

(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **275 882 A5**

4(51) C 12 N 15/00
A 01 H 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 N / 321 731 4	(22)	11.11.88	(44)	07.02.90
(31)	P3738657.3	(32)	13.11.87	(33)	DE
(71)	siehe (73)				
(72)	Meyer, Peter, Dr. Dipl.-Biol.; Heidmann, Iris; Saedler, Heinz, Prof. Dipl.-Biol.; Forkmann, Gert, Dr. Dipl.-Biol., DE				
(73)	Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V., Göttingen, DE				
(74)	Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe				

(55) Gentechnologie, Pflanzen, modifizierte Blütenfarbe, Dihydrokaempferol, Dihydroflavonol-4-Reduktase
 (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe. Das Verfahren ist gekennzeichnet dadurch, daß man in eine natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigte Pflanze gentechnologisch eine DNA-Sequenz einbringt, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Pflanzen zur Züchtung von Pflanzen und Pflanzenteilen mit modifizierter Blütenfarbe.

Erfindungsansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe, **gekennzeichnet** dadurch, daß man in eine natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigte Pflanze gentechnologisch eine DNA-Sequenz einbringt, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet** dadurch, daß die DNA-Sequenz aus einer pelargonidinproduzierenden Pflanze, wie *Zea mays* oder *Antirrhinum majus*, stammt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **gekennzeichnet** dadurch, daß die natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigte Pflanze zur Gattung *Petunia hybrida* gehört.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **gekennzeichnet** dadurch, daß die Pflanze der Gattung *Petunia hybrida* einen genetischen Defekt aufweist, aufgrund dessen die zur Erzeugung von Dihydroquercetin und Dihydromyricetin erforderlichen 3'- und 3',5'-Hydroxylasen im wesentlichen fehlen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **gekennzeichnet** dadurch, daß die DNA-Sequenz in einen Vektor inseriert ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **gekennzeichnet** dadurch, daß die in den Vektor inserierte DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines in der Pflanze aktiven Promotors steht.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **gekennzeichnet** dadurch, daß der Vektor einen selektierbaren Marker, vorzugsweise ein Kanamycin-Resistenz-Gen, aufweist.
8. Verfahren nach Anspruch 5 bis 7, **gekennzeichnet** dadurch, daß der rekombinante Vektor p35Al (DSM 4275) ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **gekennzeichnet** dadurch, daß man die DNA-Sequenz durch Mikroinjektion, Elektroporation, Transformation oder mit dem Ti-Plasmid-System in Protoplasten, Zellen oder Gewebe der Pflanzen einbringt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **gekennzeichnet** dadurch, daß man die DNA-Sequenz in Protoplasten der Pflanze einbringt, die in M-Phase synchronisiert worden sind.
11. Verwendung einer transgenen, natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigten Pflanze, die eine gentechnologisch eingebrachte DNA-Sequenz enthält, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert, **gekennzeichnet** dadurch, daß sie zur Züchtung von Pflanzen und Pflanzenteilen mit modifizierter Blütenfarbe eingesetzt wird.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Anwendung der vorliegenden Erfindung erfolgt auf dem Gebiet der Züchtung genetisch manipulierter Pflanzen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Blütenfarbe von Pflanzen wird durch von der Pflanze synthetisierte Farbstoffe verursacht. Bekanntlich besteht eine große Nachfrage nach Pflanzen mit neuen Blütenfarben. Bisher wurde diese Nachfrage dadurch zu befriedigen versucht, daß man durch Kreuzung Pflanzen mit neuen Blütenfarben züchtete. Die derartige „klassische“ Neuzüchtung von Pflanzen war jedoch durch die genetischen Kompatibilitätsgrenzen der einzelnen zur Kreuzung verwendeten Pflanzenarten beschränkt.

Beispielsweise konnten mit diesen Methoden keine lachsroten Petunien (*Petunia hybrida*) gezüchtet werden, da die genetische Information für das Schlüsselenzym des Syntheseweges des entsprechenden Farbstoffes bei Petunienarten nicht vorkommt. Aus anderen Pflanzenarten, die über diese genetische Information verfügen, z.B. aus Mais (*Zea mays*) oder Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) kann sie nicht in *Petunia hybrida* eingekreuzt werden. *Petunia hybrida* und *Zea mays* bzw. *Antirrhinum majus* sind genetisch inkompatibel.

Auch bestand im Stand der Technik die Auffassung, daß selbst wenn es gelingen würde, Gene aus monokotylen Pflanzen, wie *Zea mays*, in dikotyle Pflanzen, wie *Petunia hybrida*, einzubringen, diese nicht mehr aktiv sein würden.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten konnte die Nachfrage nach Pflanzen mit neuen Blütenfarben bisher nur im beschränkten Umfang befriedigt werden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe bereitzustellen, die eine gentechnologisch eingebrachte DNA-Sequenz enthalten, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert. Es ist auch Ziel der Erfindung, rekombinante DNA-Moleküle bereitzustellen, die bei der gentechnologischen Herstellung der genannten Pflanzen verwendet werden können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein gentechnologisches Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe, gekennzeichnet dadurch, daß man in eine natürliche nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigte Pflanze gentechnologisch eine DNA-Sequenz einbringt, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß die DNA-Sequenz aus einer pelargonidinproduzierenden Pflanze, wie *Zea mays* oder *Antirrhinum majus*, stammt.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß die natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigte Pflanze zur Gattung *Petunia hybrida* gehört.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß die Pflanze der Gattung *Petunia hybrida* einen genetischen Defekt aufweist, aufgrund dessen die zur Erzeugung von Dihydroquercetin und Dihydromyricetin erforderlichen 3'- und 3',5'-Hydroxylasen im wesentlichen fehlen.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß die DNA-Sequenz in einen Vektor inseriert ist.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß die in den Vektor inserierte DNA-Sequenz unter der Kontrolle eines in der Pflanze aktiven Promotors steht.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß der Vektor einen selektierbaren Marker, vorzugsweise ein Kanamycin-Resistenz-Gen, aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß der rekombinante Vektor p35A1 (DSM 4275) ist.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß man die DNA-Sequenz durch Mikroinjektion, Elektroporation, Transformation oder mit dem Ti-Plasmid-System in Protoplasten, Zellen oder Geweben der Pflanze einbringt.

Gegenstand der Erfindung ist auch das genannte Verfahren mit der Besonderheit, daß man die DNA-Sequenz in Protoplasten der Pflanze einbringt, die in M-Phase synchronisiert worden sind.

Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung einer transgenen, natürlich nicht zur Reduktion von Dihydrokaempferol befähigten Pflanze, die eine gentechnologisch eingebrachte DNA-Sequenz enthält, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase (DFR) mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert, zur Züchtung von Pflanzen und Pflanzenteilen mit modifizierter Blütenfarbe.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Vektor p35A1

Fig. 2: links: Aufgrund der in Spuren enthaltenden Cyanidin- und Delphinidin-Derivate weist die Mutante RL01 eine blaßrosa Blütenfarbe auf.

rechts: Die Transformante RP235-15 trägt das A1-Gen aus *Zea mays*, in Form einer cDNA. Dieses Gen befähigt sie, Pelargonidin-3-Glycosid zu synthetisieren. Daher weist sie eine lachsrote Blütenfarbe auf.

Fig. 3: Transkription des A1-Gens aus *Zea mays* in transgenen *Petunia hybrida*-Pflanzen. Die Transformante RP235-15 weist einen starken mRNA-Gehalt des A1-Gens aus *Zea mays* auf (Bahn 1). In der Transformante RP235-12, die eine unveränderte Blütenfarbe hat, liegen keine Transkripte des A1-Gens vor (Bahn 2). Auch die nicht transformierte Mutante RL01 weist keine Transkripte des A1-Gens auf (Bahn 3) (Kontrolle).

Fig. 4: Schematische Darstellung eines Ausschnittes der Anthocyan-Biosynthese.

Erfindungsgemäß werden die Pflanzen mit modifizierter Blütenfarbe dadurch konstruiert, daß man gentechnologisch in die Pflanze eine DNA-Sequenz einbringt, die für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol codiert (nachfolgend kurz als DFR, in der Literatur oft auch als DOR bezeichnet).

Der Ausdruck „Protein mit der enzymatischen Aktivität einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit erweiterter Substratspezifität für Dihydrokaempferol“ bezeichnet ein Protein, das einem in der Natur vorkommenden Enzym mit der genannten Spezifität entspricht, aber auch Proteine, die nicht natürlich vorkommen und die genannte Spezifität aufweisen. Beispiele sind Fusionsproteine oder Proteine, die nur einen enzymatisch aktiven Teilbereich des natürlich vorkommenden Enzyms enthalten. Wenn die neu eingebrachte genetische Information in den Zellen der Pflanze unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors steht, dann wird sie exprimiert. Dabei wird das Enzym DFR in den Zellen synthetisiert.

Sofern in den Zellen als Zwischenprodukt der Anthocyanbiosynthese Dihydrokaempferol anfällt, wird dies vom synthetisierten Enzym DFR zu Leucopelargonidin reduziert; vgl. Fig. 4. Die ohnehin in den Zellen vorliegenden weiteren Enzyme modifizieren das Leucopelargonidin zu lachsroten Anthocyan-Farbstoff-Pelargonidin-3-Glycosiden.

Spenderpflanzen, aus denen das DFR-Gen isoliert werden kann, sind dem Fachmann bekannt. Beispiele sind pelargonidinproduzierende Pflanzen, wie *Zea mays*, *Antirrhinum majus*, *Matthiola incana* (Levkoje) oder *Calistephus chinensis* (Aster).

Außerdem sind dem Fachmann Akzeptorpflanzen bekannt, bei denen zwar Dihydrokaempferol im Anthocyanbiosyntheseweg anfällt, jedoch mangels einer Dihydroflavonol-4-Reduktase mit Substratspezifität für Dihydrokaempferol nicht zu Leucopelargonidin umgesetzt werden kann. Beispiele sind *Petunia hybrida* oder *Nicotiana glauca* (Ziertrabak). In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden als DFR-DNA-Spenderpflanze die pelargonidinproduzierenden Pflanzen *Zea mays* (monokotyl) oder *Antirrhinum majus* und als DFR-DNA-Akzeptorpflanze *Petunia hybrida* (dikotyl) verwendet.

In *Zea mays* wird das Enzym DFR vom A1-Gen codiert. Im Aleuron von *Zea mays* wird von diesem Enzym Dihydroquercetin in Leucocyanidin umgesetzt und Dihydrokaempferol zu Leucopelargonidin, wodurch die Bildung von Cyanidin-Derivaten und von Pelargonidin-Derivaten eingeleitet wird. Diese Dihydroflavonol-4-Reduktase aus *Zea mays* weist eine erweiterte Substratspezifität für Dihydrokaempferol auf.

Erfindungsgemäß lassen sich gentechnologisch mit der DFR-DNA aus *Zea mays* Varianten von *Petunia hybrida* konstruieren, die eine lachsrote Blütenfarbe aufweisen, weil sie mit Hilfe der gentechnologisch eingebrachten DFR-DNA aus *Zea mays* den lachsroten Anthocyan-Farbstoff Pelargonidin-3-Glycosid synthetisieren können.

Derartige Varianten von *Petunia hybrida* waren bisher nicht bekannt. Diese beruhte darauf, daß die in *Petunien* üblicherweise vorkommende Dihydroflavonol-4-Reduktase zwar mit verhältnismäßig hoher Effizienz Dihydromyricetin und mit niedrigerer Effizienz Dihydroquercetin umsetzt, jedoch kein Dihydrokaempferol umsetzen kann; vgl. Fig. 4. Diesem natürlich in *Petunia hybrida* vorkommenden Enzym fehlt also die Substratspezifität für Dihydrokaempferol. Deshalb sind die in *Petunien* natürlich vorkommenden Anthocyan-Farbstoffe lediglich Delphinidin-Derivate (dunkelblau) bzw. Cyanidin-Derivate (blaurot); vgl. Fig. 4. Zu diesen Derivaten gehören beispielsweise Glycoside.

In einer erfindungsgemäß bevorzugten Ausführungsform wird als Akzeptorpflanze eine Mutante von *Petunia hybrida* verwendet, die eine genetische Defizienz für die Aktivität der 3'- und 3',5'-Hydroxylasen aufweist; vgl. die in Fig. 4 als Ht 1 bzw. als Hf 1 und Hf 2 bezeichneten Enzyme.

Aufgrund dieser Defizienz werden bei dieser Pflanze Dihydrokaempferol und Kaempferol akkumuliert, da diese Verbindungen nicht in der Anthocyanbiosynthese zu Dihydroquercetin und Dihydromyricetin umgesetzt werden; vgl. Fig. 4. Somit fehlen der Pflanze die ausgehend von diesen Zwischenprodukten synthetisierten Anthocyan-Farbstoffe, nämlich Cyanidin-Derivate (blaurot) und Delphinidin-Derivate (dunkelblau). Ihre Blütenfarbe ist deshalb im wesentlichen weiß bzw. blaßrosa.

Die Herstellung derartiger Defektmutanten ist dem Fachmann bekannt. Ein Beispiel, die Mutante RL01, wird von G. Stotz in Theor. Appl. Genet. 70 (1985), S. 300-305, beschrieben. Diese Mutante aus der *Petunia hybrida*-Sammlung in Tübingen ist ein Derivat der Linie R4, die früher für genetische und enzymatische Untersuchungen der B-Ring-Hydroxylierung und der Flavonolbildung verwendet wurde. Da die Mutante RL01 rezessive Allele an den Ht 1- und Hf 1-Loci enthält, weist sie keine Flavonoid-3'-Hydroxylaseaktivität und nur eine geringe Flavonoid-3',5'-Hydroxylaseaktivität auf. Aufgrund dessen werden in dieser Pflanze Cyanidin-Derivate und Delphinidin-Derivate nur in geringen Mengen hergestellt. Daher hat sie eine blaßrosa Blütenfarbe. Anthocyan-Farbstoffe des Pelargonidin-Typs werden von dieser Mutante nicht synthetisiert. Wie bereits vorstehend erläutert, wird Dihydrokaempferol aufgrund der oben erläuterten genetischen Defekte und aufgrund der Unfähigkeit, Dihydrokaempferol zu Leucopelargonidin umzusetzen, akkumuliert; vgl. Fig. 4. Wenn der Mutante RL01 das Anthocyan-Synthese-Zwischenprodukt Leucopelargonidin in üblicher Weise angeboten wird, wird dies zu Pelargonidin-3-Glycosid umgesetzt und die Blütenblätter färben sich lachsrot; vgl. Fig. 4. Daraus folgt, daß alle anderen Gene der Anthocyan-Synthese durch dominante Allele repräsentiert werden. Die Mutante RL01 weist somit lediglich einen Defekt in den für die Hydroxylierung von Dihydrokaempferol verantwortlichen Enzymen auf.

Wenn in die vorstehend erläuterten Mutanten von *Petunia hybrida*, beispielsweise in die Mutante RL01, erfindungsgemäß das DFR-Gen eingebracht wird, dann wird die Blütenfarbe zu einem Lachsrot modifiziert, das häufig die *Petunia-hybrida*-typische Blütenzeichnungen aufweist; vgl. Fig. 2.

Die gentechnologische Einführung der die DFR codierenden DNA-Sequenz läßt sich nach üblichen Techniken bewerkstelligen, beispielsweise durch Mikroinjektion (A. de la Pena, H. Lörz & J. Schell, Nature 325 [1987], Seiten 274-276), Elektroporation (M. E. Fromm, L. P. Taylor & V. Walbot, Nature 319 [1986], Seiten 791-793), Transformation (F. A. Krens, L. Molendijk, G. J. Willems, R. A. Schilperoort, Nature 296 [1982], Seiten 72-74), Transfer von entsprechenden Ti-Plasmiden (L. Marton, G. J. Willems, L. Molendijk, R. A. Schilperoort, Nature 227 [1979], Seiten 129-131) und durch liposomenvermittelten Transfer (R. T. Fraley, Plant Mol. Biology 2, Seiten 5 ff.).

Für das Einbringen der DNA sind übliche Vektoren, beispielsweise das Ti-Plasmid, geeignet.

Derartige Vektorsysteme sind erläutert in L. Herrera Estrella et al., Nature 303 (1983), 209; L. Herrera Estrella et al., EMBO J. 2 (1983), 987; J. P. Hernalsteens et al., Nature 287 (1980), 654 und in R. T. Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 4803.

Außerdem wird das Ti-Plasmid-System beispielsweise in EP-A 1-0116718 beschrieben.

Vorzugsweise wird die DNA-Sequenz in Protoplasten der Akzeptorpflanze eingebracht, die in M-Phase synchronisiert wurden. Diese Transformationstechnik wird von P. Meyer et al. in Mol. Gen. Genet. 201 (1985), S. 513-528, beschrieben.

Je nach verwendetem Vektorsystem läßt sich die DNA-Sequenz neben Protoplasten auch in Zellen und Gewebe der Pflanze einbringen.

Vorzugsweise wird der rekombinante Vektor p35A1 verwendet. Unter der Kontrolle des in diesem Vektor enthaltenen 35S-Promotors aus CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) wird das in Form der cDNA klonierte A1-Gen aus *Zea mays* konstitutiv exprimiert. Ferner wird mit diesem Vektor neben DFR-Gen gleichzeitig ein Kanamycin-Resistenz-Gen auf die Pflanze übertragen, so daß mit dem Vektor transformierte Pflanzen leicht aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz selektiert werden können.

Ergänzende Erläuterungen der DNA-Rekombinations-Techniken finden sich in Maniatis et al., „Molecular Cloning“, CSH Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Konstruktion des Vektors p35A1

Die Isolierung einer cDNA-Sequenz des A1-Gens und insbesondere die des Typs 2-A1-Gens aus *Zea mays* wird von Z. Schwarz-Sommer et al. in EMBO J. 2 (1987), S. 287–294, beschrieben.

Zunächst werden in einem 1320bp EcoRI-Fragment des vollständigen cDNA-Clons eines Typs 2-A1-Gens von *Zea mays* die EcoRI-Restriktionsspaltstellen aufgefüllt und XbaI-Linker wurden angehängt, die die EcoRI-Restriktionsspaltstellen rekonstituieren.

Das erhaltene XbaI-Fragment wird in die einzige XbaI-Restriktionsspaltstelle des Plasmids pCKan1 eingesetzt. Damit befindet es sich in diesem Plasmid zwischen dem 35S-Promotor und der Terminations-Sequenz von CaMV (Cauliflower Mosaic Virus). Das große EcoRI-Fragment des Plasmids pCKan1 wurde ursprünglich vom Plasmid pLGV11 abgeleitet, das ein Kanamycin-Resistenz-Gen trägt. Deshalb können die mit dem Plasmid pCKan1 transformierten Pflanzenzellen aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz selektiert werden. Das Plasmid pLGV11 entspricht dem Plasmid pLGV1103, in dem das Sall-Fragment Tn903 deletiert wurde (R. Hain et al., Plant Cell Rep. 2 [1983], S. 244–247).

Das bei dieser Konstruktion erhaltene Plasmid ist das Plasmid p35A1; vgl. Fig. 1. Es wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen am 14. Oktober 1987 unter der Hinterlegungsnummer DSM 4275 hinterlegt.

Beispiel 2

Konstruktion einer *Petunia hybrida* mit lachsroter Blütenfarbe

In M-Phase synchronisierte Protoplasten der *Petunia hybrida*-Mutante RL01 werden mit dem Plasmid p35A1 aus Beispiel 1 nach Meyer et al., a. a. O., transformiert.

Nach der Transformation werden Mikrocalli herangezogen und in einer Bead-Type-Kultur in V47-Medium mit auf 100 mosm pro Woche reduzierter Osmolarität selektiert (R. D. Shillito et al., Plant Cell Rep. 2 [1983], S. 244–247; H. Binding, Z. Pflanz. physiol. 74 [1974], S. 327–356). Kanamycinresistente Mikrocalli werden in Regenerierungs-Medium überführt, sobald sie einen Durchmesser von 3–5 mm erreicht haben. Sie werden drei Wochen auf Re27/6-Medium (MS-Medium) mit 2 mg/l BAP (Benzylaminopurin) und 2 mg/l IAA (Indoleessigsäure) (T. Murashige, Physiol. Plant. 15 [1962] S. 473–497) und dann auf Re17/3-Medium transferiert (MS-Medium mit 1 mg/l BAP und 1 mg/l IAA). Die Sprosse werden auf MS-Medium ohne Hormone bewurzelt. Alle Medien enthalten 50 mg/l Kanamycin.

Von den überlebenden Calli exprimieren 2% das vom Plasmid p35A1 codierte Kanamycin-Resistenz-Gen und sind deshalb kanamycinresistent. Aus jedem transformierten Callus werden zwei Pflanzen regeneriert.

Von den ersten 15 blühenden Transformanten zeigen zwei eine lachsrote Blütenfarbe bei beiden regenerierten Pflanzen; vgl. Fig. 2, rechts. Das Auftreten des für diese lachsrote Blütenfarbe verantwortliche Pelargonidin-Farbstoffes korreliert mit der Transkription der A1-cDNA aus *Zea mays*. Diese wurde mit dem Plasmid p35A1, in dem sie unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV steht, übertragen. Die Transkription wird durch mRNA-Extraktion aus den Blättern nach J. Logemann gezeigt (Analytical Biochemistry 163 [1987], S. 16–20). Dabei wird Hybond[®]-mAP (Amersham) nach den Anweisungen des Herstellers verwendet. Durch Hybridisierung mit einem EcoRI-XbaI-Restriktionsfragment der A1-cDNA als Sondenmolekül wird die aus den Blättern isolierte A1-mRNA in einem Northern Blot sichtbar gemacht (A. P. Feinberg et al., Anal. Biochem. 132 [1983], S. 6–13 und 137 [1983], 266–267); vgl. Fig. 3.

Die Transformante RP235-15, die eine einheitliche lachsrote Färbung der Blüte aufweist und bei der die Transkription des A1-Gens eindeutig nachgewiesen werden konnte, wird zur Flavonoid-Analyse verwendet. Dabei wird sie mit der Mutante RL01 verglichen. Die Analyse erfolgt nach Standardmethoden (J. B. Harborne „Comparative Biochemistry of the Flavonoids“, Academic Press, London and New York [1967]).

Sowohl in der Mutante RL01 als auch in der Transformante RP235-15 sind geringe Mengen Cyanidin-3-Glycosid, Cyanidin-3-Glycosylglycosid und Delphinidin-3-Glycosid enthalten. Jedoch sind nur in der Transformante RP235-15 darüber hinaus Pelargonidin-3-Glycosid und Pelargonidin-3-Glycosylglycosid in großen Mengen enthalten. Bei der Transformante RP235-15 ist das spektroskopische Anthocyan-Maximum gegenüber der Mutante RL01 von 528 nm auf 512 nm verschoben. Außerdem sind in der Transformante RP235-15 Dihydrokaempferol gar nicht und Kaempferol nur in Spuren nachweisbar. Wie bereits vorstehend erläutert, werden diese Substanzen in der Mutante RL01 akkumuliert.

Aus dieser Analyse ergibt sich, daß mit Hilfe des Expressionsprodukts des in die Transformante RP235-15 eingebrachten A1-Gens aus *Zea mays* ein neuer Biosyntheseweg in *Petunia hybrida* geschaffen wurde. Bemerkenswerterweise wurde dieser neue Biosyntheseweg in der dikotylen Pflanze *Petunia hybrida* mit Hilfe der cDNA eines Gens aus der monokotylen Pflanze *Zea mays* geschaffen.

Außerdem stellt das mit dem Vektor p35A1 eingebrachte A1-Gen einen leicht erkennbaren Marker der Mutante RL01 dar. Wenn dieser Marker vorhanden ist, dann verändert sich die Blütenfarbe von blaßrosa nach lachsrot. Somit ist phänotypisch mit freiem Auge erkennbar, ob die Transformation mit dem Vektor p35A1 erfolgreich war.

-5-

Fig. 1

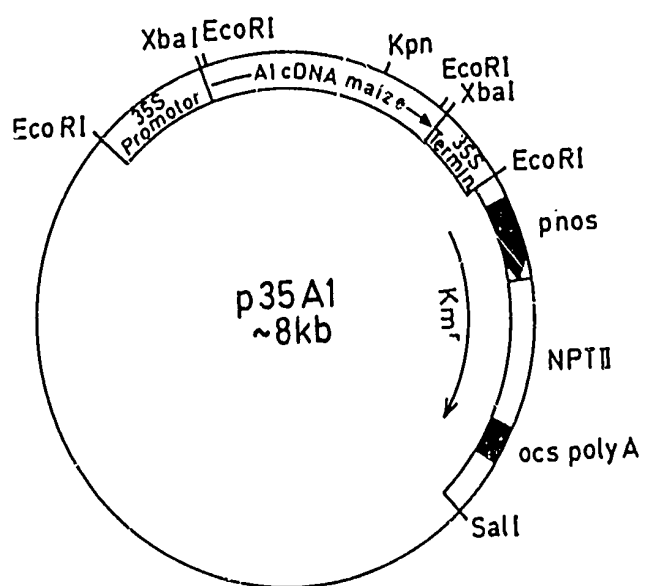


Fig. 2

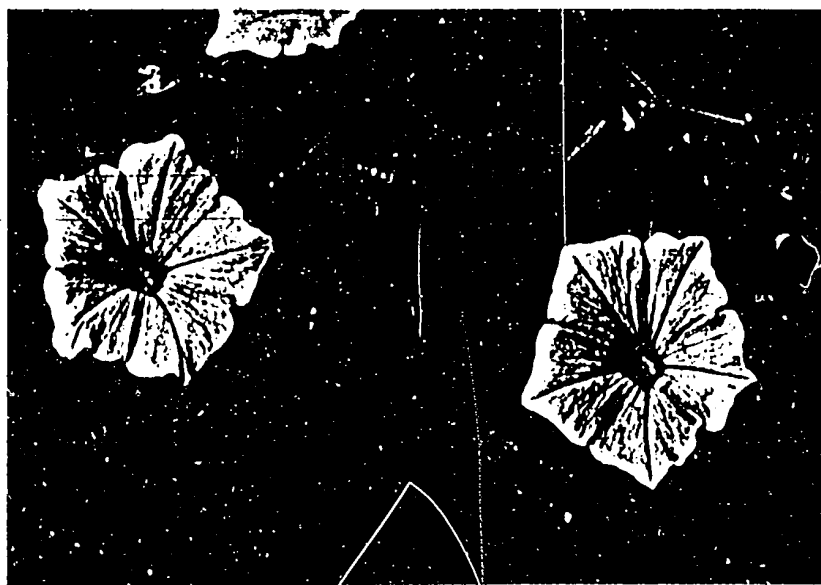
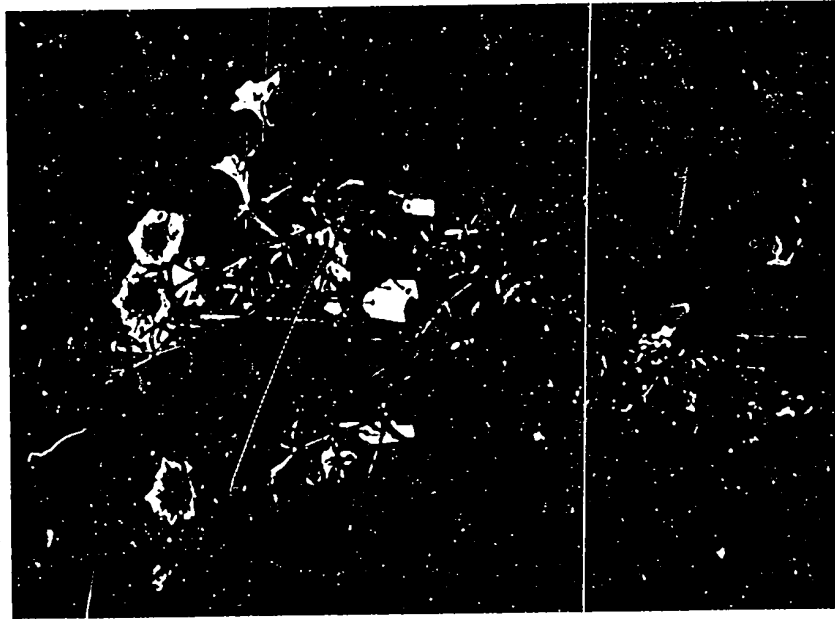


Fig. 3

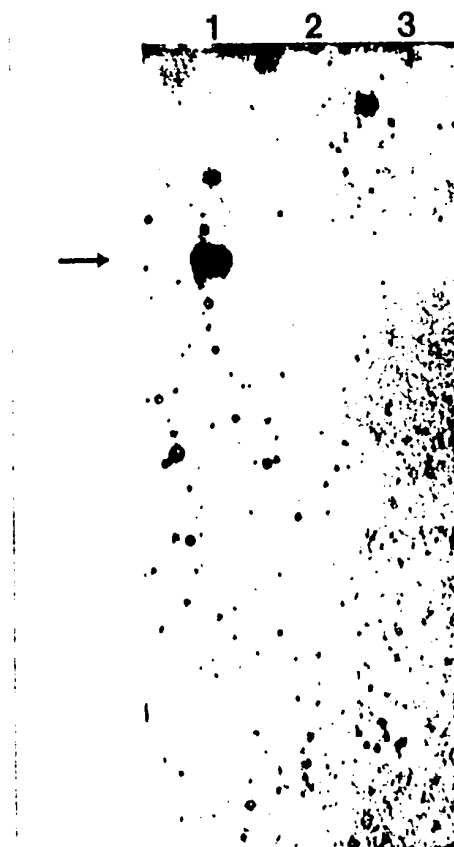


Fig. 4

