



(10) **DE 11 2009 002 061 T5** 2011.07.14

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2010/023186**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2009 002 061.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP2009/060886**
(86) PCT-Anmeldetag: **24.08.2009**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **04.03.2010**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **14.07.2011**

(51) Int Cl.: **C07K 14/415 (2006.01)**
C12N 15/82 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
61/092,100 27.08.2008 US

(74) Vertreter:
Herzog Fiesser & Partner, 68309, Mannheim, DE

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

(72) Erfinder:
**Lohar, Dasharath Prasad, N.C., Cary, US; Hill,
Steven, N.C., Cary, US**

(54) Bezeichnung: **Nematodenresistente transgene Pflanzen**

(57) Hauptanspruch: Transgene Pflanze, die mit einem Expressionsvektor, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, transformiert ist.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft die Verbesserung der landwirtschaftlichen Produktivität durch die Verwendung von nematodenresistenten transgenen Pflanzen und Samen, sowie Verfahren zur Herstellung von solchen Pflanzen und Samen.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Bei den Nematoden handelt es sich um mikroskopische Rundwürmer, die sich von den Wurzeln, Blättern und Stengeln von mehr als 2.000 Reihenkulturen, Gemüsen, Früchten und Zierpflanzen ernähren und so weltweit Ernteverluste von schätzungsweise \$100 Milliarden verursachen. Eine Varietät von parasitischen Nematodenspezies infiziert Kulturpflanzen, darunter Wurzelgallennematoden (root-knot nematodes, RKN), Zystennematoden und läsionsbildende Nematoden. Die Wurzelgallennematoden, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie die Bildung von Wurzelgallen an den Ernährungsstellen verursachen, verfügen über einen relativ breiten Wirtsbereich und sind daher für eine Vielzahl von Kulturarten parasitär. Die Zystennematodenspezies und läsionsbildenden Nematodenspezies verfügen über einen stärker begrenzten Wirtsbereich, führen jedoch bei anfälligen Kulturen trotzdem zu beträchtlichen Verlusten.

[0003] Parasitäre Nematoden kommen überall in den Vereinigten Staaten vor, wobei die höchsten Konzentrationen in den warmen, feuchten Regionen des Südens und des Westens sowie in sandigen Böden auftreten. Der Sojabohnenzystennematode (*Heterodera glycines*), der wichtigste Schädling der Sojabohnenpflanzen, wurde in den Vereinigten Staaten zuerst in North Carolina im Jahr 1954 entdeckt. Manche Gebiete sind so stark mit dem Sojabohnenzystennematoden (soybean cyst nematode, SCN) verseucht, dass der Anbau von Sojabohnen ohne Bekämpfungsmaßnahmen nicht mehr wirtschaftlich möglich ist. Obwohl die wichtigste Hauptkultur, die vom SCN befallen wird, die Sojabohne ist, parasitisiert der SCN insgesamt ungefähr 50 Wirte, darunter Feldkulturen, Gemüse, Zierpflanzen und Unkräuter.

[0004] Zu den Anzeichen von Nematodenschaden zählen Verkümmern sowie Vergilbung der Blätter und Welken der Pflanzen während Hitzeperioden. Nematodenbefall kann jedoch zu beträchtlichen Ertragsverlusten führen, ohne dass irgendwelche offensichtlichen oberirdischen Krankheitssymptome auftreten. Die Primäursachen der Ertragsreduktion beruhen auf unterirdischer Wurzelschädigung. Wurzeln, die mit SCN infiziert sind, sind verzweigt oder verkümmert. Verseuchung mit Nematoden kann auch die Anzahl der stickstofffixierenden Knöllchen an den Wurzeln verringern und die Wurzeln gegenüber Befall durch andere bodenbürtige Pflanzen-nematoden stärker anfällig machen.

[0005] Der Lebenszyklus der Nematoden weist drei Hauptstadien auf, nämlich Ei, Jugendstadium und Adulte. Der Lebenszyklus der einzelnen Nematodenspezies ist unterschiedlich. Der Lebenszyklus des SCN ähnelt den Lebenszyklen anderer pflanzenparasitärer Nematoden. So kann zum Beispiel der SCN-Lebenszyklus unter optimalen Bedingungen in der Regel in 24 bis 30 Tagen abgeschlossen werden, während andere Spezies sogar ein Jahr oder länger benötigen können, um ihren Lebenszyklus abzuschließen. Werden im Frühling die Temperatur- und Feuchtigkeitsniveaus günstig, so schlüpfen wurmförmige Jugendstadien aus den Eiern im Boden. Nur Nematoden im Jugendentwicklungsstadium sind fähig, die Sojabohnenwurzeln zu infizieren.

[0006] Nach dem Eindringen in die Sojabohnenwurzeln bewegen sich die SCN-Jugendstadien so lange durch die Wurzel, bis sie mit dem Leitbündelgewebe in Kontakt kommen; nun hören sie auf, zu wandern, und beginnen mit der Nahrungsaufnahme. Mit einem Mundstachel injiziert der Nematode Sekrete, die gewisse Wurzelzellen modifizieren und sie in spezialisierte Ernährungsstellen umwandeln. Die Wurzelzellen werden morphologisch in große mehrkernige Syncytien (oder, bei RKN, Riesenzellen) umgewandelt, die den Nematoden als Nährstoffquelle dienen. So zweigen die sich aktiv ernährenden Nematoden essentielle Nährstoffe von der Pflanze ab, was zu Ertragsverlust führt. Während sich die weiblichen Nematoden ernähren, schwellen sie an und werden schlussendlich so groß, dass ihre Körper durch das Wurzelgewebe durchbrechen und an der Wurzeloberfläche zu liegen kommen.

[0007] Nach einem Zeitraum der Nahrungsaufnahme wandern die männlichen SCN nicht wie die adulten Weibchen, die angeschwollen sind, aus der Wurzel in den Boden und befruchten die vergrößerten adulten Weibchen. Anschließend sterben die Männchen, während die Weibchen am Wurzelsystem haften bleiben und weiter Nahrung aufnehmen. Die Eier in den angeschwollenen Weibchen beginnen, sich zu entwickeln, zuerst in einer Masse oder einem Eisack außerhalb des Körpers und dann später innerhalb der Körperhöhle des

Nematoden. Schlussendlich ist die gesamte Körperhöhle des adulten Weibchens mit Eiern gefüllt, und der Nematode stirbt. Dieser mit Eiern gefüllte Körper des toten Weibchens wird als Zyste bezeichnet. Schließlich lösen sich die Zysten ab und liegen frei im Boden vor. Die Zystenwände werden sehr zäh und bieten einen ausgezeichneten Schutz für die ungefähr 200 bis 400 darin befindlichen Eier. Die SCN-Eier überleben innerhalb der Zyste, bis geeignete Schlüpfbedingungen vorliegen. Obwohl viele der Eier innerhalb des ersten Jahres schlüpfen können, überleben auch viele mehrere Jahre lang innerhalb der schützenden Zysten.

[0008] Ein Nematode kann sich mit eigener Kraft durch den Boden nur einige Inches pro Jahr fortbewegen. Eine Verseuchung mit Nematoden kann sich jedoch auf verschiedene Art und Weise über beträchtliche Distanzen ausweiten. Alles, was verseuchten Boden bewegen kann, kann die Verseuchung ausbreiten, darunter landwirtschaftliche Maschinen, Fahrzeuge und Geräte, Wind, Wasser, Tiere und Landwirtschaftsarbeitskräfte. Bodenklumpen in der Größe von Samen verunreinigen häufig geerntete Samen. Eine Verseuchung mit Nematoden kann daher verbreitet werden, wenn verunreinigtes Saatgut von verseuchten Feldern auf nichtverseuchten Feldern gesät wird. Es existieren sogar Beweise, dass gewisse Nematodenarten von Vögeln verbreitet werden können. Nur einige dieser Ursachen können verhindert werden.

[0009] Zu den traditionellen Maßnahmen, um Verseuchung durch Nematoden in Griff zu bekommen, zählen: die Aufrechterhaltung der korrekten Bodennährstoffe und Boden-pH-Werte auf nematodenverseuchtem Land; die Bekämpfung von sonstigen Pflanzenkrankheiten sowie von Schadinsekten und Schadunkräutern; die Verwendung von Hygienisierungspraktiken wie Pflügen, Bepflanzen und Kultivieren von nematodenverseuchten Feldern nur nachdem nichtverseuchte Felder bearbeitet wurden; die sorgfältige Reinigung von Gerätschaft mit Dampf oder Wasser unter hohem Druck, nachdem in verseuchten Feldern gearbeitet wurde; keine Verwendung von Saatgut, das auf verseuchtem Land erzeugt wurde, um damit nichtverseuchte Felder zu bepflanzen, außer wenn das Saatgut ordentlich gereinigt worden ist; die Rotation von verseuchten Feldern und das Abwechseln zwischen Wirtskulturen mit Nichtwirtskulturen; die Verwendung von Nematiziden sowie das Anpflanzen von resistenten Pflanzensorten.

[0010] Für die genetische Transformation von Pflanzen, um eine erhöhte Resistenz gegen pflanzenparasitäre Nematoden zu vermitteln, sind Verfahren vorgeschlagen worden. Die US-Patente Nr. 5,589,622 und 5,824,876 beispielsweise betreffen die Identifikation von Pflanzengenen, die spezifisch in bzw. neben der Nahrungsaufnahmestelle der Pflanze nach dem Anheften des Nematoden exprimiert werden. Einige Ansätze beinhalten die Transformation von Pflanzen mit doppelsträngiger RNA, die fähig ist, essentielle Nematodengene zu inhibieren. In anderen agrarbiotechnologischen Ansätzen wird vorgeschlagen, Gene zu überexprimieren, die für Proteine codieren, die für Nematoden toxisch sind.

[0011] Leguminosenpflanzen wie Sojabohne und Luzerne bilden, wenn sie mit symbiotischen Bodenbakterien der Gattung *Rhizobium* infiziert werden, spezialisierte Wurzelknöllchen. Sobald *Rhizobia* innerhalb der Knöllchen etabliert sind, fixieren sie Luftstickstoff und stellen ihn der Pflanze für ihre Nutzung zur Verfügung. Die Stickstofffixierung in den Knöllchen ist für die Landwirtschaft aufgrund der wesentlichen Rolle des Stickstoffs als Pflanzennährstoff wichtig. Viele Pflanzengene, die als „Noduline“ bezeichnet werden, werden präferentiell in den Knöllchen exprimiert. Die Nodulingene codieren für verschiedenste Proteine, darunter Leghämoglobin, Uricase, Glutaminsynthetase, Saccharosesynthase und zahlreiche andere Proteine mit unbekannter Funktion.

[0012] Eine Klasse der Nodulingene von *Medicago trunculata* (Luzerne) codiert für kleine Proteine, die an der Aminosäure Cystein angereichert sind, mit der Bezeichnung „Cys-cluster-Proteine“ oder „CUP“. Eine Unterklasse der CCP ist durch eine N-terminale Signalsequenz, ein kleines polares reifes Peptid mit hoher Ladung sowie eine charakteristische Anordnung von vier Cysteinresten, die innerhalb des reifen Peptids zwei Disulfidbrücken bilden, gekennzeichnet. Diese Unterklasse der CCP unterscheidet sich von anderen *M. trunculata*-CCP-Unterklassen durch die Anzahl der Cysteinreste: andere CCP enthalten sechs, acht oder zehn Cysteinreste in dem reifen Peptid und bilden mit größerer Wahrscheinlichkeit mehr als zwei Disulfidbrücken in dem reifen Peptid. Abgesehen von der charakteristischen Anordnung der Cysteine, die den Mitgliedern von jeder Unterklasse gemein ist, weisen die CCP relativ wenig Aminosäureidentität auf.

[0013] Die Disulfidbrückenmuster der reifen *M. trunculata*-CCP-Peptide, die mehr als vier Cysteinreste enthalten, ähneln denen der pflanzlichen Defensine, bei denen es sich um niedermolekulare cysteinreiche antimikrobielle und antifungale Proteine handelt. Pflanzliche Defensine umfassen acht Cysteine, die vier strukturstabilisierende Disulfidbrücken bilden. Die dreidimensionale Struktur der pflanzlichen Defensine enthält ein „durch Cystein stabilisiertes $\alpha\beta$ “- oder „ $CS\alpha\beta$ “-Motiv, das auch bei Toxinen aus Insekten, Skorpionen, Honigbienen und Spinnengiften vorkommt. Die kurzkettigen Toxine, wie das Skorpiontoxin, binden entweder an die K^+ - oder Cl-Kanäle.

[0014] In den US-Patenten Nr. 6,121,436; 6,316,407 und 6,916,970 werden die Defensine AFP1 und AFP2 aus *M. trunculata* beschrieben. Das AFP1-Gen wurde unter der Kontrolle des konstitutiven FMV-Promoters in die Kartoffel transformiert, und die entstandenen transgenen Pflanzen zeigten sowohl in Gewächshausprüfungen als auch in Feldprüfungen eine erhöhte Resistenz gegen den Pilz *Verticillium dahliae* (Gao, et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18, 1307). Trotz dieser positiven Ergebnisse ist bis jetzt noch keine transgene Kartoffel mit einem Transgen, das für das AFP1-Defensin codiert, in den Handel gebracht worden.

[0015] In den US-Patenten Nr. 6,911,577 und 7,396,980 werden pflanzliche Gene beschrieben, die für Defensine aus *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Glycine max*, *Beta vulgaris*, *Hedera helix*, *Tulipa fosteriana*, *Tulipa gesneriana*, *Momordica charantia*, *Nicotiana benthamiana*, *Taraxacum kok-saghyz*, *Picramnia pentandra*, *Amaranthus retroflexus*, *Allium porrum*, *Cyamopsis tetragonoloba*, *Brassica napus*, *Vernonia mespilifolia*, *Parthenium argentatum*, *Licania michauxii*, *Ricinus communis*, *Eucalyptus grandis*, *Vitis vinifera* und *Arachis hypogaea* codieren. Die pflanzlichen Defensingene, die in den US-Patenten Nr. 6,911,577 und 7,396,980 beschrieben werden, sollen Resistenz gegen Parasiten, einschließlich Nematoden, verleihen.

[0016] Bis jetzt ist noch in keinem Land eine genetisch modifizierte Pflanze mit einem Transgen, das fähig ist, Nematodenresistenz zu verleihen, freigegeben worden. Demgemäß besteht nach wie vor ein Bedarf, ungefährliche und wirksame Zusammensetzungen und Verfahren für die Bekämpfung von pflanzenparasitären Nematoden unter Einsatz der Agrarbiotechnologie zu identifizieren.

DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben entdeckt, dass ein Transgen, umfassend ein Polynukleotid, das für ein reifes *M. trunculata*-CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, Sojabohnenpflanzen gegen SCN-Infektion resistent machen kann. Demgemäß stellt die vorliegende Erfindung transgene Pflanzen und Samen sowie Verfahren zum Widerstehen oder zumindest Lindern von Nematodenbefall bei wertvollen landwirtschaftlichen Kulturen bereit.

[0018] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine transgene Pflanze bereit, die mit einem Expressionsvektor, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, transformiert ist.

[0019] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung stellt einen von der obenbeschriebenen transgenen Pflanze erzeugten Samen bereit. Der Samen ist für ein Transgen, umfassend mindestens ein *M. trunculata*-Gen, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, reinerbig, und die Expression des CCP-Gens bzw. der CCP-Gene vermittelt der aus dem transgenen Samen herangezogenen Pflanze eine erhöhte Nematodenresistenz.

[0020] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft einen Expressionsvektor, umfassend einen Promoter in operativer Verknüpfung mit einem Polynukleotid, das für mindestens ein reifes *M. trunculata*-CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Promoter um einen konstitutiven Promoter. Stärker bevorzugt ist der Promoter fähig, spezifisch die Expression in Pflanzenwurzeln zu steuern. Am stärksten bevorzugt ist der Promoter fähig, spezifisch die Expression an einer Syncytienstelle einer Pflanze, die mit Nematoden infiziert ist, zu steuern.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer nematodenresistenten transgenen Pflanze bereit, das die folgenden Schritte umfasst: a) Transformieren einer Wildtyp-Pflanzenzelle mit einem Expressionsvektor, umfassend einen Promoter in operativer Verknüpfung mit einem Polynukleotid, das für mindestens ein reifes *M. trunculata*-CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält; b) Regenerieren von transgenen Pflanzen aus der transformierten Pflanzenzelle; und c) Selektieren von transgenen Pflanzen auf erhöhte Nematodenresistenz, verglichen mit einer Kontrollpflanze derselben Art.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] Fig. 1 zeigt die Tabelle der SEQ ID NOs, die entsprechenden Genen und entsprechendem Promoter zugeordnet sind.

[0023] Fig. 2 zeigt ein Aminosäure-Alignment von MtCCP1 (SEQ ID NO: 2), MtCCP3 (SEQ ID NO: 4), MtCCP4 (SEQ ID NO: 6), MtCCP5 (SEQ ID NO: 8), MtCCP8 (SEQ ID NO: 10), MtCCP2 (SEQ ID NO: 12), MtCCP7 (SEQ ID NO: 14), MtCCP9 (SEQ ID NO: 16) und MtCCP6 (SEQ ID NO: 18). Das Alignment wird mit der Software-

Reihe Vector NTI durchgeführt (Gap Opening Penalty = 10, Gap Extension Penalty = 0,05, Gap Separation Penalty = 8).

[0024] Fig. 3 zeigt die globale prozentuale Nukleotididentität zwischen den MtCCP-Genen: MtCCP1 (SEQ ID NO: 1), MtCCP3 (SEQ ID NO: 3), MtCCP4 (SEQ ID NO: 5), MtCCP5 (SEQ ID NO: 7), MtCCP8 (SEQ ID NO: 9), MtCCP2 (SEQ ID NO: 11), MtCCP7 (SEQ ID NO: 13), MtCCP9 (SEQ ID NO: 15) und MtCCP6 (SEQ ID NO: 17). Die paarweisen Alignments und prozentualen Identitäten wurden unter Verwendung von Needle von EMBOSS-4.0.0 (Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443–453) berechnet.

[0025] Fig. 4 zeigt die globale prozentuale Aminosäureidentität zwischen MtCCP-Genen: MtCCP1 (SEQ ID NO: 2), MtCCP3 (SEQ ID NO: 4), MtCCP4 (SEQ ID NO: 6), MtCCP5 (SEQ ID NO: 8), MtCCP8 (SEQ ID NO: 10), MtCCP2 (SEQ ID NO: 12), MtCCP7 (SEQ ID NO: 14), MtCCP9 (SEQ ID NO: 16) und MtCCP6 (SEQ ID NO: 18). Die paarweisen Alignments und prozentualen Identitäten wurden unter Verwendung von Needle von EMBOSS-4.0.0 (Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443–453) berechnet.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0026] Die vorliegende Erfindung kann anhand der folgenden detaillierten Beschreibung und der hierin enthaltenen Beispiele besser verstanden werden. In dem gesamten Anmeldungstext wird auf verschiedene Veröffentlichungen Bezug genommen. Der Offenbarungsgehalt von allen diesen Veröffentlichungen und denen der Literaturstellen, die innerhalb dieser Veröffentlichungen genannt werden, wird hiermit durch Bezugnahme voll inhaltlich in die vorliegende Anwendung aufgenommen, um den Stand der Technik, den die vorliegende Erfindung betrifft, umfassender zu beschreiben. Die im vorliegenden Text verwendete Terminologie dient lediglich der Beschreibung von spezifischen Ausführungsformen und ist nicht als einschränkend zu verstehen. Im vorliegenden Zusammenhang kann „ein/eine“ je nach dem Zusammenhang, in dem dieses Wort verwendet wird, ein/e oder mehr bedeuten. So kann zum Beispiel die Erwähnung von „einer Zelle“ bedeuten, dass mindestens eine Zelle verwendet werden kann. Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet das Wort „oder“ ein beliebiges Glied einer bestimmten Aufzählung und beinhaltet auch eine beliebige Kombination von Gliedern dieser Aufzählung.

[0027] Wie im vorliegenden Zusammenhang definiert ist eine „transgene Pflanze“ eine Pflanze, die unter Verwendung der DNA-Rekombinationstechnik so verändert worden ist, dass sie eine isolierte Nukleinsäure enthält, die andernfalls in der Pflanze nicht vorliegen würde. Im vorliegenden Zusammenhang beinhaltet der Begriff „Pflanze“ eine ganze Pflanze, Pflanzenzellen und Pflanzenteile. Zu den Pflanzenteilen zählen, jedoch nicht einschränkend, Stengel, Wurzeln, Ovula, Staubblätter, Blätter, Embryonen, meristematische Regionen, Kallusgewebe, Gametophyten, Sporophyten, Pollen, Mikrosporen und dergleichen. Die transgene Pflanze der Erfindung kann männlich-steril oder männlich-fertil sein und kann weiterhin Transgene beinhalten, bei denen es sich nicht um diejenigen handelt, die die im vorliegenden Zusammenhang beschriebenen isolierten Polynukleotide umfassen.

[0028] Wie im vorliegenden Zusammenhang definiert sind der Begriff „Nukleinsäure“ und „Polynukleotid“ untereinander austauschbar und beziehen sich auf RNA oder DNA, die geradkettig oder verzweigt ist, einzel- oder doppelsträngig ist oder ein Hybrid davon ist. Der Begriff umfasst auch RNA/DNA-Hybride. Ein „isoliertes“ Nukleinsäuremolekül ist ein Molekül, das von anderen Nukleinsäuremolekülen, die in dem natürlichen Ausgangsmaterial der Nukleinsäure vorhanden sind (d. h. Sequenzen, die für andere Polypeptide codieren), im Wesentlichen getrennt ist. So wird zum Beispiel eine clonierte Nukleinsäure als isoliert betrachtet. Eine Nukleinsäure wird auch dann als isoliert betrachtet, wenn sie durch das Eingreifen des Menschen verändert worden ist oder an einen Locus oder eine Stelle, bei dem/der es sich nicht um ihre natürliche Lage handelt, platziert worden ist oder wenn sie durch Transformation in eine Zelle eingeführt worden ist. Weiterhin kann ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, frei von einem Teil von dem sonstigen Zellmaterial, mit dem es natürlich assoziiert ist, oder von dem Kulturmedium, wenn es rekombinationstechnisch erzeugt worden ist, oder von chemischen Vorstufen oder sonstigen Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert worden ist, sein. Obwohl es gegebenenfalls untranslatierte Sequenz sowohl am 3'- als auch 5'-Ende der Codierregion eines Gens umfassen kann, kann es bevorzugt sein, die Sequenzen, die die Codierregion in ihrem natürlich vorkommenden Replikon auf natürliche Weise flankieren, zu entfernen.

[0029] Der Begriff „Gen“ wird allgemein für einen beliebigen mit einer biologischen Funktion assoziierten Nukleinsäureabschnitt verwendet. Gene beinhalten daher Introns und Exons wie in genomischer Sequenz oder nur die Codiersequenzen wie in cDNAs und/oder die Regulationssequenzen, die für ihre Expression erforder-

lich sind. So bezieht sich Gen zum Beispiel auf ein Nukleinsäurefragment, das mRNA oder funktionelle RNA exprimiert oder das für ein spezifisches Protein codiert und das Regulationssequenzen beinhaltet.

[0030] Die Begriffe „Polypeptid“ und „Protein“ werden im vorliegenden Text austauschbar für ein Polymer von aufeinanderfolgenden Aminosäureresten verwendet.

[0031] Die Begriffe „in operativer Verknüpfung“ und „in operativer Assoziation mit“ sind austauschbar und werden im vorliegenden Zusammenhang für die Assoziation von isolierten Polynukleotiden auf einem einzelnen Nukleinsäureabschnitt, so dass die Funktion von einem isolierten Polynukleotid von dem anderen isolierten Polynukleotid beeinflusst wird, verwendet. So gilt zum Beispiel eine regulatorische DNA als mit einer DNA, die eine RNA exprimiert oder für ein Polypeptid codiert, „operativ verknüpft“, wenn die zwei DNAs so liegen, dass die regulatorische DNA die Expression der codierenden DNA beeinflusst.

[0032] Der Begriff „Promoter“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf eine DNA-Sequenz, die, wenn sie mit einer interessierenden Nukleotidsequenz ligiert ist, fähig ist, die Transkription der interessierenden Nukleotidsequenz in mRNA zu kontrollieren. Ein Promoter befindet sich typischerweise, jedoch nicht zwingend, 5'-seitig (z. B. stromaufwärts) eines interessierenden Nukleotids (z. B. proximal in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt eines Strukturgens), dessen Transkription in mRNA von ihm kontrolliert wird, und stellt einen Punkt für die spezifische Bindung durch die RNA-Polymerase und andere Transkriptionsfaktoren für das Initiieren der Transkription bereit.

[0033] Der Begriff „Transkriptionsregulationselement“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf ein Polynukleotid, das fähig ist, die Transkription eines operativ verknüpften Polynukleotids zu regulieren. Es beinhaltet Promoter, Enhancer, Introns, 5'-UTR und 3'-UTR, ist jedoch nicht darauf beschränkt.

[0034] Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Vektor“ auf ein Nukleinsäuremolekül, das fähig ist, eine andere Nukleinsäure, mit der es verbunden worden ist, zu transportieren. Eine Art von Vektor ist ein „Plasmid“, worunter man eine ringförmige doppelsträngige DNA-Schleife, in die zusätzliche DNA-Abschnitte ligiert werden können, versteht. In der vorliegenden Beschreibung können „Plasmid“ und „Vektor“ austauschbar verwendet werden, da es sich bei dem Plasmid um die häufigste Vektorform handelt. Ein Vektor kann ein binärer Vektor sein oder T-DNA, die die linke „Border“ und die rechte „Border“ umfasst und ein dazwischenliegendes interessierendes Gen beinhalten kann. Der Begriff „Expressionsvektor“ ist im vorliegenden Zusammenhang mit dem Begriff „Transgen“ austauschbar und man versteht darunter einen Vektor, der fähig ist, die Expression eines bestimmten Nukleotids in einer geeigneten Wirtszelle zu dirigieren. Bei der Expression des Nukleotids kann es sich um eine Überexpression handeln. Ein Expressionsvektor umfasst ein regulatorisches Nukleinsäureelement in operativer Verknüpfung mit einer interessierenden Nukleinsäure, die – gegebenenfalls – operativ mit einem Terminationssignal und/oder einem anderen regulatorischen Element verknüpft ist.

[0035] Der Begriff „Homologe“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf ein Gen, das durch Abstammung von einer gemeinsamen DNA-Sequenz eines Ahnen mit einem zweiten Gen verwandt ist. Der Begriff „Homologe“ lässt sich auf die Beziehung zwischen Genen, die durch ein Artbildungsereignis voneinander getrennt sind (z. B. Orthologe), und auf die Beziehung zwischen Genen, die durch ein genetisches Duplikationsereignis voneinander getrennt sind (z. B. Paraloge), anwenden.

[0036] Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Orthologe“ auf Gene von unterschiedlichen Arten, die jedoch von einem gemeinsamen Vorläufergen durch Artbildung entstanden sind. Orthologe behalten im Verlauf der Evolution die gleiche Funktion bei. Orthologe codieren für Proteine mit denselben oder mit ähnlichen Funktionen. Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „Paraloge“ auf Gene, die durch Duplikation innerhalb eines Genoms miteinander verwandt sind. Paraloge weisen üblicherweise unterschiedliche Funktionen oder neue Funktionen auf, diese Funktionen können jedoch verwandt sein.

[0037] Der Begriff „konservierte Region“ oder „konservierte Domäne“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf eine Region in heterologen Polynukleotid- oder Polypeptidsequenzen, wobei zwischen den unterschiedlichen Sequenzen ein relativ hohes Ausmaß an Sequenzidentität besteht. Die „konservierte Region“ kann zum Beispiel unter Verwendung des Clustal-W-Algorithmus aus dem multiplen Sequenz-Alignment bestimmt werden.

[0038] Der Begriff „Zelle“ oder „Pflanzenzelle“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf eine einzelne Zelle und beinhaltet auch eine Population von Zellen. Bei der Population kann es sich um eine reine Population, die einen Zelltyp umfasst, handeln. Die Population kann jedoch mehr als einen Zelltyp umfassen. Eine

Pflanzenzelle kann im Zusammenhang mit der Erfindung isoliert sein (z. B. in Suspensionskultur) oder in einem Pflanzengewebe, Pflanzenorgan oder einer Pflanze in einem beliebigen Entwicklungsstadium umfasst sein.

[0039] Der Begriff „reinerbig“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf eine Pflanzensorte in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal, wenn sie für dieses Merkmal so stark genetisch homozygot ist, dass, wenn die reinerbige Sorte selbstbestäubt wird, nicht ein wesentliches Ausmaß an unabhängiger Aufspaltung des Merkmals unter der Nachkommenschaft beobachtet wird.

[0040] Der Begriff „Nullsegregant“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf einen Nachkommen (oder von dem Nachkommen abgeleitete Linien) einer transgenen Pflanze, der aufgrund der Mendelschen Aufspaltung das Transgen nicht enthält.

[0041] Der Begriff „Wildtyp“ bedeutet im vorliegenden Zusammenhang eine Pflanzenzelle, einen Samen, einen Pflanzenbestandteil, ein Pflanzengewebe, ein Pflanzenorgan oder eine ganze Pflanze, die/der/das nicht genetisch modifiziert oder experimentell behandelt worden ist.

[0042] Der Begriff „Kontrollpflanze“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf eine Pflanzenzelle, ein Explantat, einen Samen, einen Pflanzenbestandteil, ein Pflanzengewebe, ein Pflanzenorgan oder eine ganze Pflanze, die/das/der als Vergleich für transgene oder genetisch modifizierte Pflanze verwendet wird, um einen verbesserten Phänotyp oder ein wünschenswertes Merkmal in der transgenen oder genetisch modifizierten Pflanze zu identifizieren. Eine „Kontrollpflanze“ kann in manchen Fällen eine transgene Pflanzenlinie sein, die einen Leervektor oder ein Markergen umfasst, jedoch das interessierende rekombinante Polynukleotid, das in der ausgewerteten transgenen oder genetisch modifizierten Pflanze vorliegt, nicht enthält. Bei einer Kontrollpflanze kann es sich um eine Pflanze derselben Linie oder Sorte wie die transgene oder genetisch modifizierte Testpflanze handeln, oder sie kann eine andere Linie oder Sorte sein, wie eine Pflanze, von der bekannt ist, dass sie einen bestimmten Phänotyp, ein bestimmtes Merkmal oder einen bekannten Genotyp aufweist. Zu einer geeigneten Kontrollpflanze würde auch eine genetisch nicht modifizierte oder nichttransgene Pflanze der hier für die Erzeugung einer transgenen Pflanze verwendeten Elternlinie beinhalten.

[0043] Der Begriff „Syncytienstelle“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf die in Pflanzenwurzeln nach Befall durch Nematoden gebildete Ernährungsstelle. Die Stelle wird als Nährstoffquelle für die Nematoden verwendet. Ein Syncytium ist die Ernährungsstelle für Zystenematoden, und Riesenzellen sind die Ernährungsstellen von Wurzelgallennematoden.

[0044] Kulturpflanzen und ihre entsprechenden parasitären Nematoden sind im Index of Plant Diseases in the United States (U. S. Dept. of Agriculture Handbook Nr. 165, 1960); Distribution of Plant-Parasitic Nematode Species in North America (Society of Nematologists, 1985); und Fungi on Plants and Plant Products in the United States (American Phytopathological Society, 1989) angeführt. So zum Beispiel zählen zu den pflanzenparasitären Nematoden, auf die die vorliegende Erfindung abzielt, Zystenematoden und Wurzelknöllchenematoden, was jedoch keine Einschränkung darstellt. Zu bestimmten pflanzenparasitären Nematoden, auf die die vorliegende Erfindung abzielt, zählen, jedoch ohne Einschränkung, *Heterodera glycines*, *Heterodera schachtii*, *Heterodera avenae*, *Heterodera oryzae*, *Heterodera cajani*, *Heterodera trifolii*, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis* oder *Globodera tabacum*, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica*, *M. naasi*, *M. exigua*, *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus angustus*, *Radopholus similis*, *Radopholus citrophilus*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae*, *Pratylenchus brachyurus*, *Pratylenchus vulnus*, *Paratylenchus curvatus*, *Paratylenchus zaeae*, *Rotylenchulus reniformis*, *Paratrichodorus anemones*, *Paratrichodorus minor*, *Paratrichodorus christiei*, *Anguina tritici*, *Bidara avenae*, *Subanguina radicola*, *Hoplolaimus seinhorsti*, *Hoplolaimus Columbus*, *Hoplolaimus galeatus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Hemicycliophora arenaria*, *Rhaclinaphelelenchus cocophilus*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Trichodorus primitivus*, *Nacobbus aberrans*, *Aphelenchoides besseyi*, *Hemicriciconemoides kanayaensis*, *Tylenchorhynchus claytoni*, *Xiphinema americanum*, *Cacopaurus pestis*, *Heterodera zaeae*, *Heterodera filipjevi* und dergleichen.

[0045] In einer Ausführungsform stellt die Erfindung eine nematodenresistente transgene Pflanze bereit, die mit einem Expressionsvektor, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, transformiert ist. In dieser Ausführungsform weist das isolierte Polynukleotid vorzugsweise eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 oder 17 auf. Alternativ dazu codiert das Polynukleotid für ein Polypeptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18.

[0046] Erfindungsgemäß kann die Pflanze aus der Gruppe bestehend aus monokotylen Pflanzen und dikotylen Pflanzen ausgewählt werden. Die Pflanze kann von einer Gattung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Mais, Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Roggen, Sorghum, Banane und Raigras, stammen. Die Pflanze kann von einer Gattung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Erbse, Luzerne, Sojabohne, Karotte, Sellerie, Tomate, Kartoffel, Baumwolle, Tabak, Pfeffer, Raps, Rübe, Kohl, Blumenkohl, Brokkoli, Salat und Arabidopsis thaliana, stammen.

[0047] Die vorliegende Erfindung stellt auch eine Pflanze, Samen und Teile von solch einer Pflanze sowie Nachkommenschaftspflanzen von solch einer Pflanze, darunter Hybride und Inzuchtpflanzen, bereit. Die Erfindung stellt auch ein Verfahren der Pflanzenzüchtung bereit, zum Beispiel für die Herstellung einer gekreuzten fertilen transgenen Pflanze. Das Verfahren umfasst, dass man eine fertile transgene Pflanze, umfassend einen bestimmten Expressionsvektor der Erfindung mit sich selbst oder mit einer zweiten Pflanze, zum Beispiel einer, der der bestimmte Expressionsvektor fehlt, kreuzt, um den Samen einer gekreuzten fertilen transgenen Pflanze, umfassend den bestimmten Expressionsvektor, herzustellen. Der Samen wird dann gepflanzt, wodurch man eine gekreuzte fertile transgene Pflanze erhält. Bei der Pflanze kann es sich um eine monokotyle Pflanze handeln. Die gekreuzte fertile transgene Pflanze kann den bestimmten Expressionsvektor über einen weiblichen Elter oder über einen männlichen Elter vererbt bekommen haben. Bei der zweiten Pflanze kann es sich um eine Inzuchtpflanze handeln. Bei der gekreuzten fertilen Transgenen kann es sich um einen Hybriden handeln. Die vorliegende Erfindung beinhaltet auch Samen von beliebigen dieser gekreuzten fertilen transgenen Pflanzen.

[0048] Die transgenen Pflanzen der Erfindung können unter Verwendung von bekannten Pflanzenzüchtungsverfahren mit ähnlichen transgenen Pflanzen oder mit transgenen Pflanzen, denen die Nukleinsäuren der Erfindung fehlen, oder mit nichttransgenen Pflanzen gekreuzt werden, um Samen herzustellen. Die transgene Pflanze der vorliegenden Erfindung kann weiterhin eine andere transgene Pflanze, die eine oder mehr Nukleinsäuren umfasst, umfassen und/oder hiermit gekreuzt werden, wodurch man in der Pflanze und/oder ihrer Nachkommenschaft einen „Stack“ von Transgenen erzeugt. Der Samen wird dann gepflanzt, wodurch man eine gekreuzte fertile transgene Pflanze, die die Nukleinsäure der Erfindung umfasst, erhält. Die gekreuzte fertile transgene Pflanze kann die bestimmte Expressionskassette über einen weiblichen Elter oder über einen männlichen Elter vererbt bekommen haben. Bei der zweiten Pflanze kann es sich um eine Inzuchtpflanze handeln. Bei der gekreuzten fertilen transgenen Pflanze kann es sich um einen Hybriden handeln.

[0049] Ebenfalls von der vorliegenden Erfindung mit umfasst sind Samen von beliebigen dieser gekreuzten fertilen transgenen Pflanzen. Die Samen der vorliegenden Erfindung können von fertilen transgenen Pflanzen geerntet werden und für das Heranziehen von Nachkommenschaftsgenerationen von transformierten Pflanzen der vorliegenden Erfindung, einschließlich Hybridpflanzenlinien, umfassend das DNA-Konstrukt, verwendet werden.

[0050] Das „Genstacking“ kann auch dadurch erfolgen, dass man zwei oder mehr Gene durch Pflanzentransformation in den Zellkern transferiert. Multiple Gene können in den Zellkern während der Transformation entweder nacheinander oder zugleich eingeführt werden. Gemäß der Erfindung kann ein „Stacking“ von multiplen *M. trunculata*-Genen, die für reife CCP-Peptide codieren, die maximal vier Cysteinreste umfassen, erfolgen, um eine verstärkte Nematodenresistenz bereitzustellen. Diese „stacked“ Kombinationen können nach einem beliebigen Verfahren erzeugt werden, darunter, jedoch nicht ausschließlich, die Kreuzungszüchtung von Pflanzen nach traditionellen Methoden oder durch genetische Transformation. Wenn bei den Merkmalen ein „Stacking“ durch genetische Transformation erfolgt, so können die *M. trunculata*-Gene der Reihe nach oder simultan in einer beliebigen Reihenfolge kombiniert werden. Sollen zum Beispiel zwei Gene eingeführt werden, so können die beiden Sequenzen in separaten Transformationskassetten oder auf derselben Transformationskassette enthalten sein. Die Expression der Sequenzen kann von demselben oder von verschiedenen Promotern vorangetrieben werden.

[0051] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft einen Expressionsvektor, umfassend einen Promoter in operativer Verknüpfung mit einem oder mehr Polynukleotiden der Erfindung, wobei die Expression des Polynukleotids einer transgenen Pflanze erhöhte Nematodenresistenz verleiht. In einer Ausführungsform handelt es sich bei dem Transkriptionsregulationselement um einen Promoter, der fähig ist, die konstitutive Expression eines operativ verknüpften Polynukleotids zu regulieren. Ein „konstitutiver Promoter“ bezieht sich auf einen Promoter, der fähig ist, das offene Leseraster oder das Regulationselement, das er kontrolliert, in allen oder beinahe allen Pflanzengeweben während allen oder beinahe allen Entwicklungsstadien der Pflanze zu exprimieren. Zu konstitutiven Promotern zählen, jedoch ohne Einschränkung, der 35S-CaMV-Promoter aus Pflanzenviren (Franck et al., Cell 21: 285–294, 1980), der Nos-Promoter (An G. et al., The Plant Cell 3: 225–

233, 1990), der Ubiquitin-Promoter (Christensen et al., *Plant Mol. Biol.* 12: 619–632, 1992 und 18: 581–8, 1991), der MAS-Promoter (Velten et al., *EMBO J.* 3: 2723–30, 1984), der Mais-H3-Histon-Promoter (Lepetit et al., *Mol Gen. Genet* 231: 276–85, 1992), der ALS-Promoter (WO96/30530), der 19S CaMV-Promoter (US 5,352,605), der Super-Promoter (US 5,955,646), der Promoter des „Figwort Mosaic Virus“ (US 6,051,753), der Reis-Actin-Promoter (US 5,641,876) und der Promoter der kleinen Rubisco-Untereinheit (US 4,962,028).

[0052] In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Transkriptionsregulationselement um einen regulierten Promoter. Ein „regulierter Promoter“ bezieht sich auf einen Promoter, der die Genexpression nicht konstitutiv, sondern zeitlich und/oder räumlich dirigiert und beinhaltet sowohl gewebespezifische als auch induzierbare Promoter. Unterschiedliche Promoter können die Expression eines Gens oder Regulationselements in unterschiedlichen Geweben oder Zelltypen oder zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder als Reaktion auf unterschiedliche Umweltbedingungen dirigieren.

[0053] Ein „gewebespezifischer Promoter“ oder ein „Promoter mit Bevorzugung für Gewebe“ bezieht sich auf einen regulierten Promoter, der nicht in allen Pflanzenzellen exprimiert wird, sondern nur in einem oder mehr Zelltypen in spezifischen Organen (wie Blättern oder Samen), spezifischen Geweben (wie Embryo oder Keimblatt), oder spezifischen Zelltypen (wie Blattparenchym- oder Samenspeicherzellen). Dazu zählen auch Promoter, die zeitlich reguliert werden, wie früh oder spät während der Embryogenese, während der Fruchtreifung in sich entwickelnden Samen oder Früchten, im vollendifferenzierten Blatt oder zu Beginn von Sequenz. Zu geeigneten Promotern zählen der Napin-Gen-Promoter aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promoter aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., *Mol Gen Genet.* 225(3): 459–67, 1991), der Oleosin-Promoter aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promoter aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promoter aus *Brassica* (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promoter (LeB4; Baeumlein et al., *Plant Journal*, 2(2): 233–9, 1992), sowie Promoter, die die samenspezifische Expression in monokotylen Pflanzen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis und dergleichen vermitteln. Beachtenswerte geeignete Promoter sind der Promoter des *Ipt2*- oder *Ipt1*-Gens aus der Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder diejenigen, die in WO 99/16890 beschrieben sind (Promoter des Gerste-Hordein-Gens, des Reis-Glutelin-Gens, des Reis-Oryzin-Gens, des Reis-Prolamin-Gens, des Weizen-Gliadin-Gens, des Weizen-Glutelin-Gens, des Maislein-Gens, des Hafer-Glutelin-Gens, des Sorghum-Kasirin-Gens und des Roggen-Secalin-Gens). Zu Promotern, die sich für die bevorzugte Expression in Pflanzenwurzelgeweben eignen, zählen zum Beispiel der von dem Mais-Nicotianaminsynthasegen abgeleitete Promoter (US 20030131377) und der Reis-RCC3-Promoter (US 11/075,113). Zu geeigneten Promotern für die bevorzugte Expression in pflanzlichen grünen Geweben zählen die Promoter von Genen wie dem Mais-Aldolase-Gen FDA (US 20040216189), der Aldolase und der Pyruvat orthophosphatdikinase (PPDK) (Taniguchi et. al., *Plant Cell Physiol.* 41(1): 42–48, 2000).

[0054] „Induzierbare Promoter“ beziehen sich auf diejenigen regulierten Promoter, die in einem oder mehr Zelltypen durch einen äußerlichen Reiz, z. B. eine Chemikalie, Licht, ein Hormon, Stress oder einen Nematoden wie Nematoden eingeschaltet werden können. Chemisch induzierbare Promoter eignen sich dann ganz besonders, wenn die Genexpression zeitspezifisch erfolgen soll. Zu Beispielen für solche Promoter zählen ein salicylsäureinduzierbarer Promoter (WO 95/19443), ein tetracyclininduzierbarer Promoter (Gatz et al., *Plant J.* 2: 397–404, 1992), der lichtinduzierbare Promoter aus der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (ssRUBISCO) und ein ethanolinduzierbarer Promoter (WO 93/21334). Geeignete Promoter, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind auch solche wie der nematodeninduzierbare Promoter des PRP1-Gens (Ward et al., *Plant. Mol. Biol.* 22: 361–366, 1993), der hitzeinduzierbare *hsp 80*-Promoter aus der Tomate (US 5187267), der kälteinduzierbare α -Amylase-Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der dürreinduzierbare Promoter des Maises (Busk et. al., *Plant J.* 11: 1285–1295, 1997), der kälte-, dürre- und durch hohe Salzkonzentration induzierbare Promoter aus der Kartoffel (Kirch, *Plant Mol. Biol.* 33: 897–909, 1997) oder der RD29A-Promoter aus *Arabidopsis* (Yamaguchi-Shinozalei et. al., *Mol. Gen. Genet.* 236: 331–340, 1993), viele kälteinduzierbare Promoter wie der *cor15a*-Promoter aus *Arabidopsis* (Genbank-Eintrag Nr. U01377), *blt101* und *blt4.8* aus der Gerste (Genbank-Eintrag Nr. AJ310994 und U63993), *wcs120* aus Weizen (Genbank-Eintrag Nr. AF031235), *mlip15* aus Mais (Genbank-Eintrag Nr. D26563), *bn 115* aus *Brassica* (Genbank-Eintrag Nr. U01377) und der wundinduzierbare *pinII*-Promoter (Europäisches Patent Nr. 375091).

[0055] Besonders für die vorliegende Erfindung eignen sich Promoter mit Bevorzugung für Syncytienstellen, oder Promoter, die durch Nematodenernährungsstellen induziert werden, darunter, jedoch ohne Einschränkung, Promoter aus der Reihe *Mtn3*-like-Promoter, Beschreibung in PCT/EP2008/051328, *Mtn21*-like-Promoter, Beschreibung in PCT/EP2007/051378, Peroxidase-like-Promoter, Beschreibung in PCT/EP2007/064356, Trehalose-6-Phosphatphosphatase-like-Promoter, Beschreibung in PCT/EP2007/063761 und *At5g12170*-like-

Promoter, Beschreibung in PCT/EP2008/051329. Alle obengenannten Anmeldungen werden hiermit durch Bezugnahme in den vorliegenden Text aufgenommen.

[0056] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung wiederum betrifft ein Verfahren zum Herstellen einer nematodenresistenten transgenen Pflanze, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst: a) Transformieren einer Wildtyppflanze mit einem Expressionsvektor, der ein Polynukleotid, das für ein codiert, umfasst, und c) Selektieren der transgenen Pflanzen auf erhöhte Nematodenresistenz.

[0057] Für die Einführung von Polynukleotiden in das Genom von Pflanzen und für die Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen sind verschiedene Verfahren bekannt, zum Beispiel in *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993); White F. F. (1993) *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; Transgenic Plants*, Band 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und Wu R., Academic Press, 15–38; Jenes B et al. (1993) *Techniques for Gene Transfer; Transgenic Plants*, Band 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, S. 128–143; Potrykus (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42: 205–225; Halford N. G., Shewry P. R. (2000) *Br Med Bull* 56(1): 62–73.

[0058] Transformationsverfahren können direkte und indirekte Transformationsverfahren beinhalten. Zu den geeigneten direkten Verfahren zählen die polyethylenglykolinduzierte DNA-Aufnahme, die liposomenvermittelte Transformation (US 4,536,475), biolistische Verfahren unter Verwendung der Genkanone (Fromm M. E. et al., *Bio/Technology*. 8(9): 833–9, 1990; Gordon-Kamm et al. *Plant Cell* 2: 603, 1990), die Elektroporation, die Inkubation von trockenen Embryonen in DNA-haltiger Lösung, und die Mikroinjektion. Bei diesen direkten Transformationsverfahren braucht das Plasmid nicht bestimmten Erfordernissen zu entsprechen. Es können einfache Plasmide wie diejenigen der pUC-Reihe, pBR322 und der M13mp-Reihe, pACYC184 und dergleichen verwendet werden. Sollen aus den transformierten Zellen intakte Pflanzen regeneriert werden, so befindet sich auf dem Plasmid vorzugsweise ein zusätzliches Selektionsmarker. Die direkten Transformationstechniken eignen sich gleichermaßen für dikotyle und monokotyle Pflanzen.

[0059] Die Transformation kann auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium* (zum Beispiel EP 0 116 718), durch Virusinfektion mittels Virusvektoren (EP 0 067 553; US 4,407,956; WO 95/34668; WO 93/03161) oder mittels Pollen (EP 0 270 356; WO 85/01856; US 4,684,611) durchgeführt werden. Transformationstechniken auf Basis von *Agrobacterium* (insbesondere für dikotyle Pflanzen) sind in der Fachwelt gut bekannt. Der *Agrobacterium*-Stamm (z. B. *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) umfasst ein Plasmid (Ti- oder Ri-Plasmid) und ein T-DNA-Element, das nach Infektion mit *Agrobacterium* an die Pflanze transferiert wird. Die T-DNA (transferierte DNA) wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Die T-DNA kann sich auf dem Ri- oder dem Ti-Plasmid befinden oder ist separat von einem sogenannten binären Vektor umfasst. Verfahren für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation sind zum Beispiel bei Horsch, R. B. et al. (1985) *Science* 225: 1229 beschrieben. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation eignet sich am besten für dikotyle Pflanzen, wurde jedoch auch für monokotyle Pflanzen adoptiert. Die Transformation von Pflanzen durch *Agrobacterien* ist zum Beispiel bei White F. F., *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants*, Band 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S. D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38; Jenes B et al. *Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants*, Band 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S. D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 128–143; Potrykus (1991) *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 42: 205–225 beschrieben.

[0060] Die im vorliegenden Text beschriebenen Nukleotide können direkt in das Plastidengenom hineintransformiert werden. Bei der Plastideexpression, in der Gene durch homologe Rekombination in die mehreren tausend Kopien des ringförmigen Plastidengenoms, das in jeder Pflanzenzelle vorhanden ist, inseriert werden, nutzt man den Vorteil der enormen Kopienzahl im Vergleich zu im Kern exprimierten Genen, um hohe Expressionsniveaus zu gewährleisten. In einer Ausführungsform werden die Nukleotide in einen Plastiden-Targeting-Vektor inseriert und in das Plastidengenom eines gewünschten pflanzlichen Wirts hineintransformiert. Man erhält Pflanzen, die für Plastidengenome, die die Nukleotidsequenzen enthalten, homoplasmatisch sind und die bevorzugt zu einer starken Expression der Nukleotide fähig sind.

[0061] Die Plastidentransformationstechnik ist zum Beispiel ausführlich in den US Patenten Nr. 5,451,513, 5,545,817, 5,545,818 und 5,877,462, in WO 95/16783 und WO 97/32977 und bei McBride et al. (1994) *PNAS* 91, 7301–7305 beschrieben.

[0062] Die transgenen Pflanzen der Erfindung können in einem Verfahren zur Bekämpfung des Befalls einer Kultur durch einen Pflanzennematoden verwendet werden, es umfasst den Schritt des Heranziehens der Kul-

tur aus Samen, umfassend einen Expressionsvektor, umfassend einen Promoter in operativer Verknüpfung mit einem Polynukleotid, das für mindestens ein reifes *M. trunculata*-CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste umfasst, wobei der Expressionsvektor stabil in das Genom der Samen integriert ist.

[0063] Die Erfindung wird genauer durch die folgenden Beispiele erläutert, die keinesfalls dahingehend interpretiert werden dürfen, dass sie den Umfang der Erfindung einschränken.

Beispiel 1: Clonieren von MtCCP-Genen aus *Medicago truncatula*, und Vektorkonstruktion

[0064] Samen von *Medicago truncatula* Jemalong A17 wurden keimen gelassen und im Gewächshaus herangezogen. Von den Sprossen dieser Pflanzen wurde genomische DNA isoliert, und aus dieser genomischen DNA wurden die MtCCP-Gene mittels molekularbiologischen Standardtechniken mit PCR amplifiziert. Das amplifizierte Produkt wurde in einem TOPO-entry-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) ligiert.

[0065] Die clonierten MtCCP-Gene wurden sequenziert und in einen Pflanzenexpressionsvektor, der einen Ubiquitin-Promoter aus der Petersilie enthielt, subcloniert (WO 03/102198; p-PcUbi4-2-Promoter (SEQ ID NO: 19) in Fig. 1). Der Selektionsmarker für die Transformation war die mutierte Form des Acetohydroxysäuresynthase-(AHAS-)Selektionsgens (auch AHAS2 genannt) aus *Arabidopsis thaliana* (Sathasivan et al., Plant Phys. 97: 1044–50, 1991), das Resistenz gegen das Herbizid ARSENAL (Imazapyr, BASF Corporation, Mount Olive, NJ) verleiht. Die Expression von AHAS2 wurde von einem Ubiquitin-Promoter aus der Petersilie (WO 03/102198) (SEQ ID NO: 19) vorangetrieben. In Tabelle 1 sind Konstrukte, die die *M. trunculata*-CCP, umfassend maximal vier Cysteinreste in ihren reifen Peptiden, enthalten, beschrieben.

Tabelle 1.

Bezeichnung des Vektors	MtCCP-Gen	SEQ ID NO: der MtCCP-Gene
RTP1114-1	MtCCP1	1
RTP1116-3	MtCCP3	3
RTP1117-1	MtCCP4	5
RTP1118-1	MtCCP5	7
RTP1120-4	MtCCP8	9
RTP1115-4	MtCCP2	11
RTP1119-1	MtCCP7	13
RTP1121-2	MtCCP9	15

Beispiel 2: Nematoden-Bioassay

[0066] Mit einem Assay-System mit bewurzelten Pflanzen, das in der eigenen, gleichzeitig anhängigen Schrift USSN 12/001,234 beschrieben ist, wurde ein Bioassay für die Beurteilung der von den im vorliegenden Text beschriebenen Polynukleotiden vermittelten Nematodenresistenz durchgeführt. Nach der Transformation mit den in Beispiel 1 beschriebenen binären Vektoren werden transgene Wurzeln erzeugt. Multiple transgene Wurzellinien werden subkultiviert und mit oberflächlich keimfrei gemachten SCN-Juvenilen im zweiten Stadium (J2), Rasse 3, in einer Menge von ungefähr 500 J2/Näpfchen inokuliert.

[0067] Vier Wochen nach der Nematodeninokulation wird die Anzahl Zysten in jedem Näpfchen gezählt. Für jedes Transformationskonstrukt wird die Anzahl Zysten pro Linie berechnet, um die durchschnittliche Zystenanzahl und den Standardfehler für das Konstrukt zu bestimmen.

[0068] Die Zystenzahlwerte für jedes Transformationskonstrukt werden mit den Zystenzahlwerten einer parallel getesteten Leervektorkontrolle verglichen, um zu bestimmen, ob das Testkonstrukt zu einer verringerten Zystenzahl führt. Für jedes Expressionskonstrukt werden zwei unabhängige biologisch wiederholte Versuche durchgeführt. Die mit den Vektoren RTP1114-1, RTP1116-3, RTP1117-1, RTP1118-1 und RTP1120-4 transformierten bewurzelten Explantatkulturen zeigten verglichen mit der bekannten anfälligen Sorte Williams82 einen allgemeinen Trend für reduzierte Zystenzahlen und Female Index.

ZUSAMMENFASSUNG

[0069] Die Erfindung stellt nematodenresistente transgene Pflanzen und Samen, umfassend Polynukleotide, die für *Medicago truncatula*-Cystein-Cluster-Proteine codieren, die in den jeweiligen reifen Peptiden maximal vier Cysteinreste umfassen, bereit. Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegen den Sojabohnenzystennematoden und Expressionsvektoren für die Verwendung in solchen Verfahren bereit.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- US 5589622 [0010]
- US 5824876 [0010]
- US 6121436 [0014]
- US 6316407 [0014]
- US 6916970 [0014]
- US 6911577 [0015, 0015]
- US 7396980 [0015, 0015]
- WO 96/30530 [0051]
- US 5352605 [0051]
- US 5955646 [0051]
- US 6051753 [0051]
- US 5641876 [0051]
- US 4962028 [0051]
- US 5608152 [0053]
- WO 98/45461 [0053]
- US 5504200 [0053]
- WO 91/13980 [0053]
- WO 95/15389 [0053]
- WO 95/23230 [0053]
- WO 99/16890 [0053]
- US 20030131377 [0053]
- US 11/075113 [0053]
- US 20040216189 [0053]
- WO 95/19443 [0054]
- WO 93/21334 [0054]
- US 5187267 [0054]
- WO 96/12814 [0054]
- EP 375091 [0054]
- EP 2008/051328 [0055]
- EP 2007/051378 [0055]
- EP 2007/064356 [0055]
- EP 2007/063761 [0055]
- EP 2008/051329 [0055]
- US 4536475 [0058]
- EP 0116718 [0059]
- EP 0067553 [0059]
- US 4407956 [0059]
- WO 95/34668 [0059]
- WO 93/03161 [0059]
- EP 0270356 [0059]
- WO 85/01856 [0059]
- US 4684611 [0059]
- US 5451513 [0061]
- US 5545817 [0061]
- US 5545818 [0061]
- US 5877462 [0061]
- WO 95/16783 [0061]
- WO 97/32977 [0061]
- WO 03/102198 [0065, 0065]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Gao, et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18, 1307 [0014]
- Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443–453 [0024]
- Needleman, S. B. und Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443–453 [0025]
- Index of Plant Diseases in the United States (U. S. Dept. of Agriculture Handbook Nr. 165, 1960) [0044]
- Distribution of Plant-Parasitic Nematode Species in North America (Society of Nematologists, 1985) [0044]
- Fungi an Plants and Plant Products in the United States (American Phytopathological Society, 1989) [0044]
- Franck et al., Cell 21: 285–294, 1980 [0051]
- An G. et al., The Plant Cell 3: 225–233, 1990 [0051]
- Christensen et al., Plant Mol. Biol. 12: 619–632, 1992 und 18: 581–8, 1991 [0051]
- Velten et al., EMBO J. 3: 2723–30, 1984 [0051]
- Lepetit et al., Mol Gen. Genet 231: 276–85, 1992 [0051]
- Baeumlein et al., Mol Gen Genet. 225(3): 459–67, 1991 [0053]
- LeB4; Baeumlein et al., Plant Journal, 2(2): 233–9, 1992 [0053]
- Taniguchi et. al., Plant Cell Physiol. 41(1): 42–48, 2000 [0053]
- Gatz et al., Plant J. 2: 397–404, 1992 [0054]
- Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22: 361–366, 1993 [0054]
- Busk et. al., Plant J. 11: 1285–1295, 1997 [0054]
- Kirch, Plant Mol. Biol. 33: 897–909, 1997 [0054]
- Yamaguchi-Shinozalei et. al., Mol. Gen. Genet. 236: 331–340, 1993 [0054]
- Genbank-Eintrag Nr. U01377 [0054]
- Genbank-Eintrag Nr. AJ310994 [0054]
- U63993 [0054]
- Genbank-Eintrag Nr. AF031235 [0054]
- Genbank-Eintrag Nr. D26563 [0054]
- Genbank-Eintrag Nr. U01377 [0054]
- (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71–119 (1993) [0057]

- White F. F. (1993) Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; Transgenic Plants, Band 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und Wu R., Academic Press, 15-38 [0057]
- Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer; Transgenic Plants, Band 1, Engineering and Utilization, Hrsg.: Kung und R. Wu, Academic Press, S. 128–143 [0057]
- Potrykus (1991) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42: 205–225; Halford N. G., Shewry P. R. (2000) Br Med Bull 56(1): 62–73 [0057]
- Fromm M. E. et al., Bio/Technology. 8(9): 833–9, 1990 [0058]
- Gordon-Kamm et al. Plant Cell 2: 603, 1990 [0058]
- Horsch, R. B. et al. (1985) Science 225: 1229 [0059]
- White F. F., Vectors for Gene Transfer in Higher Plants, Transgenic Plants, Band 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S. D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38 [0059]
- Jenes B et al. Techniques for Gene Transfer, Transgenic Plants, Band 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 128–143 [0059]
- Potrykus (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42: 205–225 [0059]
- McBride et al. (1994) PNAS 91, 7301–7305 [0061]
- Sathasivan et al., Plant Phys. 97: 1044–50, 1991 [0065]
- USSN 12/001,234 [0066]

Patentansprüche

1. Transgene Pflanze, die mit einem Expressionsvektor, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, transformiert ist.

2. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, wobei das isolierte Polynukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einem Polynukleotid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 oder 17; und
- b) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 codiert.

3. Pflanze nach Anspruch 1, wobei die Pflanze aus der Gruppe bestehend aus Mais, Sojabohne, Kartoffel, Baumwolle, Raps und Weizen ausgewählt ist.

4. Samen, der in Bezug auf mindestens ein Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält, reinerbig ist.

5. Samen nach Anspruch 1, wobei das isolierte Polynukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- c) einem Polynukleotid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 oder 17; und
- d) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 codiert.

6. Expressionsvektor, umfassend einen Promoter in operativer Verknüpfung mit einem isolierten Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält.

7. Expressionsvektor nach Anspruch 6, wobei das isolierte Polynukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einem Polynukleotid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 oder 17; und
- b) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 codiert.

8. Verfahren zur Herstellung einer nematodenresistenten transgenen Pflanze, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einem Expressionsvektor, umfassend ein isoliertes Polynukleotid, das für mindestens ein *M. trunculata*-Gen codiert, das für ein reifes CCP-Peptid codiert, das maximal vier Cysteinreste enthält;
- b) Erzeugen von transgenen Pflanzen aus der transformierten Pflanzenzelle die transgene Pflanze; und
- c) Selektieren von transgenen Pflanzen mit erhöhter Nematodenresistenz.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Polynukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- i) einem Polynukleotid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 oder 17; und
- ii) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 oder 18 codiert.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen