atatcagtgt tttagagaat catataaatg aacagttaga catggtctaa 240
aggacaattg agtattttga caacaggact ctacagtttt atctttttag tgtgcatgtg 300
ttctcctttt tttttgcaaa tagcttcacc tatataatac ttcatccatt ttattagtac 360
atccatttag ggtttagggt taatggtttt tatagactaa tttttttagt acatctattt 420
tattctattt tagcctctaa attaagaaaa ctaaaactct attttagttt ttttatttaa 480
taatttagat ataaaataga ataaaataaa gtgactaaaa attaaacaaa tacccctttaa 540
gaaattaaaa aaactaagga aacatttttc ttgtttcgag tagataatgc cagcctgtta 600
aacgccgtcg acgagtctaa cggacaccaa ccagcgaacc agcagcgtcg cgtcgggcca 660
agcgaagcag acggcacggc atctctgtcg ctgcctctgg acccctctcg agagttccgc 720
tccaccgttg gacttgctcc gctgtcggca tccagaaatt gcgtggcgga gcggcagacg 780
tgagccggca cggcaggcgg cctcctcctc ctctcacggc accggcagct acgggggatt 840
cctttcccac cgctccttcg ctttcccttc ctcgcccgcc gtaataaata gacacccccct 900
ccacaccctc tttccccaac ctcgtgttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc 960
ccccaaatcc acccgtcggc acctccgctt caaggtacgc cgctcgtcct cccccccccc 1020
ccctctctac cttctctaga tcggcgttcc ggtccatggt tagggcccgg tagttctact 1080
tctgttcatg tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac 1140
acggatgcga cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg 1200
gggaatcctg ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg attttttttg 1260
tttcgttgca tagggtttgg tttgcccttt tcctttattt caatatatgc cgtgcacttg 1320
tttgtcgggt catcttttca tgctttttt tgtcttggtt gtgatgatgt ggtctggttg 1380
ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaattct gtttcaaact acctggtgga tttattaatt 1440
ttggatctgt atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga 1500
aatatcgatc taggataggt atacatgttg atgcgggttt tactgatgca tatacagaga 1560
tgctttttgt tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggttg ggcggtcgtt cattcgttct 1620
agatcggagt agaatactgt ttcaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat 1680
gtgtgtgtca tacatcttca tagttacgag tttaagatgg atggaaatat cgatctagga 1740
taggtataca tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc 1800
tattcatatg ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat 1860
tattttgatc ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggatttttt 1920
agccctgcct tcatacgcta tttatttgct tggtactgtt tcttttgtcg atgctcaccc 1980
tgttgtttgg tgttacttct gcagggatcc ccgatcatgc aaaaactcat taactcagtg 2040
caaaactatg cctggggcag caaaacggcg ttgactgaac tttatggtat ggaaaatccg 2100
tccagccagc cgatggccga gctgtggatg ggcgcacatc cgaaaagcag ttcacgagtg 2160
cagaatgccg ccggagatat cgtttcactg cgtgatgtga ttgagagtga taaatcgact 2220
ctgctcggag aggccgttgc caaacgcttt ggcgaactgc ctttcctgtt caaagtatta 2280
tgcgcagcac agccactctc cattcaggtt catccaaaca aacacaattc tgaaatcggt 2340
tttgccaaag aaaatgccgc aggtatcccg atggatgccg ccgagcgtaa ctataaagat 2400
cctaaccaca agccggagct ggtttttgcg ctgacgcctt tccttgcgat gaacgcgttt 2460
cgtgaatttt ccgagattgt ctccctactc cagccggtcg caggtgcaca tccggcgatt 2520
gctcactttt tacaacagcc tgatgccgaa cgtttaagcg aactgttcgc cagcctgttg 2580
aatatgcagg gtgaagaaaa atcccgcgcg ctggcgattt taaaatcggc cctcgatagc 2640
cagcagggtg aaccgtggca aacgattcgt ttaatttctg aattttaccc ggaagacagc 2700
ggtctgttct ccccgctatt gctgaatgtg gtgaaattga accctggcga agcgatgttc 2760
ctgttcgctg aaacaccgca cgcttacctg caaggcgtgg cgctggaagt gatggcaaac 2820
tccgataacg tgctgcgtgc gggtctgacg cctaaataca ttgatattcc ggaactggtt 2880
gccaatgtga aattcgaagc caaaccggct aaccagttgt tgacccagcc ggtgaaacaa 2940
ggtgcagaac tggacttccc gattccagtg gatgattttg ccttctcgct gcatgacctt 3000
agtgataaag aaaccaccat tagccagcag agtgccgcca ttttgttctg cgtcgaaggc 3060
gatgcaacgt tgtggaaagg ttctcagcag ttacagctta aaccgggtga atcagcgttt 3120
attgccgcca acgaatcacc ggtgactgtc aaaggccacg gccgtttagc gcgtgtttac 3180
aacaagctgt aagagcttac tgaaaaaatt aacatctctt gctaagctgg gagctcgatc 3240
cgtcgacctg cagatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt gaatcctgtt 3300
gccggtcttg cgatgattat catataattt ctgttgaatt acgttaagca tgtaataatt 3360
aacatgtaat gcatgacgtt atttatgaga tgggttttta tgattagagt cccgcaatta 3420
tacatttaat acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa attatcgcgc 3480
gcggtgtcat ctatgttact agatctgcta gccctgcagg aaatttaccg gtgcccgggc 3540

ggccagcatg gccgtatccg caatgtgtta ttaagttgtc taagcgtcaa tttgtttaca 3600
ccacaatata tcctgccacc agccagccaa cagctccccg accggcagct cggcacaaaa 3660
tcaccactcg atacaggcag cccatcagaa ttaattctca tgtttgacag cttatcatcg 3720
actgcacggt gcaccaatgc ttctggcgtc aggcagccat cggaagctgt ggtatggctg 3780
tgcaggtcgt aaatcactgc ataattcgtg tcgctcaagg cgcactcccg ttctggataa 3840
tgtttttgc gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag ctgttgacaa 3900
ttaatcatcc ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa 3960
acagaccatg agggaagcgt tgatcgccga agtatcgact caactatcag aggtagttgg 4020
cgtcatcgag cgccatctcg aaccgacgtt gctggccgta catttgtacg gctccgcagt 4080
ggatggcggc ctgaagccac acagtgatat tgatttgctg gttacggtga ccgtaaggct 4140
tgatgaaaca acgcggcgag ctttgatcaa cgacctttg gaaacttcgg cttcccctgg 4200
agagagcgag attctccgcg ctgtagaagt caccattgtt gtgcacgacg acatcattcc 4260
gtggcgttat ccagctaagc gcgaactgca atttggagaa tggcagcgca atgacattct 4320
tgcaggtatc ttcgagccag ccacgatcga cattgatctg gctatcttgc tgacaaaagc 4380
aagagaacat agcgttgcct tggtaggtcc agcggcggag gaactctttg atccggttcc 4440
tgaacaggat ctatttgagg cgctaaatga aaccttaacg ctatggaact cgccgcccga 4500
ctgggctggc gatgagcgaa atgtagtgct tacgttgtcc cgcatttggt acagcgcagt 4560
aaccggcaaa atcgcgccga aggatgtcgc tgccgactgg gcaatggagc gcctgccggc 4620
ccagtatcag cccgtcatac ttgaagctag gcaggcttat cttggacaag aagatcgctt 4680
ggcctcgcgc gcagatcagt tggaagaatt tgttcactac gtgaaaggcg agatcaccaa 4740
agtagtcggc aaataaagct ctagtggatc tccgtacccc cgggggatct ggctcgcggc 4800

ggacgcacga cgccggggcg agaccatagg cgatctccta aatcaatagt agctgtaacc 4860
tcgaagcgtt tcacttgtaa caacgattga gaatttttgt cataaaattg aaatacttgg 4920
ttcgcatttt tgtcatccgc ggtcagccgc aattctgacg aactgcccat ttagctggag 4980
atgattgtac atccttcacg tgaaaatttc tcaagcgctg tgaacaaggg ttcagatttt 5040
agattgaaag gtgagccgtt gaaacacgtt cttcttgtcg atgacgacgt cgctatgcgg 5100
catcttatta ttgaatacct tacgatccac gccttcaaag tgaccgcggt agccgacagc 5160
acccagttca caagagtact ctcttccgcg acggtcgatg tcgtggttgt tgatctaaat 5220
ttaggtcgtg aagatgggct cgagatcgtt cgtaatctgg cggcaaagtc tgatattcca 5280
atcataatta tcagtggcga ccgccttgag gagacggata aagttgttgc actcgagcta 5340
ggagcaagtg attttatcgc taagccgttc agtatcagag agtttctagc acgcattcgg 5400
gttgccttgc gcgtgcgccc caacgttgtc cgctccaaag accgacggtc tttttgtttt 5460
actgactgga cacttaatct caggcaacgt cgcttgatgt ccgaagctgg cggtgaggtg 5520
aaacttacgg caggtgagtt caatcttctc ctcgcgtttt tagagaaacc ccgcgacgtt 5580
ctatcgcgcg agcaacttct cattgccagt cgagtacgcg acgaggaggt ttatgacagg 5640
agtatagatg ttctcatttt gaggctgcgc cgcaaacttg aggcagatcc gtcaagccct 5700
caactgataa aaacagcaag aggtgccggt tatttctttg acgcggacgt gcaggtttcg 5760
cacgggggga cgatggcagc ctgagccaat tcccagatcc ccgaggaatc ggcgtgagcg 5820
gtcgcaaacc atccggcccg gtacaaatcg gcgcggcgct gggtgatgac ctggtggaga 5880
agttgaaggc cgcgcaggcc gcccagcggc aacgcatcga ggcagaagca cgccccggtg 5940
aatcgtggca agcggccgct gatcgaatcc gcaaagaatc ccggcaaccg ccggcagccg 6000
gtgcgccgtc gattaggaag ccgcccaagg gcgacgagca accagatttt ttcgttccga 6060
tgctctatga cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat ggacgtggcc gttttccgtc 6120
tgtcgaagcg tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta cgagcttcca gacgggcacg 6180
tagaggtttc cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg ggattacgac ctggtactga 6240
tggcggtttc ccatctaacc gaatccatga accgataccg ggaagggaag ggagacaagc 6300
ccggccgcgt gttccgtcca cacgttgcgg acgtactcaa gttctgccgg cgagccgatg 6360
gcggaaagca gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg gttaaacacc acgcacgttg 6420
ccatgcagcg tacgaagaag gccaagaacg gccgcctggt gacggtatcc gagggtgaag 6480
ccttgattag ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg gcggccggag tacatcgaga 6540
tcgagctagc tgattggatg taccgcgaga tcacagaagg caagaacccg gacgtgctga 6600
cggttcaccc cgattacttt ttgatcgatc ccggcatcgg ccgttttctc taccgcctgg 6660
cacgccgcgc cgcaggcaag gcagaagcca gatggttgtt caagacgatc tacgaacgca 6720
gtggcagcgc cggagagttc aagaagttct gtttcaccgt gcgcaagctg atcgggtcaa 6780
atgacctgcc ggagtacgat ttgaaggagg aggcggggca ggctggcccg atcctagtca 6840
tgcgctaccg caacctgatc gagggcgaag catccgccgg ttcctaatgt acggagcaga 6900
tgctagggca aattgcccta gcaggggaaa aaggtcgaaa aggtctcttt cctgtggata 6960
gcacgtacat tgggaaccca aagccgtaca ttgggaaccg gaacccgtac attgggaacc 7020
caaagccgta cattgggaac cggtcacaca tgtaagtgac tgatataaaa gagaaaaaag 7080
gcgatttttc cgcctaaaac tctttaaaac ttattaaaac tcttaaaacc cgcctggcct 7140

gtgcataact gtctggccag cgcacagccg aagagctgca aaaagcgcct acccttcggt 7200
cgctgcgctc cctacgcccc gccgcttcgc gtcggcctat cgcggccgct ggccgctcaa 7260
aaatggctgg cctacggcca ggcaatctac cagggcgcgg acaagccgcg ccgtcgccac 7320
tcgaccgccg gcgctgaggt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgactca taccaggcct 7380
gaatcgcccc atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga gctttgttgt 7440
aggtggacca gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct gcgttgtcgg 7500
gaagatgcgt gatctgatcc ttcaactcag caaaagttcg atttattcaa caaagccgcc 7560
gtcccgtcaa gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca attctgatta 7620
gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc 7680
atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag 7740
gatggcaaga tcctggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat 7800
taatttcccc tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga 7860
atccggtgag aatggcaaaa gctctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 7920
gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc 7980
ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 8040
gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 8100
aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 8160
gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 8220
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg 8280
cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 8340
cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccccgtt cagcccgacc 8400
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 8460
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 8520
agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg 8580
ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa 8640
ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 8700
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact 8760
cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttga 8820
tccggaatta attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt 8880
cacgcccttt taaatatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttacccgc 8940
caatatatcc tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca 9000
tgagcggaga attaagggag tcacgttatg acccccgccg atgacgcggg acaagccgtt 9060
ttacgtttgg aactgacaga accgcaacgc tgcaggaatt ggccgcagcg gccatttaaa 9120
tggtacctta attaacgtac gaagcttgca tgcacgcggt ctagagcggc cgcctcgagg 9180
taccgggccc cccctcgagg tcgacggtat cgataagctt gcatgcctgc agtgcagcgt 9240
gacccggtcg tgcccctctc tagagataat gagcattgca tgtctaagtt ataaaaaatt 9300
accacatatt ttttttgtca cacttgtttg aagtgcagtt tatctatctt tatacatata 9360
tttaaacttt actctacgaa taatataatc tatagtacta caataatatc agtgttttag 9420
agaatcatat aaatgaacag ttagacatgg tctaaaggac aattgagtat tttgacaaca 9480
ggactctaca gttttatctt tttagtgtgc atgtgttctc cttttttttt gcaaatagct 9540
tcacctatat aatacttcat ccattttatt agtacatcca tttagggttt agggttaatg 9600
gtttttatag actaattttt ttagtacatc tattttattc tattttagcc tctaaattaa 9660
gaaaactaaa actctatttt agtttttta tttaataatt tagatataaa atagaataaa 9720
ataaagtgac taaaaattaa acaaataccc tttaagaaat taaaaaaact aaggaaacat 9780
ttttcttgtt tcgagtagat aatgccagcc tgttaaacgc cgtcgacgag tctaacggac 9840
accaaccagc gaaccagcag cgtcgcgtcg ggccaagcga agcagacggc acggcatctc 9900
tgtcgctgcc tctggacccc tctcgagagt tccgctccac cgttggactt gctccgctgt 9960
cggcatccag aaattgcgtg gcggagcggc agacgtgagc cggcacggca ggcggcctcc 10020
tcctcctctc acggcacggc agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc ttcgctttcc 10080
cttcctcgcc cgccgtaata aatagacacc ccctccacac cctctttccc caacctcgtg 10140
ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctcccccaa atccacccgt cggcacctcc 10200
gcttcaaggt acgccgctcg tcctcccccc ccccccctct ctaccttctc tagatcggcg 10260
ttccggtcca tggttagggc ccggtagttc tacttctgtt catgtttgtg ttagatccgt 10320
gtttgtgtta gatccgtgct gctagcgttc gtacacggat gcgacctgta cgtcagacac 10380
gttctgattg ctaacttgcc agtgtttctc tttggggaat cctgggatgg ctctagccgt 10440
tccgcagacg ggatcgattt catgattttt tttgtttcgt tgcatagggt ttggtttgcc 10500
cttttccttt atttcaatat atgccgtgca cttgtttgtc gggtcatctt ttcatgcttt 10560
tttttgtctt ggttgtgatg atgtggtctg gttgggcggt cgttctagat cggagtagaa 10620
ttctgtttca aactacctgg tggatttatt aattttggat ctgtatgtgt gtgccataca 10680
tattcatagt tacgaattga agatgatgga tggaaatatc gatctaggat aggtatacat 10740

```
gttgatgcgg gttttactga tgcatataca gagatgcttt ttgttcgctt ggttgtgatg 10800
atgtggtgtg gttgggcggt cgttcattcg ttctagatcg gagtagaata ctgtttcaaa 10860
ctacctggtg tatttattaa ttttggaact gtatgtgtgt gtcatacatc ttcatagtta 10920
cgagtttaag atggatggaa atatcgatct aggataggta tacatgttga tgtgggtttt 10980
actgatgcat atacatgatg gcatatgcag catctattca tatgctctaa ccttgagtac 11040
ctatctatta taataaacaa gtatgtttta taattatttt gatcttgata tacttggatg 11100
atggcatatg cagcagctat atgtggattt ttttagccct gccttcatac gctatttatt 11160
tgcttggtac tgtttctttt gtcgatgctc accctgttgt ttggtgttac ttctgcaggt 11220
cgactctaga ggatccagaa ttcgtgatca aatggccgca acaagcagca caagcagcca 11280
gtcttttgac atagagctcg acatcatcgg ccagcaaccg cctcttcttt caatctacac 11340
ccagatcagt ctcgtttacc ccgtctctga tccctcccag tatcccacca tcgtcagcac 11400
ccttgaggaa ggcctaaaac gcctctctca aaccttccca tgggtcgcgg gccaggtcaa 11460
gaccgagggc atcagcgaag gaaacacagg aacttccaag atcattccat atgaggagac 11520
accccgtctt gtggtgaaag acctccgtga tgattcctca gcgccaacga tcgaggggtt 11580
gagaaaggcg ggtttcccct tagagatgtt tgacgagaac gtcgtcgctc cgaggaagac 11640
attagctatc ggacctggca atggccccaa cgacccgaag cctgtgttgc tattgcagct 11700
caacttcatt aagggcggac tcattctcac cgtcaacgga caacatggtg ctatggacat 11760
gacaggacaa gatgcaatta ttcgtcttct ctccaaggcg tgccgcaacg aatcattcac 11820
cgaggaggaa atctcggcca tgaacctcga tcgcaagacg gtagtccctc tccttgaaaa 11880
ctacaaagtt ggtcctgagc tagaccacca gatcgccaaa cctgcgcctg ctggcgacgc 11940
tccacccgca ccggccaagg caagctgggc gttcttttca ttcactccca aggccctctc 12000
ggagctgaaa gacgcagcca caaagactct tgacgcgtcg tccaagtttg tgtcaactga 12060
tgatgctctt tcggcgttta tctggcaatc aacctcgcgc gtacgtctcg caagattgga 12120
tgcttccaca cctactgaat tctgccgcgc tgtcgacatg cggggcccaa tgggcgtatc 12180
aagcacatac ccaggccttc ttcaaaacat gacctaccat gactcgaccg tcgccgaaat 12240
cgccaacgaa ccacttggcg caacagcatc acgcctgcgc tcggaactca acagtgatcg 12300
tttgcgcaga cgaacacaag ctttggcgac gtacatgcat ggcctgcctg acaagtcgag 12360
cgtctccctg accgccgatg cgaatccgtc aagcagcatc atgctgagtt cctgggccaa 12420
ggtgggatgc tgggagtatg actttgggtt tggactgggt aagcctgaga gtgtgagaag 12480
acctcgcttt gaacctttg agagtttgat gtactttatg cccaagaagc ctgatgggga 12540
gtttacggcg tccatttctc tgagggatga ggatatggag agactaaagg cggatgagga 12600
gtggacaaag tacgcaaagt atattgggta gatagtttac tagactactg caggatatcg 12660
tggatccccg aatttccccg atcgttcaaa catttggcaa taaagtttct taagattgaa 12720
tcctgttgcc ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt 12780
aataattaac atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc 12840
gcaattatac atttaatacg cgatagaaaa caaaatatag cgcgcaaact aggataaatt 12900
atcgcgcgcg gtgtcatcta tgttactaga tcgggaattc ggcgcgcca             12949
```

Patentansprüche

1. Pflanze, die resistent gegen einen Pilz ist, der ein Trichothecen erzeugt, das eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt, wobei die Pflanze eine Pflanzenzelle umfaßt, worin die Pflanzenzelle folgendes umfaßt:
a) eine Nukleinsäuresequenz, dessen Komplement an SEQ ID NO: 1 in 7% Natriumdodecylsulfat, 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C mit Spülung in 0,5 × SSC, 0,1% SDS bei 50°C hybridisiert;
b) eine Nukleinsäure mit wenigstens 90% Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 1; oder
c) eine Nukleinsäuresequenz, die die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 2 codiert, wobei die Nukleinsäuresequenz ein Protein codiert, das Trichothecen-3-O-acetyltransferase-Aktivität aufweist.

2. Pflanze gemäß Anspruch 1, worin die Pflanzenzelle eine Nukleinsäuresequenz umfaßt, deren Komplement an SEQ ID NO: 1 in 7% Natriumdodecylsulfat, 0,5 M $NaPO_4$, 1 mM EDTA bei 50°C mit Spülung in 0,1 X SSC, 0,1% SDS bei 50°C hybridisiert.

3. Pflanze gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin die Pflanze resistent gegen eine Fusarium-Infektion ist.

4. Pflanze gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, die eine einkeimblättrige Pflanze ist.

5. Pflanze gemäß Anspruch 4, die eine Getreidepflanze ist.

6. Saatgut der Pflanze gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das Saatgut die Nukleinsäuresequenz von SEQ ID NO: 1 umfaßt.

7. Verfahren zur Erzeugung einer Weizenpflanze, die resistent gegen einen Pilz ist, der ein Trichothecen erzeugt, das eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt, umfassend die folgenden Schritte:

a) Transformieren einer Weizenpflanzenzelle mit einem heterologen Gen, das die Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1 umfaßt;
b) Exprimieren des Genprodukts des Gens auf einem biologisch signifikanten Niveau;
c) Regenerieren der Pflanzenzelle zu einer Pflanze; und
d) Selektieren einer Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen den Pilz; und gegebenenfalls
e) Selbsten oder Auskreuzen der in Schritt d) erhaltenen Pflanze.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, worin der Pilz aus der Gattung Fusarium ist.

9. Verfahren zur Prävention einer Mycotoxin-Kontamination einer Pflanze und/oder eines Pflanzensaatguts, umfassend das Kultivieren einer Pflanze gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einer durch ein Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8 erzeugten Pflanze, bevorzugt in einem Gebiet mit moderatem bis schwerem Pilzbefall, worin der Pilz aus der Gattung Fusarium ist und worin das Mycotoxin ein Trichotecen ist, das eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt.

10. Verfahren zur Reduzierung und/oder Prävention des Wachstums eines Pilzes der Gattung Fusarium auf einer Pflanze, wobei der Pilz ein Trichothecen erzeugen kann, das eine C-3-Hydroxyl-Gruppe umfaßt, wobei das Verfahren das Kultivieren der Pflanze gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einer durch ein Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8 erzeugten Pflanze umfaßt, bevorzugt in einem Gebiet mit moderatem bis schwerem Pilzbefall.

11. Verfahren zur Erzeugung von Saatgut, worin die aus dem Saatgut kultivierte Pflanze pilzresistent ist, umfassend das Selbsten oder Auskreuzen der Pflanze gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 oder einer durch ein Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8 erzeugten Pflanze.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, worin das Saatgut resistent gegen Pilze der Gattung Fusarium ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen