

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: **A 1342/2009**

(22) Anmeldetag: **26.08.2009**

(43) Veröffentlicht am: **15.02.2011**

(51) Int. Cl.: **C12N 15/53** (2006.01),

C12N 15/82 (2006.01),

C12N 5/14 (2006.01),

A01H 5/00 (2006.01),

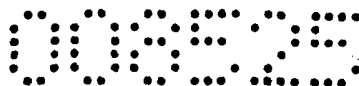
(73) Patentinhaber:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
A-1040 WIEN (AT)**

(54) **CHALKON-HYDROXYLASE**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Nucleinsäure-molekül, umfassend eine Nucleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert, wobei die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 umfasst oder mindestens 60% Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweist oder in der Lage ist mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren, wobei die Nucleotidsequenz für ein Polypeptid kodiert, welches das Motiv $FASRPLSX_1X_2G(X_3)_m(GSAGGD)_n$ umfasst, wobei X_1 Threonin oder Serin, X_2 Alanin oder Glycin, X_3 eine beliebige Aminosäure, m eine ganze Zahl zwischen 50 und 200 und n 0 oder 1 ist.

AT 508 554 A4 2011-02-15



Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert, wobei die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 umfasst oder mindestens 60% Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweist oder in der Lage ist mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren, wobei die Nukleotidsequenz für ein Polypeptid kodiert, welches das Motiv FASRPLSX₁X₂G(X₃)_m(GSAGGD)_n umfasst, wobei X₁ Threonin oder Serin, X₂ Alanin oder Glycin, X₃ eine beliebige Aminosäure, m eine ganze Zahl zwischen 50 und 200 und n 0 oder 1 ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, umfassend eine Nukleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert.

Die Blütenfarbe ist eine der auffallendsten Eigenschaften von Zierpflanzen und ist daher ein bedeutender Faktor für ihren Marktwert. Neben der traditionellen Züchtung gewinnen gentechnische Ansätze zur Schaffung neuer Sorten immer mehr an Bedeutung. Beispiele dafür sind die Erzeugung blauer Nelken sowie die der so genannten blauen Rose, welche bereits weltweit in sehr vielen Ländern kommerziell erhältlich sind.

Die Ausprägung der Blütenfarben basiert hauptsächlich auf der Anwesenheit von zwei verschiedenen Pigmentgruppen, den Carotinoiden und den Flavonoiden. Für die Bildung der roten, blauen und lila Blütenfarbe ist hauptsächlich die Flavonoidklasse der Anthocyane verantwortlich, während gelbe Blütenfarbe in den meisten Fällen durch die Akkumulation von Carotinoiden entsteht. In einigen Pflanzenarten wird die gelbe Pflanzenfarbe jedoch von gelben Flavonoiden und deren biosynthetisch verwandten anthochloren Pigmenten (Chalkone und Aurone) gebildet. Daher kann eine Modifikation des Chalkon- bzw. Flavonoidstoffwechsels entscheidend zur Veränderung von Blütenfarben beitragen. Neben der Züchtung von Pflanzen mit blauen Blüten ist die Einführung der gelben Blütenfarbe in Zierpflanzen, von denen keine oder nur vereinzelte gelbe Sorten erhältlich sind, von besonderem Interesse. Oft führen nur kleine Änderungen in der Pigmentstruktur zu drastischen Farbveränderungen. Dies gilt vor allem für die Anzahl der Hydroxylgruppen in den Grundstrukturen.

Obwohl viele Flavonoide in chemisch reiner Form eine blassgelbe Farbe aufweisen, führt ihre Anwesenheit in Petalen nicht zur Ausprägung von gelber Blütenfarbe. Die sogenannten „gelben Flavonole“ weisen neben dem gewöhnlichen 5,7-Hydroxylierungsmuster des A-Rings eine zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 6 oder 8 auf, die eine Absorptionsverschiebung in den längerwelligen Bereich und damit eine Verstärkung der gelben Farbe bewirkt. Die Anwesenheit solcher höher hydroxylierten Verbindungen führt zur Ausprägung gelber Blütenfarbe. Quercetagetin wurde zuerst als gelbes Pigment in verschiedenen Tagetes-Arten identifiziert und kommt auch in den Blüten von *Rudbeckia hirta* vor.

Gelbe Flavone stellen die Hauptpigmente in einigen Blüten

von Asteraceae dar. Während die gewöhnlichen verbreiteten Flavone nicht zur Ausprägung von gelben Blütenfarben führen, bewirkt die Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an der Position 2' des B-Rings von Luteolin eine Gelbfärbung des Pigments. Isoetin (2'-Hydroxyluteolin) wurde als gelbes Hauptpigment von *Heywoodiella oligocephala* identifiziert. Die Einführung einer Hydroxylase, welche die 2'-Hydroxylierung katalysiert, könnte zur Bildung von gelb gefärbten Flavonen in den Blüten transgener Pflanzen führen, die generell nur gewöhnliche Flavone produzieren.

Im Gegensatz zu den gelben Flavonolen, bei denen die Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe zur Ausprägung gelber Blütenfarbe führt, ist der Verlust einer Hydroxylgruppe an der Position 3 von Anthocyanen bzw. Anthocyanidinen für eine Verschiebung der Absorption in den kürzerwelligen Bereich und damit für die orange und gelbe Farbe der sogenannten 3-Deoxyanthocyane verantwortlich. 3-Deoxyanthocyane sind seltene pflanzliche Pigmente, die als solche nur in einigen wenigen Pflanzen wie Gesneriaceen, *Zea mays* (Mais) und in *Sorghum*-Arten (Hirse) vorkommen. Drei Vertreter dieser Gruppe konnten identifiziert werden, Apigeninidin (3-Deoxypelargonidin), Luteolinidin (3-Deoxycyanidin) und Columnidin. Von diesen tragen jedoch nur Apigeninidin-Derivate zur gelben Blütenfarbe bei. Die anderen weisen eine orange- bis hellrote Färbung auf. Die biochemische Bildung der Flavan-4-ole als Vorläufer für die 3-Deoxyanthocyane wird durch die Reduktion der Carbonylgruppe der Flavanone an Position 4 bedingt. Diese Reaktion wird in einer großen Anzahl von Kultur- und Zierpflanzen durch die Dihydroflavonol-4-Reduktase katalysiert, findet aber gewöhnlich nur in Pflanzen statt, in denen die FHT-Reaktion gehemmt ist.

Die tiefgelben anthochloren Pigmente (Chalkone und Aurone) haben in der Natur nur eine beschränkte Verbreitung, kommen jedoch häufig in Asteraceae- oder Scrophulariaceae-Arten vor. Generell können zwei Arten von Chalkonen in den Blüten synthetisiert werden, die 6'-Hydroxychalkone (Phloroglucinoltyp) und die 6'-Deoxychalkone (Resorcinoltyp). Die entsprechenden Aurone sind die 4-Hydroxy- und die 4-Deoxyaurone (identische Position, unterschiedliche Nummerierung der Ringe). 6'-Deoxychalkone werden durch die Chalkonsynthese zusammen mit der Chalkonketidreduktase (CHKR, synonym Polyketidreduktase, PKR, Chalcone reductase) über

ein Polyketid-Intermediat gebildet.

Chalkone sind pflanzliche Sekundärmetabolite und biochemische Vorläufer für alle Flavonoidklassen. Deshalb und aufgrund ihrer physiologischen Funktionen in Pflanzen, wie z.B. die Beeinflussung der Blütenfarbe, spielen sie eine wichtige Rolle in der Pflanzenphysiologie. Neben den gewöhnlichen 6'-Hydroxychalkonen, welche Intermediate der Biosynthese der weit verbreiteten 5-Hydroxyflavonoide darstellen, werden die selteneren 6'-Deoxychalkone häufig in Blüten von Asteraceen-Arten akkumuliert, da sie chemisch nicht zu den jeweiligen 5-Deoxyflavanonen umgesetzt werden können und auch von den Chalkonisomerasen (CHIs) der meisten Pflanzen nicht als Substrate akzeptiert werden. Die Akkumulation von 6'-Deoxychalkonen führt zur Ausprägung von gelber Blütenfarbe. 6'-Hydroxychalkone werden dagegen nur in seltenen Fällen im Pflanzengewebe akkumuliert, da sie leicht enzymatisch oder chemisch zu Flavanonen umgewandelt werden können. Daher sind sie nur in wenigen Fällen für Gelbfärbung von Blüten verantwortlich, wie in den gelben Blüten von Nelken (*Dianthus caryophyllus*), Löwenmäulchen (*Antirrhinum majus*) und Strohblumen (*Helichrysum bracteatum*), da diesen Mutanten neben der CHI zumindest eine weitere Enzymaktivität des Flavonoidstoffwechsels fehlt.

Wie die Flavonoide, können auch Chalkone im B-Ring neben der Hydroxylgruppe an der Position 4 (entspricht der Position 4' bei Flavonoiden) weitere Hydroxylgruppen besitzen, und zwar an den Positionen 3 oder 3 und 5 (entsprechend den Positionen 3' oder 3' und 5' bei den Flavonoiden). Im Gegensatz zu der sehr gut untersuchten Hydroxylierung von Flavonoiden an der Position 3' und 3',5', welche von den CytochromP450 abhängigen Monooxygenasen Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) bzw. Flavonoid-3',5'-Hydroxylase (F3',5'H) katalysiert werden, bestand für lange Zeit Unklarheit darüber, welches Enzym für die Einführung von zusätzlichen Hydroxylgruppen im B-Ring von Chalkonen verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung einer Hydroxylgruppe an der Position 3 von 6'-Deoxychalkonen durch eine Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenase katalysiert wird. Untersuchungen mit rekombinanten F3'Hs von verschiedenen Pflanzen, welche Chalkone in ihren Blütenblättern akkumulieren, als auch von solchen, die keine Chalkone akkumulieren, zeigten jedoch, dass diese F3'Hs nicht in der Lage sind, die Hydroxylierung von Chalkonen

zu katalysieren.

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei den F3'hs um membran-gebundene Cytochrom (Cyt)P450 abhängige Monooxygenasen. Die Superfamilie der CytP450 Enzyme ist eine Gruppe sehr unterschiedlicher Enzyme, welche viele verschiedene und komplexe Oxygenierungsreaktionen mit einer großen Anzahl von Substraten in Anwesenheit von NADPH oder NADH katalysieren. Sie beinhalten eine Hämgruppe und kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten vor. In Pflanzen kann eine außergewöhnlich hohe Anzahl von CytP450 Genen gefunden werden. In Arabidopsis z.B. konnten 272 CytP450 Gene detektiert werden. Die Sequenzidentitäten der CytP450 Enzyme sind oft sehr niedrig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Nukleinsäuren kodierend für Polypeptide, die in der Lage sind, Chalkone im B-Ring zu hydroxylieren, um beispielsweise die Farbgebung bei Pflanzen zu beeinflussen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert, wobei die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 umfasst oder mindestens 60% Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweist oder in der Lage ist mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren, wobei die Nukleotidsequenz für ein Polypeptid kodiert, welches das Motiv $FASRPLSX_1X_2G(X_3)_m(GSAGGD)_n$ umfasst, wobei X_1 Threonin oder Serin, X_2 Alanin oder Glycin, X_3 eine beliebige Aminosäure, m eine ganze Zahl zwischen 50 und 200 und n 0 oder 1 ist.

Es wurde erfindungsgemäß herausgefunden, dass Polypeptide, insbesondere Hydroxylasen, wie beispielsweise Flavonoid 3'-Hydroxylasen, welche ein bestimmtes Motiv (wie oben definiert) aufweisen, in der Lage sind, Chalkone an der Position 3 zu hydroxylieren. Die Kenntnis derartiger Hydroxylasen ermöglicht es die Expression dieser Hydroxylasen zu modulieren, um diese beispielsweise in vivo überzuexprimieren oder zu inhibieren. Insbesondere ermöglicht die Kenntnis dieser Enzyme die Menge an hydroxylierten Chalkonen in einer Pflanze bzw. Pflanzenzelle zu modulieren, um dadurch die Farbzusammensetzung in derselbigen zu verändern. So weisen Pflanzen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle umfassen, beispielsweise Blüten mit einer intensiven Gelbfärbung auf.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül katalysiert die Hydroxylierung von verschiedenen Chalkonen (das inkludiert beispielsweise auch 6'-Deoxychalkone und Dihydrochalkone) an der Position 3. Dies führt im Fall der 6'-Hydroxychalkone und 4-Deoxyaurone zu einer Intensivierung der Gelbfärbung durch die Anreicherung von Chalkonen mit einem 3,4-Hydroxymuster, und auch zu einer vermehrten Bildung von Auronen, da solche Chalkone auch die bevorzugten Precursor für Auron-bildende Enzyme darstellen. Im Fall der Dihydrochalkone wird die Bildung von 3-Hydroxychalkonderivaten begünstigt, die an der Pathogenabwehr beteiligt sind bzw. aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften gesundheitsfördernde Wirkung besitzen.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kann SEQ ID Nr. 1 als Nukleotidsequenz oder mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 65%, vorzugsweise mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 75%, vorzugsweise mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 85%, vorzugsweise mindestens 90%, vorzugsweise mindestens 95%, vorzugsweise mindestens 97%, vorzugsweise mindestens 98%, vorzugsweise mindestens 99%, insbesondere 100%, Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweisen.

Identität zwischen mindestens zwei Sequenzen kann durch Überlagerung durchgeführt werden, bei der eine Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz mit mindestens einer weiteren entsprechenden Sequenz übereinander gelegt werden („Alignment“). Beispielsweise nach dem Verfahren von D. J. Lipman und W. R. Pearson (Science 227 (1985), 1435-1441) oder F. Corpet (Nucl. Acids Res. 16 (1988), 10881-10890). Vorzugsweise geschieht dies über Algorithmen, welche von kommerziell erhältlichen Computerprogrammen angewendet werden. Hierzu gehört beispielsweise das Programm Vector NTi™ Suite 7.0, erhältlich von der Firma InforMax, Inc., USA, vorzugsweise mit den vorgegebenen Standard-Parametern. Eine weitere Software, mit deren Hilfe Sequenzidentität bestimmt werden kann, ist z.B. „Sequence Analysis Software Package der Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI53705“. Diese Software überlagert ähnliche Sequenzen durch Zuordnung von Homologiegraden.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ist in der Lage, mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren.

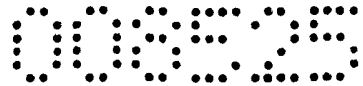
Hybridisierung bezeichnet die Bindung komplementärer Stränge von Nukleinsäuren (d.h. sense:Antisense-Stränge) miteinander durch Wasserstoffbindungen, ähnlich den Bindungen, die natürlicherweise in chromosomaler DNA vorkommen. Dabei werden Stringenzniveaus verwendet, um eine Nukleinsäure mit einer Ziel-Nukleinsäure zu hybridisieren. Diese Bedingungen können leicht durch den Fachmann variiert werden. Erfindungsgemäß hybridisiert das Nukleinsäuremolekül unter mehr oder weniger stringenten Bedingungen.

Der Ausdruck „stringente Hybridisierung“ wird hier verwendet, um Bedingungen zu bezeichnen, unter welchen Nukleinsäurehybride stabil sind. Wie dem Fachmann bekannt ist, wird die Stabilität von Hybriden in der Schmelztemperatur (T_m) der Hybride reflektiert. Im allgemeinen ist die Stabilität eines Hybrids eine Funktion der Natriumionenkonzentration und der Temperatur. Typischerweise wird die Hybridisierungsreaktion unter Bedingungen niedrigerer Stringenz, gefolgt von Waschungen variierender, aber höherer Stringenz, durchgeführt. Bezugnahme auf Hybridisierungsstringenz betrifft derartige Waschbedingungen.

Wie hier verwendet bezeichnet der Ausdruck "mäßig stringente Hybridisierung" Bedingungen, die Ziel-Nukleinsäure gestatten, eine komplementäre Nukleinsäure zu binden, die etwa 60% Identität, vorzugsweise etwa 75% Identität, stärker bevorzugt etwa 85% Identität mit der Ziel-DNA hat; wobei mehr als etwa 90% Identität mit der Ziel-DNA besonders bevorzugt werden. Vorzugsweise sind mäßig stringente Bedingungen Bedingungen, äquivalent der Hybridisierung in 50% Formamid, 5 × Denhart-Lösung, 5 × SSPE, 0,2% SDS bei 42°C und nachfolgendes Waschen in 0,2 × SSPE, 0,2% SDS bei 65°C.

Der Ausdruck "Hybridisierung mit hoher Stringenz" bezeichnet Bedingungen, die Hybridisierung von nur denjenigen Nukleinsäuresequenzen gestatten, die stabile Hybride in 0,018 M NaCl bei 65°C bilden (d.h., wenn ein Hybrid in 0,018 M NaCl bei 65°C nicht stabil ist, wird es unter Bedingungen hoher Stringenz, wie sie hier in Betracht gezogen werden, nicht stabil sein). Bedingungen hoher Stringenz können zum Beispiel durch Hybridisierung in 50% Formamid, 5 × Denhart-Lösung, 5 × SSPE, 0,2% SDS bei 42°C und nachfolgendes Waschen in 0,1 × SSPE und 0,1% SDS bei 65°C bereitgestellt werden.

Der Ausdruck "Hybridisierung mit geringer Stringenz" be-



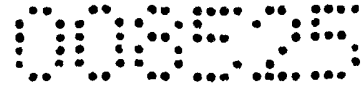
zeichnet Bedingungen, äquivalent der Hybridisierung in 10% Formamid, 5 × Denhart-Lösung, 6 × SSPE, 0,2% SDS bei 42°C und nachfolgendes Waschen in 0,1 × SSPE, 0,2% SDS bei 50°C. Denhart-Lösung und SSPE (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) sind dem Fachmann bekannt, wie es andere geeignete Hybridisierungspuffer sind.

SEQ ID Nr. 1 hat erfindungsgemäß die folgende Nukleotidsequenz:

```
ATGACTATTCTACCCCTACTACTCTACCCTTCCCTAACTGCCTTACTACTGTACGTACTTCTTAACCTGCGCCCCCG
TCACCCTAACCGTCTCCCGCCGGGACCAAGCCCATGGCCGATCGTCGGAAACCTACCGCACCTCGGCGCGAGTCCGC
ATCAGTCGCTGGCGACGTTGGCCGCAAAGTACGGCCCGTTGATGTACCTCCGACTCGGGTTTGTGACGTGGTGGTG
GCGGCGTCTGCTTCAGTCGCTGCACAGTTTTTAAAAGTTCATGATCTTAACCTCGCAAGCCGGCCGCTGAGCTCTGG
CGGGAAGTATATCGCGTATAATTATCAGGATATGGTGTGGTGCACCGTACGGTCCGAGATGGCGGATGCTTAGGAAGA
TTTGCTCCGTGCATATGTTTTCTGCTAAAGCAATGGACGGATTCGTGATGTTTCGGCAGGAGGAAGTAGCTATACTC
ACGCGCACTTTAGTAAGCGCTGGAAAATCGCCGGTGAAGTTAGGTCAAATACTTAACGTGTGCACCACGAACGCATT
AGCACGAGTGGTGTAGGTCCGAGAGTATTCGCCGACGGAAGTGCAGGTGGTGTATCCGAAGCGGATGAGTTC AAGG
ATATGGTGGTGGAGCTGATGGTGTGGCCGGAGAATTCACATCGGTGACTTTATCCCGGCGCTTGACTGGCTGGAC
CTGCAAGGCATTA AAAACAAGATGAAGAACTTCACGCTCGATTTCGATTCGTTCCCTTCACGGGATCCTTGAAGAGCA
TAAGTCCGGCAAGTTTGGCGCGCCGAGTCATGGTGAATTTGTTGAGCACATTGATCTCGTTGAAGGATGATCCGATG
GTGAAGGCGGGAAGCTTTCAGATGTTGAAATCAAAGCTTGTCTTCTGAACTTATTTGTGCGCCGGAACAGACACATCA
TCAAGTACAGTGAATGGGCAATAGCCGAGCTAATTCGACATCCAAAGCTACTAAAACAAGCCCCAAAAGAAATGGA
CAATGTAGTTGGTTCGAGACCGCTTGTAACTGAATTAGACTTAAACGAGTTAAATTTTCTACAAGCCATTGTAAAAG
AGACCTTTAGGCTTCACCCTCAACACCCTCTCGTTACCAAGAATTGCATCAGAGAGTTGTGAAGTTGACGGATAT
TACATTC CCAAGGGATCCACGCTCCTTGTAAATGTGTGGGCCATTGCTCGTGACCCGAATGTGTGGGCTGACCCACT
TGAATTC CCGGCCATGCGGTTCTTGCTGGAGGGCGAAAAGCCTAATGTTGATGTTCAAGGAAAACA ACTTTGAAGTTA
TACCGTTTGGGGCTGGGCGAAGGATTTGTGTGGGTATTAGTCTAGGGTTGAGAATGGTCCAGCTACTTGTGCAACA
TTGGTTCAAACCTTTGATTGGGAATTGGCTAATGGGTAAACCCGGAGAAGCTAAACATGGATGAAGCCTTTGGGTT
AACCTTCAGAAGGCTGAGCCCTTGATGGTGCACCCAATGCCGAGACTAGCTCCACACGTGTATGGAAGTCATTAA
```

Das von SEQ ID Nr. 1 kodierte Polypeptid hat erfindungsgemäß die folgende Aminosäuresequenz:

```
MTILPLLLYPSLTALLLYVLLNLRPRHPNRLPPGSPWPVIVGNLPHLGASPHQSLATLAÄKYGP
LMYLRLGFVDVVVAASASVAAQFLKVHDLN FASRPLSSGGKYIAYNYQDMVFAPYGPRWRMLRK
ICSVHMFSAKAMDGFRHVRQEEVAILRTRLVSAGKSPVKLGQILNVCTTNALARVVLGRRVFAD
GSAGGD PKADEFKDMVVELMVLAGEFHIGDFIPALDWLDLQGIKNMKKLHARFDSFLHGILEE
HKSGKFGAPSHGDLSTLISLKDDADGEGGKLS DVEIKALLLNLFVAGTDTSSSTVEWAI AELI
RHPKLLKQAQKEMDNVVGRDRLVTELDLNELNFLQAI VKETFRLHPSTPLSLPRIASESCEVDG
YYIPKGSTLLVNVWAIARDPNVWADPLEFRPMRFLPGGEKPNVDVQGNNEFEVIFGAGRRI CVG
```



ISLGLRMVQLLVATLVQTFDWELANGLNPEKLNMDFAFGLTLQKAEPLMVHMPRLAPHVYGS
(SEQ ID Nr. 2)

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Motiv FASRPLSTAG(X₃)_m(GSAGGD)_n oder FASRPLSSGG(X₃)_m(GSAGGD)_n.

Polypeptide, welche dieses Motiv aufweisen, sind besonders gut geeignet, um erfindungsgemäß eingesetzt zu werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß der vorliegenden Erfindung.

Die Nukleinsäuremoleküle der gegenständlichen Erfindung können in einen Vektor eingebracht werden. Mit Hilfe dieses Vektors können die Nukleinsäuremoleküle in Zellen von Pflanzen oder Mikroorganismen eingebracht werden. Die verwendeten Vektoren können für die Klonierung oder für die Expression von entsprechenden Produkten eingesetzt werden. Daher sind in den Vektoren entsprechende Elemente wie Promotoren, Replikationsursprünge, usw. vorgesehen. Die erfindungsgemäß eingesetzten Vektoren können einen Pflanzenzellen wirksamen Promotor, wie beispielsweise den CaMV 35S-Promotor, den Nopalinsynthase-Promotor oder den Saccharose-synthase-Promotor, enthalten.

Falls die Vektoren dazu verwendet werden, um das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül in das Genom einer Zielzelle einzubringen, können am Vektor entsprechende Elemente vorgesehen sein, die eine Rekombination der Nukleinsäure in das Genom ermöglichen.

Vektoren, welche erfindungsgemäß eingesetzt werden können, sind dem Fachmann hinreichend bekannt und können auf verschiedenste Weise in eine Zelle eingebracht werden. So kann der Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung durch Elektroporation, Mikroprojektil-Bombardierung, Transfer mittels Agrobakterium oder durch RNA- bzw. DNA-Viren in die Zielzelle eingebracht werden.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Zelle, insbesondere Pflanzenzelle, umfassend ein Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung. Selbstverständlich ist es auch möglich das Nukleinsäuremolekül bzw. den Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung in anderen Zellen, wie beispielsweise Hefen, E.coli, filamentösen Pilzen und dergleichen zur Verfügung zu stellen.

Ein noch weitere Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft

die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Proteine bei der Herstellung von Chalkonderivaten mit einem 3,4-Hydroxylierungsmuster, wie z.B. 3-Hydroxyphloretin-derivate, Butein und Eriodictyolchalkon.

Die Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung können in Pflanzenzellen und somit in Pflanzen eingebracht werden, um transgene Pflanzen herzustellen, welche in der Lage sind, das erfindungsgemäße Polypeptid zu exprimieren. Daher betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung auch eine transgene Pflanze umfassend ein Nukleinsäuremolekül oder einen Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung. Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül bzw. der erfindungsgemäße Vektor kann in Pflanzenzellen und Pflanzen mit Verfahren eingebracht werden, die dem Fachmann hinreichend bekannt sind.

Vorzugsweise ist die Pflanze ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Zierpflanzen, wie beispielsweise Usambaraveilchen, Azaleen, Rhododendren, Pelargonien, Fuchsien, Cyclamen, Weihnachtssterne, Antirrhinum, Aster (Asteraceae), Begonia (Begoniaceae), Callistephus (Asteraceae), Campanula (Campanulaceae), Caltharanthus (Apocynaceae), Chrysanthemum (Asteraceae), Cineraria (Asteraceae), Dedanthremum (Asteraceae), Dianthus (Caryophyllaceae), Dahlia (Asteraceae), Euphorbia (Euphorbiaceae), Gerbera (Asteraceae), Hydrangea (Hydrangeaceae), Lilium (Liliaceae), Lisianthus (= Eustoma (Gentianaceae)), Myosotis (Boraginaceae), Nierembergia (Solanaceae), Orchidaceae, Osteospermum (Asteraceae), Petunia (Solanaceae), Rosa (Rosaceae), Saintpaulia (Gesneriaceae), Scaevola (Goodeniaceae), Sinningia (Gesneriaceae), Streptocarpus (Gesneriaceae), Torenia (Linderniaceae), Tulipa (Liliaceae), Verbena (Verbenaceae), Veronica (Plantaginaceae), Viola (Violaceae) und Malus sp.. Durch die Anwesenheit des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls werden auch gentechnologische Ansätze, die auf Polyketidreduktase oder Auronsynthese beruhen, wesentlich verstärkt. Soll ein rein gelber Farbton erzielt werden, werden vorzugsweise weiße oder cremefarbene Pflanzen eingesetzt, dabei sind Chalkonisomerase-Mutanten oder Pflanzen, die eine Polyketidreduktase besitzen, bevorzugt. Beim Einsatz von rosa oder rotblühenden Pflanzen kommt es zur Ausbildung von orangefarbenen oder lachsfarbenen Blüten.

Es hat sich zudem gezeigt, dass Pflanzen, welche das erfindungsgemäße Polypeptid - kodiert durch das erfindungsgemäße Nuk-

leinsäuremolekül - exprimieren, insbesondere überexprimieren, eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen, insbesondere gegenüber Pilzen, Viren, Viroiden, Bakterien und Nematoden, aufweisen. Insbesondere zeigen derartige Pflanzen Resistenzen gegenüber Puccinia/Ustilago, Phytophthora, Blumeria/Peronosporacea, barley yellow dwarf virus, sugarcane mosaic virus, plum pox, Xanthomonas campestris pv. Citri, Erwinia amylovora, Erwinia carotovora, Meloidogyne incognita und Heterodera schachtii.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Schnittblume oder Samen einer transgenen Pflanze gemäß der vorliegenden Erfindung.

Die gegenständliche Erfindung wird ferner anhand der folgenden Figuren und Beispiele eingehender erläutert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt ein paarweises Alignment der Cosmos CH3H und F3'H Aminosäuresequenzen.

In Fig. 2 sind Alignments von Regionen verschiedener F3'Hs Aminosäuresequenzen abgebildet.

In Fig. 3 sind die Substratspezifitäten von Cosmos F3'H und M2 in Prozent relativ zu Naringenin (100%) dargestellt.

Fig. 4 zeigt eine schematische Darstellung der Konstruktion von chimären und mutierten Genen der CH3H bzw. F3'H aus *Cosmos sulphureus* und Umsatzraten der resultierenden rekombinanten Enzyme (0-5%: -, 6-30%: +, 31-60%: ++, 61-100%: +++).

Fig. 5 zeigt die verwendeten Primer für die Konstruktion der chimären Gene.

Fig. 6-17 zeigen die Nukleinsäuresequenzen verschiedener Flavonoid-Hydroxylasen.

BEISPIELE:

Beispiel 1:

Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden mit Blütenblättern von *Cosmos sulphureus* cv. „Sunny Goldgelb“ (Austrosaat, Österreich) durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde im Sommer 2006 und Sommer 2007 gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Chemikalien

[14C]Isoliquiritigenin (ISO) wurde ausgehend von 4-Hydroxy[ring-U-14C]Benzaldehyd (33.1 Mbq/mg) (Amersham Interna-

tional, UK) wie in Halbwirth et al. (2006) [Plant Science 170 (2006) 587-595] beschrieben synthetisiert. Die Synthesen von [14C]Naringenin (NAR), [14C]Dihydrokaempferol (DHK), [14C]Kaempferol (KAM) und [14C]Apigenin (API) wurden gemäß Halbwirth and Stich (2008) [Phytochemistry 67 (2006) 1080-1087] durchgeführt: Für die Naringeninsynthese wurden [2-14C]Malonyl-coenzym A (55 mCi/mmol) (Amersham International, UK) und rekombinante Chalkonsynthase verwendet, und die anschließenden Synthesen von DHK, KAM und API wurden jeweils mit rekombinanter Flavanon-3-Hydroxylase aus *Malus domestica*, rekombinanter Flavonol-Synthase aus *Rudbeckia hirta* und mikrosomalen Enzympräparationen mit hoher Flavon-SynthaseII-Aktivität aus *Dahlia variabilis* durchgeführt.

Klonierung der Cosmos sulphureus CH3H

Für die cDNA-Synthese wurde mRNA aus den *Cosmos sulphureus*-Blütenblättern mit dem µMACS mRNA isolation kit (Miltenyi Biotec) extrahiert, und die reverse Transkription wurde mit dem RevertAid H Minus MuLV reverse transcriptase-Kit (Fermentas Life Science) und dem Oligo(-dT) Anker-Primer GACCACGCGTATCGATGTC-GAC(T)16V durchgeführt. Eine RT PCR wurde dann mit den degenerierten Primern TGGMGDATGCTKMGGAAARATYTG (forward primer) und GCCCATTCMAYNGTRCTAGATGA (reverse primer) durchgeführt, welche aus den konservierten Regionen folgender Asteraceae-F3'H-Sequenzen aus der NCBI GenBank abgeleitet wurden: *Rudbeckia hirta* (Acc.-No: FJ216431), *Echinops bannaticus* (Acc.-No: FJ753549), *Centaurea cyanus* (Acc.-No: FJ753550), *Gerbera hybrida* (Acc.-No: ABA64468), *Osteospermum hybrida* (Acc.-No: ABB29899), *Cichorium intibus* (Acc.-No: FJ753548) und *Callistephus chinensis* (Acc.-No: AF313488). Der gesamte 'Open Reading Frame' (ORF) wurde dann mit den spezifischen Primern ATGACTATTCTACCCCTACTACTC (forward primer) und CCTTAATGACTTCCATACACGTG (reverse primer) amplifiziert, welche aus den bei der 5'- und 3'-RACE erhaltenen Fragmente abgeleitet wurden.

Sequenzanalysen und Konstruktion von chimären Genen

Paarweise und multiple Sequenzalignments wurden mit dem Softwaretool ClustalW durchgeführt, um Regionen zu identifizieren, die die Determinierung der Substratspezifität beeinflussen könnten. Folgende F3'H-Sequenzen, hauptsächlich aus Asteraceae Arten, wurden für multiple Sequenzalignments verwendet: *Cosmos sulphureus* (Acc.-No: FJ216426), *Dahlia variabilis* (Acc.-No:

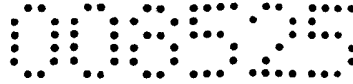
FJ216428), *Tagetes erecta* (Acc.-No: FJ216430), *Rudbeckia hirta* (Acc.-No: FJ216431), *Echinops bannaticus* (Acc.-No: FJ753549), *Centaurea cyanus* (Acc.-No: FJ753550), *Gerbera hybrida* (Acc.-No: ABA64468), *Osteospermum hybrida* (Acc.-No: ABB29899), *Cichorium intibus* (Acc.-No: FJ753548), *Antirrhinum majus* (Acc.-No: DQ272592) and *Arabidopsis thaliana* (Acc.-No: AF271651) (Schlangen et al. 2009). Ein paarweises Sequenzalignment wurde mit der aufgelisteten F3'H aus *Cosmos sulphureus* (Acc.-No: FJ216426) gemacht. Chimäre Gene, die aus cDNA-Fragmenten der erwähnten F3'H aus *Cosmos sulphureus* sowie aus cDNA-Fragmenten der neu isolierten Sequenz bestehen, wurden nach Seitz et al. (2007) hergestellt [FEBS letters 581 (2007) 3429-3434]. Dafür wurden die Fragmente, die fusioniert werden sollten, mit einer Pfu DNA polymerase (Promega, Germany) in separaten PCR-Reaktionen amplifiziert und 10 Minuten in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit jeweils ca. 50 ng cDNA von jedem Fragment und einer T4 DNA ligase (Promega, Germany) ligiert. Die verdünnte Ligation wurde als Template für die anschließende proofreading-PCR verwendet, in der das gesamte chimäre Gen mit dem Taq/Pwo polymerase system (Invitrogen, UK) amplifiziert wurde.

Insertionen oder Deletionen von Aminosäureresten

Insertionen von Aminosäureresten wurden mit Primern eingeführt, die über einen Überhang von Basen verfügen, die für die jeweiligen Aminosäurereste kodieren, die inseriert werden sollten. Deletionen wurden mittels Amplifikation von zwei Fragmenten der jeweiligen F3'H cDNA eingefügt, denen die Basen fehlen, die für die Aminosäurereste kodieren, die deletiert werden sollten. Die anschließende Fusion der beiden amplifizierten Fragmente wurde wie bei der Konstruktion der chimären Gene beschrieben durchgeführt.

Gezielte Mutagenese

Gezielte Mutagenesen wurden mittels der Megaprimer-PCR durchgeführt. Diese PCR wurde in zwei Schritten gemacht: in der ersten PCR wurde ein Megaprimer mit Pfu DNA Polymerase (Promega) amplifiziert. Dafür wurde das Plasmid mit der inserierten cDNA, die mutiert werden sollte, als Template verwendet. Als Primer wurden einerseits ein interner Primer verwendet, der an der Stelle bindet, in der die gewünschte Mutation eingefügt werden soll, und über die dafür notwendige veränderte Basenabfolge verfügt, sowie ein externer Expressionsprimer. Dieses amplifizierte



mutierte Fragment wiederum wurde dann in einer zweiten PCR als Primer zusammen mit dem korrespondierenden Expressionsprimer verwendet, um den gesamten ORF mit den gewünschten Mutationen mit dem 'Expand High Fidelity PCR System' (Roche) zu amplifizieren.

Heterologe Expression in Hefe

Für die heterologe Expression wurden die Proofreading-Amplikons in den Hefe-Expressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen, UK) ligiert und in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen, UK) transformiert. Die Identifizierung der sense-Konstrukte erfolgte mit einer PCR, bei der ein Gen-spezifischer forward- und ein Plasmid-spezifischer reverse-Primer verwendet wurde. Sense-Konstrukte wurden isoliert und die richtige Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Gewünschte Plasmide wurden dann in den Hefestamm INVSc 1 (Invitrogen, UK) transformiert. Die heterologe Expression wurde nach in der Wissenschaft bekannten Methoden durchgeführt und die präparierten Proteine wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinmenge in den Präparationen wurde nach einer modifizierten Lowry Methode durchgeführt.

Enzym-Assays und Identifizierung der Produkte

Um die Substratspezifität der heterolog exprimierten F3'Hs zu bestimmen, wurden folgende Enzymtests durchgeführt: 20 µg der rekombinanten Wildtyp CH3H bzw. 50 µg der Hybrid-Proteine wurden mit 0,25 nmol [¹⁴C]-markierten Chalkon- oder Flavonoid-Substraten in Anwesenheit von 10 mM NADPH und 0,1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (mit 0,4% Na-Ascorbat, pH: 7,5)-Puffer bei 30°C inkubiert. Nach 30 min wurden die enzymatischen Reaktionen mit 10 µl Eisessig gestoppt und die phenolischen Verbindungen zweifach mit EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden auf Celluloseplatten aufgetragen und in CAW (Chloroform:Eisessig:Wasser, 10:9:1) chromatographiert. Detektion und Quantifizierung der Radioaktivität erfolgte mittels TLC Analyse.

Kinetische Daten

Kinetische Daten (scheinbare Michaelis-Konstante (K_m) und maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max})) wurden mittels Lineweaver-Burk-Geraden bestimmt.

Ergebnisse

Klonierung und Sequenzanalyse der Cosmos sulphureus CH3H cDNA

In diesem Beispiel konnte die komplette codierende Sequenz einer cDNA aus *Cosmos sulphureus* mithilfe von degenerierten Primern aus verschiedenen Asteraceae Arten (NCBI GenBank Acc-Nos: FJ216431, FJ753549, FJ753550, ABA64468, ABB29899, FJ753548 und AF313488) und anschließenden RACE-Techniken isoliert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Klons verfügt über alle konservierten Motive von membrangebundenen CytP450-Proteinen (wie den N-terminalen hydrophoben Membrananker, die hochkonservierte Häm-Domäne usw.). Die Sequenz dieses cDNA-Klons wurde in die EMBL/GenBank-Datenbanken unter der folgenden Accession-Number eingetragen: FJ216429. Alignments mit F3'H-Sequenzen, hauptsächlich aus Asteraceae-Arten, welche nicht oder nur im geringen Ausmaß in der Lage sind, Chalkone zu hydroxylieren, zeigen, dass die abgeleitete Aminosäuresequenz von der isolierten cDNA aus *Cosmos sulphureus* hohe Sequenzidentitäten mit den alignierten F3'Fs aufweist. Das paarweise Alignment mit der schon charakterisierten F3'H aus *Cosmos sulphureus* (Acc.-No: FJ216426) zeigt, dass diese beiden Sequenzen nicht identisch sind und über eine Sequenzidentität von 84% verfügen (Fig. 1).

Enzymaktivitäten der putativen Cosmos sulphureus CH3H

In enzymatischen Studien mit dem rekombinanten Enzym, welches bei der heterologen Expression des cDNA-Klons aus *Cosmos sulphureus* gewonnen wurde, konnten hohe katalytische CH3H-Aktivitäten mit dem 6'-Deoxychalkon Isoliquiritigenin gezeigt werden. Kinetische Studien zeigten, dass der höchste V_{max}/K_m (18,01/s*kg) mit Iso als Substrat beobachtbar ist (Tabelle 1).

Deshalb wurde dieses Protein aus *Cosmos sulphureus* CH3H genannt. Zum Vergleich wurde die rekombinante F3'H aus *Cosmos sulphureus* (Accession No: FJ216426) mit den gleichen Substraten getestet. Diese Tests bestätigten die F3'H-Aktivität und die fehlende CH3H-Aktivität dieses Enzyms. Die Umsatzraten der beiden rekombinanten Proteine sind in Fig. 4 aufgelistet.

Identifizierung von Regionen, die bei der CH3H-Reaktion eine Rolle spielen könnten

Um Regionen zu identifizieren, die bei der CH3H Aktivität in *C. sulphureus* CH3H eine Rolle spielen könnten, wurden Alignment Studien durchgeführt. Dabei wurden die bereits erwähnten F3'H Aminosäuresequenzen verwendet, deren rekombinante Enzyme nicht in der Lage sind, Chalkone zu hydroxylieren (Schlangen et al. 2009, Plant Science 177 (2009) 97-102). Bei Analyse des Alignments

konnte festgestellt werden, dass eine Region, die als putative Substraterkennungsregion (SRS1) in CypP450 Enzymen von Gotoh (1992) beschrieben wurde, in der CH3H-Sequenz von *C. sulphureus* auffällige Unterschiede zu den jeweiligen SRS1-Regionen der anderen F3'H-Aminosäuresequenzen aufweist. Weiters kann in der *Cosmos sulphureus* CH3H Sequenz eine Region D(192)GSAGGDP(199) detektiert werden, die nur in dieser Aminosäuresequenz vorhanden ist (Fig. 2). Im paarweisen Alignment mit der *C. sulphureus* F3'H kann man sehen, dass die CH3H eine Insertion von vier Aminosäureresten verglichen mit der F3'H aufweist (SAGG-Region, Fig. 1), und die benachbarten Reste der inserierten vier Aminosäurereste sind auch unterschiedlich in der CH3H (SAGG+N-Region, Fig. 1).

Konstruktion von chimären Genen

Um identifizieren zu können, ob die auffälligen Regionen, die in den Alignments gefunden wurden, einen Einfluss auf die CH3H-Aktivität haben, wurden fünf chimäre Gene konstruiert, die *C. sulphureus* CH3H und *C. sulphureus* F3'H cDNA Fragmente enthalten (C1-C5, Fig. 4 und 5): C1: Aminosäurepositionen 1-196: F3'H und 201-512: CH3H; C2: Aminosäurepositionen 1-210: CH3H und 211-512: F3'H; C3: Aminosäurepositionen 1-119: CH3H und 124-512: F3'H; C4: Aminosäurepositionen 1-193: CH3H und 198-512: F3'H. Die Aminosäurepositionen basieren auf dem paarweisen Alignment von *C. sulphureus* F3'H and CH3H. Alle Primer, die für die Herstellung der chimären Gene verwendet wurden, sind in Fig. 5 aufgelistet, und eine schematische Darstellung der chimären Gene ist in Fig. 4 dargestellt.

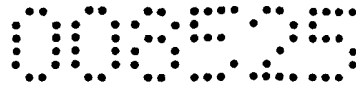
Konstruktion von mutierten cDNAs mit Insertionen und Deletionen

Gezielte Mutagenese

Aufgrund der besonderen Eigenschaften der Aminosäure Prolin (Prolin ist ein Helix- und Faltblattbrecher und wird häufig in Loops oder Turns gefunden) wurde P199 aus der SAGG+N-Region in A199 gemäß dem Alanin, welches in der *Cosmos sulphureus* F3'H Sequenz an dieser Position gefunden werden kann, (Fig. 1), mutiert. Die dafür verwendeten Primer und eine schematische Darstellung können jeweils in Tabelle 3 und Fig. 4 gefunden werden.

Enzym-Aktivitäten der heterolog exprimierten chimären und mutierten Enzyme

Insgesamt wurden zwei native Enzyme aus *C. sulphureus* als auch fünf chimäre (C1-C5) und drei mutierte Enzyme (M1, M2 und

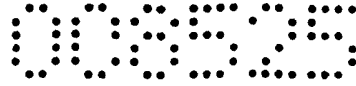


M3, Fig. 4) heterolog in Hefe exprimiert. Studien mit den rekombinanten Enzymen bezüglich ihrer Substratakzeptanz zeigten, dass alle exprimierten Enzyme außer M3 F3'H-Aktivität besitzen (Fig. 4). Die Hydroxylierung von Chalkonen konnte jedoch nur mit den chimären Genen C1, C2 und C5 als auch mit M1 beobachtet werden. Mit dem rekombinanten Enzym C1 konnte jedoch nur eine geringe CH3H-Aktivität, verglichen mit der F3'H-Aktivität und der CH3H-Aktivität der anderen rekombinanten Enzyme, beobachtet werden.

Um kinetische Daten mit verschiedenen Substraten zu bestimmen, wurden kinetische Studien mit den rekombinanten Enzymen durchgeführt. Diese kinetischen Daten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

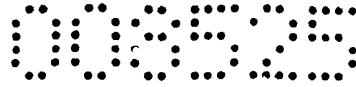
Beispiel 2:

Die Herstellung von transgenen Apfelbäumen erfolgt durch Transformation von jungen Apfelblättern mittels Agrobakterium, wie in der Literatur beschrieben (Szankowski et al; Plant Cell Rep 2003, 22 141-149). Die Pflanzen werden im Gewächshaus als selbstbewurzelte Pflanzen oder aufgepropft auf eine herkömmliche Unterlage unter Freilandlicht-ähnlichen Bedingungen getestet. Die Blätter werden auf einen erhöhten 3-Hydroxyphloretin Gehalt mittels HPLC untersucht, beispielsweise nach der Methode von Sato et al., 2001 (Plant Science 160, 229-336). Ein Zusammenhang zwischen Pathogenabwehr und 3-Hydroxyphloretin ist aus der Literatur bekannt (Eltner, E.F., Oßwald, W., Schneider, I., 1996. Phytopathologie. Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.). Eine erhöhte Resistenz gegen *Erwinia amylovora* der transgenen Äpfel, die das erfindungsgemäße Nukleotid überexprimieren, kann folgendermaßen getestet werden: Die Sprossen werden 3-4 Wochen vor der Testung auf eine Höhe von 10 cm zurückgeschnitten. Die Bakterien werden auf King's B-Agarplatten für 24 h angezogen und anschließend in Phosphatpuffer resuspendiert. Die Zellkonzentration wird spektrophotometrisch auf 10^7 cfu/ml eingestellt. Als Negativkontrolle wird Phosphatpuffer auf leere King's B-Agarplatten geleert und wieder dekantiert. Zur Inokulation werden die Blattspitzen der beiden jüngsten, entfalteten Blätter mit einer Scheere abgeschnitten, die zuvor in eine Kulturlösung mit dem Erreger



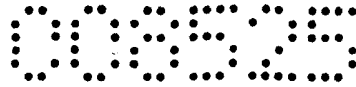
- 17 -

getaucht wurde. Pro transgener Linie werden 10-20 Individuen getestet und mit der Kontrolle verglichen. Der Infektionsgrad wird aus dem Verhältnis der Länge des geschädigten Triebes im Vergleich zur Gesamtrieblänge berechnet.



Patentansprüche:

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert, wobei die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 umfasst oder mindestens 60% Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweist oder in der Lage ist mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren, wobei die Nukleotidsequenz für ein Polypeptid kodiert, welches das Motiv $FASRPLSX_1X_2G(X_3)_m(GSAGGD)_n$ umfasst, wobei X_1 Threonin oder Serin, X_2 Alanin oder Glycin, X_3 eine beliebige Aminosäure, m eine ganze Zahl zwischen 50 und 200 und n 0 oder 1 ist.
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Motiv $FASRPLSTAG(X_3)_m(GSAGGD)_n$ oder $FASRPLSSGG(X_3)_m(GSAGGD)_n$ ist.
3. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2.
4. Zelle, insbesondere Pflanzenzelle, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2 oder einen Vektor gemäß Anspruch 3.
5. Transgene Pflanze umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2 oder einen Vektor gemäß Anspruch 3.
6. Transgene Pflanze nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Zierpflanzen, insbesondere Petunien, Usambaraveilchen, Azaleen, Rhododendren, Pelargonien, Fuchsien, Cyclamen, Weihnachtssterne, Antirrhinum, Aster (Asteraceae), Begonia (Begoniaceae), Callistephus (Asteraceae), Campanula (Campanulaceae), Catharanthus (Apocynaceae), Chrysanthemum (Asteraceae), Cineraria (Asteraceae), Dedanthremum (Asteraceae), Dianthus (Caryophyllaceae), Dahlia (Asteraceae), Euphorbia (Euphorbiaceae), Gerbera (Asteraceae), Hydrangea (Hydrangeaceae), Lilium (Liliaceae), Lisianthus (= Eustoma (Gentianaceae)), Myosotis (Boraginaceae), Nierembergia (Solanaceae), Orchidaceae, Osteospermum (Asteraceae), Rosa (Rosaceae), Scaevola (Goodeniaceae), Sinningia (Gesneriaceae),



Streptocarpus (Gesneriaceae), Torenia (Linderniaceae), Tulipa (Liliaceae), Verbena (Verbenaceae), Veronica (Plantaginaceae), Viola (Violaceae) und Malus sp..

7. Schnittblume oder Samen einer transgenen Pflanze nach Anspruch 5 oder 6.

>CH3H [REDACTED] AS Q T [REDACTED] M [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] TT H A [REDACTED] E [REDACTED]
 Consensus MTILP LLLYPSLTALLLYVLLNLRPRHPNRLPPGSPWPPIVGNLPHLGs*PHpSLAsLAaKYGPLMaLRL

>CH3H [REDACTED] A [REDACTED] V [REDACTED] L [REDACTED] LS [REDACTED] GK Y I [REDACTED] M [REDACTED] M [REDACTED] A [REDACTED] M [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] S [REDACTED] T [REDACTED] A [REDACTED] P N [REDACTED] A E H M [REDACTED] L [REDACTED] L [REDACTED] G [REDACTED] L [REDACTED]
 Consensus GFVDVVVAASASVAtQFLKsHDhNFASRP.sSGTcabAYNYQDbVFAPYGPWRWMLRKICSVHbFStKAb

>CH3H [REDACTED] G [REDACTED] I [REDACTED] T [REDACTED] V S [REDACTED] I [REDACTED] N [REDACTED] V [REDACTED] A D G S A G G [REDACTED] P [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] D [REDACTED] V [REDACTED] A [REDACTED] A G [REDACTED] L [REDACTED] S [REDACTED] M [REDACTED] G E R [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] A [REDACTED]
 Consensus DsFRHVRQEEVALLTRsLstAGKSPVKLGQLsVCTTNALARVhLGRRVft-.....DsKADEFKDMVVE
 SAGG (+N)

>CH3H L [REDACTED] H [REDACTED] [REDACTED] KN [REDACTED] R [REDACTED] HG [REDACTED] S [REDACTED] P AP [REDACTED] G [REDACTED] L [REDACTED] S [REDACTED]
 >F3' H M [REDACTED] N [REDACTED] [REDACTED] TK [REDACTED] Q [REDACTED] NT [REDACTED] T [REDACTED] G SS [REDACTED] R [REDACTED] S [REDACTED] A [REDACTED]
 Consensus bMVLAGEFpIGDFIPALDWLDLQGippMKKHLHApFDSFLpsILEEHK*GkHgtsSH.DL.STLI tLKDD

>CH3H [REDACTED] V [REDACTED] [REDACTED] V [REDACTED] [REDACTED] H [REDACTED] K L K [REDACTED] Q K [REDACTED] [REDACTED] D [REDACTED] L [REDACTED] N E
 >F3' H [REDACTED] I [REDACTED] [REDACTED] I [REDACTED] [REDACTED] C [REDACTED] Q [REDACTED] R [REDACTED] H E [REDACTED] E [REDACTED] S [REDACTED] G K
 Consensus ADGEGGLSDlEIKALLNLF lAGTDTSSSTVEWAIAELIRpPp1L+QApceMDNVVGR-RLVTE.DLsc

>CH3H [REDACTED] N [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] NV [REDACTED] A [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] T [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] H [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] KM [REDACTED] T [REDACTED] [REDACTED] A [REDACTED]
 Consensus, LsFLQAIVKETFRLHPSTPLSLPRIASECElDGYaIPKGSTLLVNVWAIARDPpHwsDPLEFRPhRFLP

>CH3H [REDACTED] Q [REDACTED] N [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] LN [REDACTED] D [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] K [REDACTED] D [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] VL [REDACTED] N [REDACTED]
 Consensus GGEKPNVDVpGnsFEVlPFGAGRRICVGlSLGLRMVQLLVATLVQTFDWELANGl.PEKLNMSEAFGLTL

>CH3H [REDACTED] K [REDACTED] M [REDACTED] H [REDACTED] M [REDACTED] G [REDACTED] H [REDACTED]
 >F3' H [REDACTED] R [REDACTED] I [REDACTED] Y [REDACTED] K [REDACTED] E [REDACTED] G [REDACTED]
 Consensus Q+AEPLbVaPbPRLAPHVY.Sh

Fig. 1

3/12

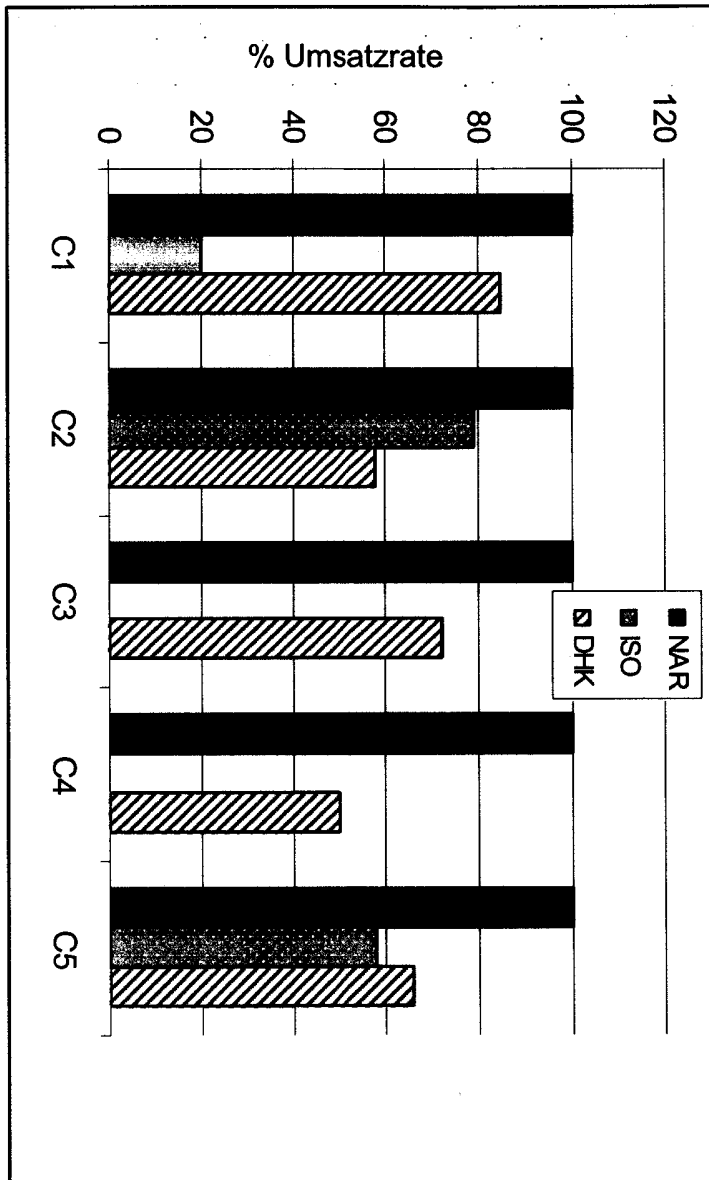
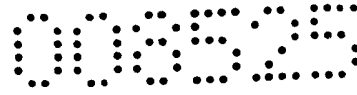
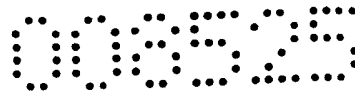


Fig. 3



cDNA-Klon	Template	Manipulation	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Chimäre Gene				
C1	5'- Fragment: F3'H	ORF Region	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	CTTCGGCATCAGGCTCACCG
	3'- Fragment: CH3H		P-GGGGATGAGTTCAAGGATATGG	CCTTAATGACTTCCATACACGGTG
C2	5'- Fragment: CH3H	1-210	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	CTTCGGGATCACCACCTGCA
	3'- Fragment: F3'H	211-512	P-GGGGATGAGTTCAAG GAT ATG G	AGGATGTCTCAACTTACAACAATAAAACC
C3	5'- Fragment: CH3H	1-119	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	GTACGGTGCAAAACACCATATC
	3'- Fragment: F3'H	120-508	P- GGTCCTCGGTGCGGGAT	AGGATGTCTCAACTTACAACAATAAAACC
C4	5'- Fragment: CH3H	1-193	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	P- TTCGCATCTCCGTCGGC
	3'- Fragment: F3'H	194-508	GGCGGATGAGTTCAAGGATATG	AGGATGTCTCAACTTACAACAATAAAACC
C5	5'- Fragment: CH3H	1-119	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	GTACGGTGCAAAACACCATATC
	3'- Fragment: M2	120-512	P- GGTCCTCGGTGCGGGAT	AGGATGTCTCAACTTACAACAATAAAACC
Mutierte Gene				
M1	5'- Fragment: CH3H	Deletion S(194)AAG(197) von	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	TCCGTGGGGAATACTCTC
	3'- Fragment: CH3H		P-GATCCGGAAGGCGGATGAGTT	CCTTAATGACTTCCATACACGGTG
M2	5'- Fragment F3'H	Insertion von S(194)AAG(197), Austausch von R(193) in G und A(199) in P	ATGACTATTCTACCCCTACTACTC	CACCTGCACITCCGTCACGGAATACTCTC CTGCC (SAGG from CH3H)
	3'- Fragment: F3'H		P-GTGATCGGAAGGCGGATGAG	AGGATGTCTCAACTTACAACAATAAAACC
M3	CH3H	CCG -> GCG P(199) -> A		ATCCGCCCTTCGCATCACCA

Fig. 5



6/12

Acc. No. FJ216426| *Cosmos sulphureus* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

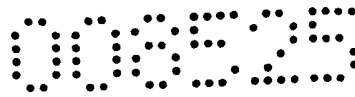
```
ATGACTATTCTACCCCTACTACTCTACCCCTTCCCTAACTGCCTTACTACTGTACGTACTTCTTAACCTGC
GCCCCCGTACCCTAACCGTCTCCCGCCGGGACCAAGCCCATGGCCGATCGTCGGAAACCTACCGCACCT
CGGCACAACCTCCGCATCACTCGCTTGCGGCATTGGCGGCAAAGTACGGCCCGTTGATGCACCTCCGACTC
GGCTTTGTTGACGTGGTGGTGGCCGCTCTGCGTCAGTCGCTTACAGTTTTTGAAAACTCATGACGCGA
ATTTCCGCCAGCCGGCCCGCAACTCCGGCGCGGAGCATATGGCGTATAATTATCAGGATCTGGTGTGTTGC
GCCGTACGGTCCCTCGGTGGCGGATGCTTCGGAAGATATGCTCCGTGCACCTATTTCCGGCAAAGCACTC
GATGACTTCCGTCACTGTTCCGGCAGGAGGAAGTAGCGGTACTGACGCGCGCTTTAGCCGGTGGCGGGAAAT
CACCGGTGAAATTAGGTCAACTGCTTAGCGTGTGCACCACCAACGCATTAGCACGAGTGATGTTAGGCAG
GAGAGTATTCGGTGAGCGTGATGCGAAGGCGGATGAGTTCAAGGATATGGTGGTGGAGATGATGGTGTG
GCGGGAGAATCAATATCCGGTGACTTTATCCCGGCGCTTGACTGGCTGGACCTGCAAGGCATCACGAAAA
AAATGAAGAAGCTGCACGCTCAATTGATTCGTTTTCTTAACACGATTCTTGAAGAGCATAAAAACCGGCAA
GGGCGGCTCTTCGAGTCACAGGGATTTGTCGAGACAGCTGATTGCACCTCAAGGATGATGCCGATGGAGAG
GGAGGGAAACTTTTCAGATATTGAAATCAAAGCTTTGCTTCTGAACCTATTTCATTGCGGGAACAGATACAT
CATCTAGCACCGTGGAAATGGGCAATAGCTGAACTAATTCGCTGTCCACAAATACTACGGCAAGCACACGA
AGAAATGGACAATGTTGTTGGTCGAGAGCGGCTTGTAACCGAATCAGACCTTGGTAAACTAACATTCCCTC
CAAGCCATTGTAAAGGAGACCTTTAGACTCCACCCGCTACACCCTCTCATTGCCAAGAATTGCGTCCG
AGAGTTGTGAAATTGATGGCTATTTTCATTCTAAGGGGTCCACACTTCTTGTAAATGTGTGGGCCATTGC
CCGTGACCCAAAAATGTGGACGGATCCACTTGAATTTAGGCCACACGGTCTTGCCCGGAGGTGAAAAA
CCCAATGTTGATGTTAAAGGAAATGACTTCGAGGTTATACCATTTGGGGCCGGACGAAGGATTTGTGTGG
GTATTAGCCTAGGGTTGAGAATGGTCCAGTTGCTTGTGCGCTACGCTAGTCCAAACCTTTGACTGGGAATT
GGCTAACGGGGTACTACCCGAGAAGCTCAACATGAATGAAGCGTTTGGGCTAACCTTCAAAGAGCCGAG
CCCTTGATAGTGTACCCGAAGCCGAGGCTAGCTCCTCACGTATATGAAAGTGGTTAAGGACTAAATTTCC
GTTTAAAAATTAATAAATTTGTATTTCTGTTTTGTTTTATTGTTGTAAGTTGAGACATCCT
```

Fig. 6

Acc. No. FJ216428| *Dahlia variabilis* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

```
ATGGCCATTCTAACCCCTACTACTTTACACCTCCATCACTTCCCCCGTGTGTACCTCCTGCTTAACCTGC
GCACCCGTCACCCTAACCGTCTCCCTCCCGGCCCAACCCCATGGCCGATCGTCGGAAACCTCCCGCACCT
CGGCACAATTCGCACCACTCGCTAGCGCGGCTGGCGGTAAGTACGGCCCGTTGATGCACCTCCGCCTC
GGCTTCGTTGACGTGGTGGTGCAGCGCTCGGCGTCCGTGCTCAGTTTTTAAAACTAATGACGCGA
TTTTCCGCCAGCCGGCCCGCAACTCCGGCGCGAAGCATATCGCGTATAACTACCAGGATCTGGTGTGTTGC
ACCGTACGGTCCGCGGTGGCGGATGCTGCGGAAGATCTGCTCGGTGCACCTTTTCTCCGCCAAAGCCCTC
GATGATTTCCGTCATATTCGACAGGAGGAGGTGGCGATACTCACAGTGCCTTTGATCGGCGCCGGAGAAAT
CAACGGTGAAACTAGGTCAACTACTCAACGTGTGCACCACAAACGCATTAGCGCGTGTGATGTTAGGTAG
GAGAGTGTTCGGCGACACCGGTGATCTAAAGGCGGATGAGTTTTAAAGATATGGTGGTTCAGCTGATGGTG
TTGGCCGGAGAATTTAACATTGGTGACTTTATCCCGGCGCTTGACTGGCTGGACATGCAAGGCATTGCGA
AGAAGATGAAGAACTCCATGCTCAATTTGATTGCTTCTTAACGCGATCCTTGAAGAACATAAATCCGG
CAATGGCCGCACGTCCGGTACGGTACTTGTGAGCACGCTGATCGCACTCAAGGATGATGCTGACGGT
GAGGGTGGGAACTTTTCAGATATTGAAATCAAAGCTTTGTTACTGAACCTATTTCGTTGCAGGAACAGACA
CGTCATCTAGCACAGTGGAAATGGGCAATAGCCGAACCTCATTCCGCATCCACGAATGCTAAAACAAGCCCA
AGAAGAAATGGACAACGTAGTTGGCCGAGACCGGCTTGTATCCGAATCTGATCTCAGCCAACCTACCATT
CTCCAAGCCATTGTAAAGGAGACCTTTAGACTCCACCCCTCAACACCCCTCTCCTTGCCAAGAATCTCAT
CCGAGAATTGCGAAGTTGACGGGTATCACATTCCAAAAGGATCCACACTCCTCGTCAATGTGTGGGCCAT
TGCTCGTGACCCAAAGATGTGGGCGGACCCACTTGAGTTCCGCCCGCACGGTCTTGCTGGAGGCGAA
AAGCCCAATGTTGATGTGAAAGGGAATGATTTTGAAGTTATACCGTTCGGGGCTGGACGAAGGATTTGTG
TGGTATTAGCCTCGGTTGAGGATGGTCCAGTTGCTTGTGCAACGTCGTTCCAGACCTTCGATGGGA
ATTAGTAAACCGGGTTAAAGCCGGAGAAGCTCAACATGAATGAAGCTTATGGGCTAACCCCTTCAAAGGAA
GAGCCCTTGGTGGTGCACCCAAAGCCGAGGTTAGCTCCTCATGTATATGAAAGTGGTTAAAGATTGACTA
GTTGTGTTTTGAAAATGATAGCTTTCAATTAACAGGTTATGTTTTGTTGTATCTACGTTGTACGTTAA
TTGTTTTAAGTTGAGAACACCCAATTTGTAATGGG
```

Fig. 7



7/12

Acc. No. FJ216430| *Tagetes erecta* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA,
komplette kodierende Region

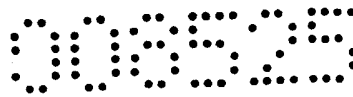
```
ATGTCATTCTAACCTACTACTTTACACCTCCATCACTTCCCCCGTGTGTACCTCCTGCTTAACCTGC
GCACCCGTACCCTAACCGTCTCCCTCCCGGCCAACCCCATGGCCGATCGTCGGAAACCTCCCGCACCT
CGGCACAATTCCGCACCACTCGCTAGCGCGGCTGGCGGTAAGTACGGCCCGTTGATGCACCTCCGCCTC
GGCTTCGTTGACGTGGTGGTTCGCCGCTCGGCGTCCGTCGCTCAGTTTTTAAAACTAATGACGCGA
TTTTTCGCCAGCCGGCCGCAACTCCGGCGCAAGCATATCGCGTATAACTACCAGGATCTGGTGTTCG
ACCGTACGGTCCGCGGTGGCGGATGCTGCGGAAGATCTGCTCGGTGCACCTTTCTCCGCCAAAGCCCTC
GATGATTTCCGTCATATTCGACAGGAGGAGGTGGCGATACTCACACGTGCTTTGATCGGCGCCGGAGAAT
CAACGGTGAAACTAGGTCAACTACTCAACGTGTGCACCACAAACGCATTAGCGCGTGTGATGTTAGGTAG
GAGAGTGTTCGGCGACACCCGGTATCTAAAGGCGGATGAGTTTAAAGATATGGTGGTTCAGCTGATGGTG
TTGGCCGGAGAATTTAACATTGGTGACTTTATCCCGGCGCTTGACTGGCTGGACATGCAAGGCATTACGA
AGAAGATGAAGAACTCCATGCTCAATTTGATTCGTTCCCTTAACGCGATTCTTGAAGAACATAAAATCCCG
GCATGGCCGCACGTCCGGTACGGTACTTGCTGAGCAGCTGATCGCACTCAAGGATGATGCTGACGGT
GAGGGTGGGAACTTTCAGATATTGAAATCAAAGCTTTGTTACTGAACTTATTCGTTGCAGGAACAGACA
CGTCATCTAGCACAGTGGAAATGGGCAATAGCCGAACCTATTCCGCATCCACGAATGCTAAAACAAGCCCA
AGAAGAAATGGACAACGTAGTTGGCCGAGACCGCTTGACTCCGAATCTGATCTCAGCCAACCTACCATTC
CTCCAAGCCATTGTAAAGGAGACCTTTAGACTCCACCCTCAACACCCTCTCCTTGCCAAGAATCTCAT
CCGAGAATTGCGAAGTTGACGGGTATCACATTCCAAAAGGATCCACACTCCTCGTCAATGTGTGGGCCAT
TGCTCGTGACCCAAAGATGTGGGCGGACCCACTTGAGTTCGGCCCCACACGGTTCTTGCCTGGAGGCGAA
AAGCCCAATGTTGATGTGAAAGGGAATGATTTTGAAGTTATACCGTTCGGGGCTGGGCGAAGGATTTGTG
TGGGTATTAGCCTCGGGTTGAGGATGGTCCAGTTGCTTGTGCAACGTTGGTCCAGACCTTCGATTGGGA
ATTAGCTAACGGGTTAAAGCCGGAGAAGCTCAACATGAATGAAGCTTATGGGCTAACCTTCAAAGAGAA
GAGCCCTTGGTGGTGCACCCAAAGCCGAGGTTAGCTCCTCATGTATATGAAAGTGGTTAAAGATTGACTA
GTTGTCGTTTGGAAAATTGATAACTTTCAATTAACAGGTTATGTTTGTGATCTACGTTGTACGTTAA
TTGTTTTAAGTTGAGAACACCCAATTTGGGATGGGTTATATATTTCGTTAAGTTAATAATAAAATAAATAT
TGCATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 8

Acc. No. FJ216431| *Rudbeckia hirta* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA,
komplette kodierende Region

```
ATGGCCATTCTAACCTACTACTTTACACCTCCATCACTTCCCTCGTGTGTACCTCCTGCTTAACCTGC
GCACCCGTACCCTAACCGTCTCCACCCGGCCCAACCCCATGGCCGATCGTCGGAAACCTCCCGCACCT
CGGTACAATTCCACCACTCGCTAGCGCGGTTGGCCGCAAAGTACGGCCCGTTGATGCACCTCCGCCTC
GGCTTCGTTGACGTGGTGGTTCGCCGCTCGGCGTCCGTCGCTCAGTTTTTGGAACTAATGACGCGA
TTTTTCGCCAGCCGGCCGCAACTCCGGCGCAAGCATATCGCGTATAACTACCAGGATCTGGTGTTCG
ACCATACGGTCCGCGGTGGCGGATGCTGCGGAAGATCTGCTCGGTGCACCTTTCTCCGCCAAAGCACTC
GATGATTTCCGTCATATTCGACAGGAGGAGGTGGCGATACTCACACGTGCTTTGATCGGCGCCGGAGAAT
CAACGGTGAAACTAGGTCAACTACTCAACGTGTGCACCACAAACGCATTAGCGCGTGTGATGTTAGGCAG
GAGAGTGTTCAGCGACACCCGGTATCTAAAGGCGGATGAGTTTAAAGATATGGTGGTTCAGCTGATGGTG
TTGGCCGGAGAATTTAACATTGGTGACTTTATCCCGGCGCTTGACTGGCTGGACATTCAAGGCATTACGA
AGAAGATGAAGAACTCCATGCTCAATTTGATTCGTTCCCTTAACGCGATCCTTGAAGAACATAAAATCCGG
CAATGGCCGCACGTCCGGTACGGTACTTGCTGAGCAGCTGATCGCACTCAAGGATGATGCTGACGGT
GAGGGTGGGAACTTTCAGATATTGAAATCAAAGCTTTGCTACTGAACTTATTCGTTGCAGGAACAGACA
CGTCATCTAGCACAGTGGAAATGGGCAATAGCCGAACCTATTCCGCATCCACGAATGCTAAAACAAGCCCA
AGAAGAAATGGACAACGTAGTTGGCCGAGACCGGCTTGATCCGAATCTGATCTCGGCCAAGTACCATTTC
CTCCAAGCCATTGTAAAGGAGACCTTTAGACTCCACCCTTCAACACCCTCTCCTTGCCAAGAATCTCAT
CCGAGAATTGCGAAGTTGACGGGTATCACATTCCAAAAGGATCCACACTCCTTGTCAACGTGTGGGCCAT
TGCTCGTGACCCAAAGATGTGGGCGGACCCACTTGAGTTCGGCCCCACACGGTTCTTGCCTGGAGGCGAA
AAGCCCAATGTTGATGTGAAAGGGAATGATTTTGAAGTTATACCGTTCGGGGCTGGACGAAGGATTTGTG
TGGGTATTAGCCTCGGGTTGAGGATGGTCCAATTGCTTGTGCAACGTTGGTCCAGACCTTCGATTGGGA
ATTGGCTAACGGGTTAGAGCCGGAGAAGCTCAACATGAATGAAGCTTATGGGCTAACCTTCAAAGAGAA
GAGCCCTTGTGGTGCACCCAAAGCCGAGGTTAGCTCCTCATGTATATGAAAGTGGTTAAGGACTGACTA
GTTGTCACCTTCAATAAAACAGGTTGTTTGTGCTGATCTACGTTGTACGTTAATTTGTAAGTTGAGAACAC
CCAATTTGTAATGGG
```

Fig. 9



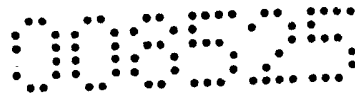
8/12

Acc. No. FJ753549| *Echinops bannaticus* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA,
komplette kodierende Region
CCTCCAAACTCCATATGTAATAATGACCATTCTAACCTTCCTCCTGTACACCTGCATTACTGGGTTAGTCT
TCTATGCATTGCACTTGTTTAACCTGCGCACACCTCACCGTAACCGCCTCCCCCGGCCAACACCATG
GCCAATCGTCGGCAACTTACCACATCTCGGCAGAGTTCGCGACCATTCGCTGGCGGACTTGGCGACAAAG
TACGGCCCGTTGCTGCATCTCCGGCTCGGATTTGTTGACGTGGTGGTGGCCGGATCGGCTTCTGTGCGCG
CACAGTTTTTGAAGGTTTCATGATGCGAATTTGCTAGCAGGCCGCCGAACCTCCGGAGCGAAGCATATGGC
GTATAATTATCAGGATATGGTGTTCGCACCGTACGGTCCGAAATGGCCGGATGCTTCGGAAGATTTGCTCG
GTGCACCTTTTCTCTACCAAAGCACTCGATGATTTCCGTCACGTTCCGTCAGGAGGAGGTAGCGATACTTG
CTCGCGCTTTGGTTCGGAGCCGGAGAATCAACGGTGAATTTAGGTCAGTTACTTAACGTGTGCACCACAAA
CGCGTTAGCACGAGTTATGTTAGGCAGGAGAGTGTGGCGATGGAAGTGGAGGCGGCCGATTCGAAGTCG
GATGAATTTAAGGATATGGTGTGGAGATGATGGTGTGGCCGGAGAATTCACATCGGCCGACTTCATTC
CGGCTCTGGACTGGCTGGACCTGCAATCCGTGACGAAAAGATGAAGAACTCCATGTTCCGGTTCGATTC
GTTCCCTTAATACGATCCTGGAAGAGCATAAAAAGTGGTAATATGGATTTTGTGAGCAGGTTGATTTCCGTC
AAGGATGATGCAGACGGACAGGGAGGGAAGCTTTCAGACACCGAAATCAAAGCTTACTTCTGAATTTGT
TTGCCGCGGGAACAGACACATCATCTAGCACTGTTGAATGGGCAATCGCCGAACCTCATTCGACATCCACA
ACTAATGAAGCAAGCCCAAGAAGAATGGACACCATAGTTGGTTCGAGACCGGCTAGTTACTGAATGGAC
CTAAGTAGACTAACATTTCTCCAAGCCATTGTGAAGGAGATATTTAGGCTCCATCCGTCAACACCCTCT
CATTGCCAAGGATTGCATCAGACACTTGTGAGGTTGACGGATATTATATTCCTAAAGGATCCACGCTCCT
TGTTAATGTGTGGCCATCTCTCGAGACCCAAAATATGGTCCAATCCACTTGAATTCACCCCACTCGA
TTCTTGCTGGTGGTGAAGCCAGATGCCGATGTCAAGGGAATGATTTTGTGAGCTCATACCATTTGGGG
CTGGACGAAGGATTTGTGCAGGTATGAGTCTGGGATTAAGATGGTCCAGTTACTCACTGCAACTCTAGT
CCATGCATTCGATTGGGAATTTGGCTAACGGGTTAGACCCAGATAAGCTCAACATGGAAGAAGCCTATGGG
TTAACCCCTCAAAGGGCTACACCCTTGATGGTGCACCCAAGGCCAAGGTTAGCCCTCATGTATACCAA
GTGGTTAAGGACTTAACCCGTTATTTATTCGCATTTTTGTTGCGAAATTAATTAATCATATTTTCTCTA
GCGATTATGTACGTTCTCTAAAATGTTTTTTTTTAATTATCTTATTCATGTAAGTTGTTTCATGTTTTGG
CTAAATAAATAATTTAAATACTCATCTATCATTCTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 10

Acc. No. FJ753550| *Centaurea cyanus* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA,
komplette kodierende Region
ATGACATTTCTACCCCTGGTTCTATACACCTCTGTGCGCCCTGTTACTCCTCTACGTATTGCTTAACCTAC
GCACCCCTCGCTCGAACC GCCGGCTTCCCCCGGCCGACCCCGTGGCCGATAGTCGGAACCTGCCTCA
TCTCGGCAAGATGCCTCACCATGCATTGGCCGCAATGGCCGACAAGTACGGCCCTTGATGCATCTACGG
TTCGGCGTTGTGGACGTCGTGGTGGCCGCGTCTGCTTCCGTGGCCGCTCAGTTTTTGAAGGTCCACGACG
CGAATTCGCGAGCAGGCCGCCCAACTCCGGGGCGAAGCATCTCGCGTACGATTATCAGGATCTCGTGT
TGCCCCATACGGTCTGAAGTGGAGGATGCTTCGGAAGATCTGCTCGGTGCATCTGTTCTCGAATAAGGCA
CTCGATGATTTCCGTCACGTTCCGTGAGGAGGAGGTGGCCGTTTTGACCCGTGCTTTGGCCGGAGCCGGAG
GATCGACGGTGGCTTTAGGTCAATTACTTAACGTTTGCACCACAAACGCTTTGGCAGCAGTGATGTTAGG
TAGGAGAGTATTTGGTGACGGTAGCGGAGGCGGAGATCGGAAGGCGGATGAATTCAGGAAATGGTGGTT
GAAATGATGGTATTGGCCGGAATTCACATCGGCGACTTCATTCCGGCGCTTGATTGGCTGGACCTGC
AAGGCGTAACCAAAAAAATGAAAAACCTCCATCTCCGATTTGATTGTTTTCTTAACGAAATCCTCGAAGA
CCATAAAAAATGGCGGTGACATCATCACTTCCGGTAACGTGGACTTGCTAACCACGTTGATTTCACTCAAG
GACGACGCCGATGGGGAGGTTGGGAAGCTTTCAGACATCGAAATCAAAGCTATACTTCTGAATTTATTTA
CTGCTGGAACAGACACGTCATCTAGTACGGTGGAAATGGGCAATGGCAGAACTTATTCGATATCCACA
AATGCAAAAAAGCCCAAGAAGAAATAGAAAGCGTAGTCCGTAGGGACCGACTTGATCTGAATTTGGACCTA
CCCCGACTAACGTTCTTGAAGCCGTTGTGAAGGAAACCTTTAGGCTCCACCCGTCGACCCCACTATCCT
TGCTTAGAATGGCATTAGAGAGTTGTGAAGTCGATGGGTATTACATTTCCCAAAGGATCCACGCTTCTTGT
TAACGTGTGGCCATTGCTCGAGACCCAAAATGTGGGATGACCCGCTTGAATTCGACCTAGACGATTC
TTGCCAAGAGGTGAAAAACCGAATGCTAATGTGAAAGGAAATGATTTGAAATCATACCGTTTTGGGGCTG
GACGAAGAATTTGTGCAGGCATGAGCCTAGGGTTAAGGATGGTCCAGTTGCTCACCGCGACACTGGTCCA
TGCTTTGATTGGAAATTTGGCTAATGGGTTAGACTCAGAGAAATGAACATGAAAGAAGCTTATGGGTTA
ACCCTTCAAAGGGATGTACCTTTGATGGTACACCCTAGCCCAAGGTTAGCTCCCGAGTTATACAAAAGTG
GTTAAGGTCTTGA AAAACCAATGTAGTGGTCTATAGCA

Fig. 11



9/12

Acc. No. DQ218417| *Gerbera* hybrid cultivar D1 flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

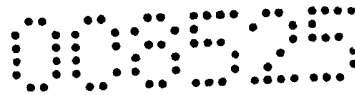
```
ATGACGCCTTTAACGCTCCTTATCGGCACCTGTGTCACTGGATTATTCCTCTACGTGTTGCTTAACCGGT
GCACCCGTAACCTAACCGCCTCCCGCCCGCCCAACGCCATGGCCGGTCGTCGGAAACCTACCGCATCT
CGGCACTATAACCACACCCTCGCTGGCGGCGATGGCGAAGAAGTATGGCCCGTTGATGCACCTCCGGCTA
GGCTTCGTCGACGTCGTGGTGGCCGCCCTCCGCTCCGTCGCGCGCAGTTTTTTGAAGACTCACGACGCGA
ACTTCGCCGATCGGCCCTCCGAACTCCGGAGCCAAGCATATCGCGTATAATTATCAGGATCTGGTGTTTGC
TCCGTACGGTCCGCGGTGGCGGATGCTTCGGAAGATTTGCTCGGTGCACCTGTTTTCCACCAAAGCGCTC
GATGATTTCCGGCACGTCCGGCAGGAGGAGGTAGCGATACTAGCGCGCGCTTTGGTCGGCGCCGGAAAAT
CACCGGTGAAATTAGGTCAGTTACTGAACGTGTGCACCACAAACGCATTGGCGCGAGTGATGTTAGGGAG
GAGAGTATTTGACTCCGGCGATGCTCAGGCGGATGAGTTCAAGGACATGGTGGTTGAGCTGATGGTGTTA
GCCGAGAAATCAACATCGGCGACTTCATCCCCGTGCTTGACTGGCTGGACCTGCAAGGCGTGACGAAGA
AGATGAAGAAACTCCACGCGAAATTCGACTCGTTCCCTAACACGATCCTCGAAGAACATAAAACCGGCGC
CGGTGACGGTGTGCGCTCGGGTAAAGTTGACTTGTGAGCACGTTGATTTGCTGAAGGATGACGCAGAT
GGAGAGGGAGGGAAGCTGTCCGACATTGAAATCAAAGCTTTGCTTCTGAACTTATTCACAGCGGGGACTG
ACACATCATCTAGTACTATTGAATGGGCTATAGCTGAACTAATTGCAACCCGCAACTATTGAACCAAG
CCGAAAAGAAATGGACACCATAGTTGGTCAAGACCGACTGTAACCGAGTCAGACCTAGGCTCAACTAACA
TTCTTCCAAAGCCATTATCAAGGAACTTTTAGGCTTACCCGTCGACCCCACTATCACTGCCAAGGATGG
CATTGGAAAAGTTGTGAGGTTGGCGGTTATTACATCCCTAAAGGATCCACTCTCCTTGTAAATGTGTGGGC
CATTCTCGAGACCCATAAAATTTGGGCCGATCCACTTGAATTTAGCCCACTCGATTCTTACCTGGGGGT
GAAAAGCCCAATACTGATATCAAAGGAAATGATTTTGAAGTCATACCGTTTGGGGCCGGACGAAGGATTT
GTGTCGGAATGAGCCTAGGGTTAAGGATGGTCCAGTTGTTGACTGCAACCCTAATCCATGCCTTTGATTG
GAACTGGCTGATGGGTTAAACCCAAAGAAGCTTAACATGGAAGAGGCTTACGGGCTGACCCTTCAAAGG
GCCGCACCGTTAGTGGTTCACCCAAGGCCAAGGTTAGCCCCACATGTATATGAGACGACTAAGGTCTAG
```

Fig. 12

Acc. No. DQ250711| *Osteospermum* hybrid cultivar flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

```
GAAAACCACCTTTACATTCTTATTTATTTATTTATTACACATACATAAGTAAAATGACCATTTTACCCCT
TGTACTCTACAGTTGCATCACTGGATTAGTGATCTATGTACTGCTTAACCTGCGCACCCGTCACTCTAAC
CGCCTGCCCCCTGGGCCACACCATGGCCGATCGTCGAAACCTACCGCATCTCGGCGTAGTTCGCGATC
ACTCGCTGGCGGCAATGGCGGAAAAATACGGTCCGTTGATGCATCTCCGTTAGGTTTTGTTGACGTGGT
GGTGGCGGCGTCTGCTGCCGTTGCTGCTCAGTTTTTGAAGTTCATGATGCGAATTTTGCAGTAGACCG
CCTAATTCGGTGCGAAACATATAGCGTATAATATCAAGACTTGGTGTTCGCGCCTACTACGGTCCGC
GGTGGCGTATGCTTCGGAAGATTTGCTCCGTTACCTGTTTTCTTCTAAAGCGCTTGATGATTTCCGGCA
TGTCGCCCAGGAGGAGGTGGCGATACTGACGCGCGCTTTGATCGGCGCCGGTACTCGCCGGTGAAACTA
GGTCAATTACTGAACGTGTGCACAACAAACGCATTGGCGCGCGTATGTTAGGTAAGAGAGTATTCGGTG
ACAGAAGTGGTGGCGGTGATCCAAAGCGGATGAGTTCAGGATATGGTGGTTGAGGTGATGGAGTTGGC
CGGAGAATTCAATATCGGTGATTTTATACCGGTGCTTGATTCCTCGATCTGCAAGGAATCGCGAAGAAG
ATGAAGGAACCTCACGTGCCATTTGATTCGTTCCCTGGTAAGATCCTTGAAGAACATAAAACCGGCAACG
GTGGCGCGTCGAGTCAACACACTGACTTGTGACTACCTTGATTTCACTCAAGGATGATACTGATGAAGA
GGGTGGGAAGCTTTAGACATTGAAATCAAAGCTTTGCTTCTGAACTATTTACTGCGGGAACAGACACG
TCATCTAGTACCGTGGAAATGGGCAATAGCCGAACCTCATTCGTCATCCGCAACTATTGAAACAGGCCAAG
AAGAAATAGACAATGTAGTAGGCCGAGACCACCTAGTAACCGAATGGACCTAACCCAACTACCATTCTT
CCAAGCCATTGTGAAGGAGACCTTTAGGCTCCACCATCAACACCACTCTCACTACCAAGAATTGCATCC
GAGAGTTGTGAGGTCAACGGGTACCATATCCCTAAGGATCCCACTCCTTGTTAACGTGTGGGCCATAG
CCCGAGACCCAAAATGTGGTCCGAACCCTTGAATTCGTCAGCCGATTCTTACCCGGGGGTGAAAA
GCCGATGCTGATGTTAAGGGCAACGATTTTGAAGTCATACCATTTCGGGGCCGGAAGGAGGAGTTGTGCG
GGTATGAGTCTAGGATTGAGAATGGTTCAATTACTCGTTGCAACGTTGGTACAAACCTTTGACTGGGAAT
TGGCTAATGGGTTGAAACCCGAGAAGCTTAACATGGAAGAAGCGTATGGGCTAACTCTTCAACGGGCTGC
ACCCTTGTGGTACACCCAAAGCCGAGGTTAGCACCTCATGTGTACGGAAGTAATTAAGGGCTAAATTCT
CTATGGCGTTTTTGTGTTGCATAATTATTCAATTCAAGTTTTTGTGTTGCATAATTATTCAATTCAAATTC
GATTTGCAATTCGAATAATTAGGTAACAATTGTATTTGCTATTTGAAGTGTAGTGTATATGGTTTCTG
TAAGTGATTGAGATATTTTCATGATAATGAAAAACAATGATGCGAAAAAA
```

Fig. 13

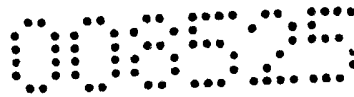


10/12

Acc. No. FJ753548 | *Cichorium intybus* flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

GAAACTCCGTCTACAACTACTTACATCACACTTTTTGAACCGAACCCCATCATATGTAAAATGACCC
TTTTAACACTAATCATCTACGCCTGCGTCACCTGGGATAGCAGCCTATGTATTGCTAAACCTGCGGAACCG
TCGGGCAAACGCCTGCCGCCCGGCCAACCCCATGGCCATAGTCGGAAACTTACCTCACCTCGGTACA
ATCCCGCACCCTCGTTGGCCGCTTTAGCAACAAGGTACGGACCGTTGATGCACCTACGTCTCGGCTTCG
TTGACGTGGTGGTGGCGGCATCGGCATCCGTGCTGCACAGTTTTTTGAAGGCTCATGACGCTAATTTTCGC
CAGCAGGCCGCCAATTCGGGAGCGAAGCATATGGCGTATAATTATCAGGATCTGGTATTTCGCGCCGTAC
GGTCCGCGGTGGCGAATGCTTCGGAAAATTTGCTCGGTGCATCTGTTTTCTGCCAAATCACTTGATGATT
TCCGTACGTTTCGACAGGAGGAGGTAGCGATACTCACGCGCGCTCTGGTTGATGCCGAAAATCAACGGT
GATATTGGGTGAGTACTTAACGTGTGCACCACAAACGCATTGGCAGGAGTAATGTTAGGCAGGAGAGTA
TTTGCCGATGGAAGCGGAGGAGGCATCCAAAGGCAGATGAGTTCAAGGATATGGTGGTTGAACTGATGG
TGTTAGCCGGAGAATTCAACATCGGTGACTTCATCCCGCGCTTGATATTCTGGACCTGCAAGGCGTGAC
GAAAAAGATGAAGAACTTCACACTCGATTTCGATTCGTTCCCTTAACACGATCCTCGAAGAGCATAAAACC
GGCGGCAGCGGCGCGTCCGGCTCACGTAGACTTGTGAGCACGTTGATTTTCGCTGAAGGATGATGCCGATG
GAGAGGGAGGGAAGCTTTCGGACACCGAAAATTAAGCTTTACTTCTGAATTTATTTCGCTGCGGGAACCGA
TACGTCATCTAGTACCGTGGAAATGGGCAATAGCGGAACTCATCCGCCATCCGCATTTAATGAAACAAGCC
CAACAAGAAATGGACACAGTAGTAGGTCAAGACCGGCTTGTAACCGAATTGGACCTGAGTCAACTAACAT
TCCTCCAAGCCATTGTGAAGGAAACCTTTAGGCTCCACCCATCAACACCACTCTCCTTACCAAGAATAGC
ATCCGAGAGCTGTGAGATCAACGGGTACAACATCCAAAAGGATCCACACTCCTTGTCAACGTGTGGGCC
ATAGCCCGGACCCGAAAATGTGGACCAACCCGCTTCAGTTCCAGCCCGCCGGTTCATGCCCGGGGGCG
AAAAGCCCAATGCTGATGTCAAGGGAAATGATTTTGAAGTGATACCATTTGGGGCAGGACGAAGGATTTG
TGCGGGTATGAGCCTAGGGTTGAGAATGGTCCAATGCTCACTGCAACACTCGTTCAAGCCTTTGATTGG
GAATTGGCTAATGGGTGGAACCGCCGACCTTAACATGGAAGAAGCCTATGGGTTGACCCTTCAAAGGG
CTGCACCCTTGGTTGTGCACCAAGGCCGAGGTTAGCCCCCTATGTGTACAAAACCTTAAGACCCGATAAA
CCGAATGCTCTTTTGTGTTTTTGTTCCTTAATATAATTGGAGTTTGTGTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 14

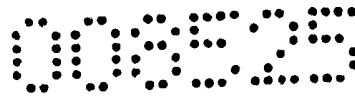


11/12

Acc. No. DQ272592| Antirrhinum majus flavonoid-3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

```
GCCGGCCTAATAACTAAAAGCCCACTCTTTCCGACCATCTATACATGCAACACCAATATTATTCTTTAAT
TACGATGGATGATATTAGCATAACCAGCTTATTGGTGCCATGTACTTTTATATTAGGGTTCTTGCTTCTA
TATTCCTTCTCAACAGAAAAGTAAAGCCACTGCCACCTGGACCGAAGCCATGGCCCATCGTCGGAAATC
TGCCACATCTTGGGCCGAAGCCCCACCAGTCGATGGCGGCGCTGGCACGGGTGCACGGCCCATTAATTCA
TCTGAAGATGGGCTTTGTGCATGTGGTTGTGGCCTCCTCAGCATCCGTTGCGGAGAAATTTCTGAAGGTG
CATGACGCAAACCTTCTCGAGCAGGCCTCCAATTCCGGGTGCAAAACACGTGGCCTACAACATCAGGACT
TGGTCTTTGCTCCTTATGGCCCACGCTGGCGGATGCTCAGGAAAATCTGTGCACTCCACCTCTTCTCCGC
CAAAGCCTTGAACGACTTCACACACGTGAGACAGGATGAGGTGGGGATCCTCACTCGCGTCTTAGCAGAT
GCAGGAGAAAACGCCGTTGAAATTAGGGCAGATGATGAACACATGCGCCACCAATGCAATAGCGCGTGTTA
TGTTGGGTCGACGCGTGGTTGGACACGCAGACTCAAAGGCGGAGGAGTTAAGGCAATGGTAGTGGAGTT
GATGGTATTAGCTGGTGTGTTCAACTTAGGTGATTTTATCCCACCTCTTGAAAAATTGGATCTTCAAGGT
GTCATTGCTAAGATGAAGAAGCTTCACTTGCCTTCGACTCGTTCTTGAGTAAGATCCTTGAAGACCACA
AGATCAACAGCTCAGATGAAACCAAAGGCCATTCGGATTTGTTGAACATGTTAATTTCTTTGAAGGACGC
TGATGATGCCGAAGGAGGAGGCTCACCGACGTAGAAATTAAGCGTTGCTCTTGAACCTGTTTGCTGCA
GGAAGTACACAACATCAAGCACTGTGGAATGGTGCATAGCTGAGTTAGTACGACATCCTGAAATCCTTG
CCCAAGTCCAAAAAGAACTCGACTCTGTTGTTGGTAAGAATCGGGTGGTGAAGGAGGCTGATCTGGCCGG
ATTACCATTCTCCAAGCGGTGTCAGGAAAATTTCCGACTCCATCCCTCCACCCCGCTCTCCCTACCG
AGGATCGCACATGAGAGTTGTGAAGTGAATGGATACTTGATTCCAAAGGGTTCGACACTTCTTGTCAATG
TTTGGGCAATTGCTCGCGATCCAAATGTGTGGGATGAACCACTAGAGTTCGGCCTGAACGATTCTTGAA
GGCGGGGAAAAGCCTAATGTCGATGTTAGAGGGAATGATTTGCAATTGATACCGTTCGGAGCGGGCCGA
AGAATTTGTGCAGGAATGAGCTTAGGAATACGTATGGTCCAGTTGTTGACAGCAACTTTGATCCATGCGT
TTGACTTTGATTTGGCGGATGGACAGTTGCCTGAAAGCTTAAACATGGAGGAAGCTTATGGGCTGACCTT
GCAACGAGCTGACCCTTTGGTAGTGACCCGAAGCCTAGGTGGCACCTCATGTTTATCAAACCTTAGGAC
TCATGTTTAGAGAACCTCTTGTTGTTTTATCAGATTGAAGTGTGATGTCCAAGACCCCTTTATTAGCAT
AAGTACCTACCCATGGCGCATCTGTAATAAAATCTGGGTCAAATGCCAAAACCTACTCGTGTGTTATCTCC
ACTTGGCAATTAAGTCTTATGTTTCAATTAGCAAAAAACCCCTGTGCACAATACCAAACCTTTGCT
CCCAATTCCTCAACTTTTCAACTTTGACTGGATGCAAAATGGCCTTTTTTGCCATATATAAAGCTTCT
AATCATTTAAGAATTTTACTTCAAAGATTTTGAACATAAAATTTCTTTTTTCATTAATAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 15



12/12

Acc. No. AF271651|AF271651 *Arabidopsis thaliana* chromosome V flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

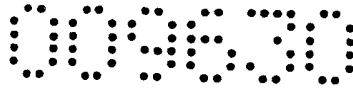
```
ATGGCAACTCTATTTCTCACAATCCTCCTAGCCACTGTCCTCTTCCCTCATCCTCCGTATCTTCTCTCACC
GTCGCAACCGCAGCCACAACAACCGTCTTCCACCGGGGCCAAACCCATGGCCCATCATCGGAAACCTCCC
TCACATGGGCACTAAGCCTCATCGAACCCCTTCCGCCATGGTTACTACTTACGGCCCTATCCTCCACCTC
CGACTAGGGTTCGTAGACGTCGTGGTCGCCGCTTCTAAATCCGTGGCCGAGCAGTTCTTGAAAATACACG
ACGCCAATTTTCGCTAGCCGACCACCAACTCAGGAGCTAAACACATGGCATATAACTATCAAGATCTTGT
CTTTGCACCTTACGGACACCGATGGAGACTGTTGAGAAAGATTAGTCTGTTCATCTATTTTCAGCTAAA
GCTCTCGAAGATTTCAAACATGTTTCGACAGGAAGAGTTGGAACGCTAACGCGGGAGCTAGTGCCTGTTG
GCACGAAACCCGTGAATTTAGGCCAGTTGGTGAACATGTGTGTAGTCAACGCTCTAGGACGAGAGATGAT
CGGACGGCGATTGTTTCGGCGCCGACGCCGATCATAAAGCTGACGAGTTTCGATCAATGGTGACGGAAATG
ATGGCTCTCGCCGGAGTATTC AACATCGGAGACTTCGTGCCGTCACTTGATTGGTTAGATTTACAAGGCG
TCGCTGGTAAAATGAAACGGCTTCACAAGAGATTCGACGCTTTTCTATCGTCGATTTTGAAAGAGCACGA
AATGAACGGTCAAGATCAAAGCATAACAGATATGCTTAGCACTTAAATCTCCCTTAAAGGAACTGATCTT
GACGGTGACGGAGGAAGCTTAAACGGATACTGAGATTAAGCCTTGCTATTGAACATGTTACAGCTGGAA
CTGACACGTCAGCAAGTACGGTGGACTGGGCTATAGCTGAACCTTATCCGTACCCCGGATATAAATGGTTAA
AGCCCAAGAAGAACTTGATATTGTTGTGGGCGTGACAGGCCTGTTAATGAATCAGACATCGCTCAGCTT
CCTTACCTTCAGGCGGTTATCAAAGAGAAATTTACGGCTTCATCCACCAACACCACTCTCGTTACCACACA
TCGCGTCAGAGAGCTGTGAGATCAACGGCTACCATATCCCGAAAGGATCGACTCTATTGACGAACATATG
GGCCATAGCCCGTGACCCGGATCAATGGTCCGACCCGTTAGCATTTAAACCCGAGAGATTCTTACCCGGT
GGTGA AAAATCCGGCGTTGATGTGAAAGGAAGCGATTTTCGAGCTAATACCGTTCGGAGCTGGGAGGAGAA
TCTGTGCCGTTTAAAGTTTAGGGTTACGTACGATTCAGTTTCTTACGGCGACGTTGGTTCAAGGATTTGA
TTGGGAATTAGCTGAGGAGTTACGCCGAGAACTGAATATGGAGGAGAGTTATGGGCTTACACTGCAA
AGAGCGGTTCCCTTGGTGGTACATCCTAAGCCAAGGTTGGCTCCGAACGTTTATGGACTCGGGTCCGGTT
AA
```

Fig. 16

Acc. No. AF313488| *Callistephus chinensis* putative flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, komplette kodierende Region

```
ATTACATCCCCCTCACATGTGCAATGACCATTTTACCCTTTATTTTCTACACATGTATCACTGCCTTAGT
GCTCTATGTATTGCTTAACCTTTTGACCCGTAACCCAAACCCGCTTCCCCCAGGTCCAACCCCATGGCCC
ATAGTTGGAACCTACCACACCTTGGCATGATACCACCACTCATTAGCGGCCTTGGCCCAAAAGTATG
GTCCGCTGATGCACCTACGCCCTCGGTTTGTGACGTGGTCGTCGTCGCGCGTCAGCATCCGTTGCGGCACA
ATTTCTAAAAAATCATGACGCCAAACTTTGCAAGTAGACCACCCAACTCTGGAGCCAAGCATATTGCCTAT
AACTATCAAGATCTTGTGTTTCGCACCTTATGGTCCAAGGTGGCGAATGCTTAGGAAAATTTGTTCCGTTT
ACTTGTTTTCCACTAAAAGCACTAGACGACTTCCGTCATGTTTCGAGAGGAAGAGGTAGCGATACTGACCG
AGTGTTAGTCCATGCGGGTGAATCAGCGGTGAAATTAGGACAACACTACTGAACGTGTGCACCACAAACGCG
TTAGCACGAGTGATGCTAGGCCGGAGAGTTTTCGCGGACGGCAGTGAAGGCCGGGAGTCGACCCAAAGG
CAGATGAGTTCAAGGACATGGTGGTGGAACTCATGGAATTAGCCGGTGAATTCAACATAGGTGACTTCAT
ACCACCACTTGACTGCCTTGATTTGCAAGGCATCACCAAAAGATGAAGAACTTCATGCTCGATTTCGAC
AAGTTTCTTAAACATCATCCTAGACGACCATAAAATCGAAAAAGGCGCGGCCGGCCGCGTCATAGTGACT
TGCTGACCACGCTGATTTCACTCAAGGATGTTGATGCTGCTGATGATGATGAAGAAGGGAACTTTGAGA
CATTGAAATCAAGGCTTTGCTCCTGAACTTATTTGCTGCAGGAACAGACACATCATCTAGTACCGTGGAA
TGGGCAGTAGCCGAACTTATTCGTCATCCGGAATATTGAAACAAGCACGCGAAGAAATGGATATCGTAG
TTGGTTCGAGACCGGCTGTAACCGAATTGGACTTAAGCCGGCTAACATTCCTACAAGCCATTGTGAAGGA
GACCTTTAGGCTCCACCTTCGACGCCACTTCCCTTCCAAGGATGGCGTCGGAGAGTTGCGAGGTGGAT
GGGTACTACATTTCCCAAAGGATCCACACTCCTTGTTAATGTATGGGCCATAGCCCAGCCGACCCAAAATGT
GGACTAACCCACTTGAGTTCAGGCCAGTCGGTTCTTACCCGGGGGTGAAAAGCCCGATGCAGATATCAA
AGGAAATGATTTTGGAGTACATACCATTTGGGGCCGGGAGAAGAATATGTGCGGGTATGAGCCTAGGGATG
AGAATGGTCCAGTTGCTCATTTGCAACATTTGGTCCAAACCTTTGATTGGGAATTGGCTAATGGGTTAGACC
CGGAGAAGCTCAACATGGAAGAAGCTTACGGGCTAACCTTCAAAGGGCTGAACCTTAAATGGTGCACCC
AAGGCCAGGCTATCTCCCATGTATATGAAAGTCGTTAAGGACTAAAACGGATTTTGGTGTTTTGGTTA
GCCAAGTTGGAATTCGGCATTTGTATTTCAAATGATTATGAAAGTAATGTCTTTGCTCTCGAATTGT
TGGTAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

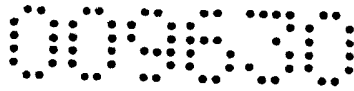
Fig. 17



Patentansprüche:

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, welche für ein Polypeptid mit Chalkon 3-Hydroxylase-Aktivität kodiert, wobei die Nukleotidsequenz SEQ ID Nr. 1 umfasst oder mindestens 60% Identität zu SEQ ID Nr. 1 aufweist oder in der Lage ist mit einem Molekül umfassend die Sequenz aus SEQ ID Nr. 1 zu hybridisieren, wobei die Nukleotidsequenz für ein Polypeptid kodiert, welches das Motiv $FASRPLSX_1X_2GX_3(GSAGGD)_n$ umfasst, wobei X_1 Threonin oder Serin, X_2 Alanin oder Glycin, X_3 eine beliebige Aminosäuresequenz mit 50 bis 200 Aminosäuren und n 0 oder 1 ist.
2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Motiv $FASRPLSTAGX_3(GSAGGD)_n$ oder $FASRPLSSGGX_3(GSAGGD)_n$ ist.
3. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2.
4. Zelle, insbesondere Pflanzenzelle, umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2 oder einen Vektor gemäß Anspruch 3.
5. Transgene Pflanze umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2 oder einen Vektor gemäß Anspruch 3.
6. Transgene Pflanze nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Zierpflanzen, insbesondere Petunien, Usambaraveilchen, Azaleen, Rhododendren, Pelargonien, Fuchsien, Cyclamen, Weihnachtssterne, Antirrhinum, Aster (Asteraceae), Begonia (Begoniaceae), Callistephus (Asteraceae), Campanula (Campanulaceae), Catharanthus (Apocynaceae), Chrysanthemum (Asteraceae), Cineraria (Asteraceae), Dedanthremum (Asteraceae), Dianthus (Caryophyllaceae), Dahlia (Asteraceae), Euphorbia (Euphorbiaceae), Gerbera (Asteraceae), Hydrangea (Hydrangeaceae), Lilium (Liliaceae), Lisianthus (= Eustoma (Gentianaceae)), Myosotis (Boraginaceae), Nierembergia (Solanaceae), Orchidaceae, Osteospermum (Asteraceae), Rosa (Rosaceae), Scaevola (Goodeniaceae), Sinningia (Gesneriaceae),

NACHGEREICHT



R 54497

- 19 -

A 1342/2009

Streptocarpus (Gesneriaceae), Torenia (Linderniaceae), Tulipa (Liliaceae), Verbena (Verbenaceae), Veronica (Plantaginaceae), Viola (Violaceae) und Malus sp..

7. Schnittblume oder Samen einer transgenen Pflanze nach Anspruch 5 oder 6.

NACHGEREICHT