

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. Dezember 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/78981 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 15/82, 15/53, 15/11, A01H 5/00, A01N 65/00 (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05259 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 7. Juni 2000 (07.06.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 27 575.0 17. Juni 1999 (17.06.1999) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): RADEMACHER, Wilhelm [DE/DE]; Austraße 1, D-67117 Limburgerhof (DE). SPEAKMAN, John-Bryan [GB/DE]; In den Hahndornen 7, D-67273 Bobenheim (DE). AMMERMANN, Eberhard [DE/DE]; Von-Gagern-Strasse 2, D-64646 Heppenheim (DE). JABS, Thorsten [DE/DE]; Gleiwitzer Strasse 3, D-67105 Schifferstadt (DE). HERBERS, Karin [DE/DE]; Am Hange 6, D-06484 Quedlinburg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

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



**WO 00/78981 A1**

(54) Title: METHOD OF INCREASING THE RESISTANCE OF CULTIVATED PLANTS TO PHYTOPATHOGENIC FUNGI AND BACTERIA BY METHODS OF MOLECULAR GENETICS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER WIDERSTANDSKRAFT VON KULTURPFLANZEN GEGEN PHYTOPATHOGENE PILZE UND BAKTERIEN MIT HILFE MOLEKULARGENETISCHER METHODEN

(57) Abstract: The invention relates to a method of increasing the resistance of cultivated plants to bacterial and fungal pathogens by producing a plant by means of molecular genetics in which the activity of the enzyme flavonone-3-hydroxylase is reduced.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen bakterielle und pilzliche Pathogene, dadurch gekennzeichnet, dass mit molekulargenetischen Methoden eine Pflanze hergestellt wird, in der die Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase reduziert ist.

Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen phytopathogene Pilze und Bakterien mit Hilfe molekulargenetischer Methoden

5

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen bakterielle  
10 und pilzliche Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß mit molekulargenetischen Methoden eine Pflanze hergestellt wird, in der die Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase reduziert ist.

Das Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym  
15 Flavanon-3-hydroxylase durch molekularbiologische Verfahren (z.B. Anti-Sense-Konstrukt, Co-Suppression, der Expression spezifischer Antikörper oder der Expression spezifischer Inhibitoren) ganz oder teilweise, andauernd oder vorübergehend, in der gesamten Pflanze oder in Teilen der Pflanze in seiner Aktivität gehemmt  
20 wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Pflanzen mit erhöhter Widerstandskraft gegen bakterielle und pilzliche Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß durch molekulargenetische  
25 Methoden die Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase reduziert ist.

Die Produktivität von Kulturpflanzen kann in vielfältiger Weise durch Streßfaktoren reduziert werden. Zu nennen sind hier unter  
30 anderem: Virenerkrankungen, bakterielle und pilzliche Pathogene, schädigende Insekten, Nematoden, Schnecken, Wildverbiß, Hitze, Kühle, Kälte, Wassermangel, zu hoher Wassergehalt des Bodens, Bodenversalzung, zu hohe Strahlungsintensität, zu hoher Ozongehalt, Konkurrenz um Licht, Wasser und Nährstoffe durch Begleitflora,  
35 unsachgemäße oder nicht optimal auszubringende Herbizidanwendungen ( besonders in Obstkulturen ), Behandlungen mit Herbiziden, Insektiziden, Fungiziden, Bioregulatoren oder Blattdüngern von zu geringer Selektivität, Blattapplikationen von Pflanzenschutzmitteln oder Düngern während intensiver Sonneneinstrahlung.

40

Eine Reihe dieser durch Stressoren hervorgerufenen Probleme kann durch den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, durch die Verwendung resistenter Pflanzenmaterials oder geeigneter Anbautechniken minimiert werden. Der Umfang dieser Möglichkeiten ist jedoch be-  
45 grenzt. Insbesondere Bakteriosen sind, wenn überhaupt, nur sehr schwer zu bekämpfen. Dabei werden (z.B. gegen Feuerbrand bei Apfel und Birne) Antibiotika wie Streptomycin oder Tetracycline

eingesetzt, was die Gefahr einer Resistenzbildung auch bei Humanpathogenen in sich birgt. Weiterhin zeigen z.B. pilzliche Pathogene häufig eine Anpassung an Fungizide, so daß deren Wirksamkeit nachläßt. Eine ähnliche Anpassung besteht auch bei "pathogenresistenten" Züchtungen, die durch konventionelle Verfahren hergestellt werden.

Ein Bedarf an Pflanzen, die gegen Pathogene widerstandsfähig sind, besteht nicht nur bei einjährigen ackerbaulichen oder gärtnerischen Kulturen, sondern auch bei wertvollen Dauerkulturen wie Obst und Wein.

Aufgabe der Erfindung war es, ein einfaches und kostengünstiges Verfahren zur dauerhaften Verbesserung der Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle und pilzliche Pathogene, insbesondere bei Kulturpflanzen, zu finden.

Ausgehend von physiologischen Untersuchungen mit Wachstumsregulatoren aus der Gruppe der Acylcyclohexadione wurden nun überraschend gentechnologische Verfahren verfügbar, mit deren Hilfe sich Kulturpflanzen erzeugen lassen, die gegen eine Reihe von phytopathogenen Bakterien und Pilzen widerstandsfähig sind.

Acylcyclohexadione wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl (ältere Bezeichnung: Cimectacarb) werden als Bioregulatoren zur Hemmung des pflanzlichen Längenwachstums eingesetzt. Ihre bioregulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß sie die Biosynthese von längenwachstumsfördernden Gibberellinen blockieren. Dabei hemmen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu 2-Oxoglutarsäure bestimmte Dioxygenasen, die 2-Oxoglutarsäure als Co-Substrat benötigen (Rademacher, W, Biochemical effects of plant growth retardants, in: Plant Biochemical Regulators, Gausman, HW (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-200 (1991)). Es ist bekannt, daß derartige Verbindungen auch in den Stoffwechsel von Phenolen eingreifen und so bei mehreren Pflanzenarten eine Hemmung der Anthocyanbildung bewirken können (Rademacher, W et al., The mode of action of acylcyclohexanediones - a new type of growth retardant, in: Progress in Plant Growth Regulation, Karssen, CM, van Loon, LC, Vreugdenhil, D (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)). Derartige Effekte auf den Haushalt phenolischer Inhaltsstoffe werden als ursächlich für die Nebenwirkung von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand angegeben (Rademacher, W et al., Prohexadione-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features, Poster auf dem 25<sup>th</sup> Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, 7.-10. Juli 1998, Chicago). A. Lux-Endrich (Dissertation Technische Universität München in Weihenstephan, 1998) findet im

Verlauf ihrer Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand, daß es in Zellkulturen von Apfel durch Prohexadion-Ca zu einer mehrfachen Erhöhung des Gehaltes an phenolischen Substanzen kommt und daß dabei eine Reihe von sonst  
5 nicht vorhandenen Phenolen auftritt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde weiterhin gefunden, daß unter dem Einfluß von Prohexadion-Ca relativ hohe Mengen von Luteoliflavan und Eriodyctiol in Sproßgewebe von Apfel auftreten. Luteoliflavan kommt in Apfelgewebe normalerweise nicht vor und Eriodyctiol tritt als Inter-  
10 mediat des Flavonoidstoffwechsels nur in geringen Mengen auf. Die zu erwartenden Flavonoide Catechin und Cyanidin waren im behandelten Gewebe jedoch nicht nachweisbar oder traten nur in deutlich reduzierten Mengen auf (S. Römmelt et al, Vortrag 8<sup>th</sup> International Workshop on Fire Blight, Kusadasi, Türkei, 12.-15. Okto-  
15 ber 1998).

Es kann als gesichert gelten, daß Prohexadion-Ca, Trinexapacethyl und andere Acylcyclohexadione 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen inhibieren, die im Stoffwechsel phenolischer Sub-  
20 stanzen von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich primär um Chalconsynthetase (CHS) und um Flavanon-3-hydroxylase (F3H) (W. Heller und G. Forkmann, Biosynthesis, in: The Flavonoids, Harborne, JB (ed.), Chapman and Hall, New York, 1988). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Acylcyclohexadione auch  
25 weitere, bislang unbekannte, 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen hemmen. Es dürfte ferner naheliegend sein, daß ein Mangel an Catechin, Cyanidin oder anderen Endprodukten der Flavonoid-synthese von der Pflanze registriert wird und daß über einen  
30 Feedback-Mechanismus die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylalaninammoniumlyase (PAL) erhöht wird. Durch die weiterhin existierende Hemmung von CHS und F3H können diese Flavonoid-Endprodukte jedoch nicht gebildet werden, und es kommt zu einer vermehrten  
Bildung von Luteoliflavan, Eriodyctiol und anderer Phenole (Abbildung 1).

35

Durch die Reduktion der Enzymaktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase (F3H) werden die Flavonoide Eriodyctiol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie  
40 homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet.

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäure (p-Cumarsäure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere werden nach Reduktion der Enzymaktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase (F3H) in Pflanzen

festgestellt. Ebenso erhöht sich die Konzentration der Chalcone, wie z.B. Phloretin, und der Stilbene, wie z.B. Resveratrol.

Durch Reduktion der Enzymaktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase wird auch die Konzentration der Glykoside der Flavonoide, der phenolischen Verbindungen, der Chalcone und der Stilbene erhöht.

Ausgehend von diesen Befunden und Schlußfolgerungen wurden gentechnisch veränderte Kulturpflanzen erzeugt, in denen F3H durch Anti-Sense-Konstrukte ganz oder teilweise, dauerhaft oder vorübergehend, in der gesamten Pflanze oder in einzelnen Pflanzenorganen oder -geweben in ihren Aktivitäten reduziert war, mit der Folge, daß der Gehalt an phenolischen Verbindungen in der ganzen Pflanze reduziert ist. Experimentell konnte sodann gezeigt werden, daß diese Pflanzen in ihrer Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle und/oder pilzliche Pathogene erhöht sind.

Alternativ zur Herstellung von Pflanzen, die mit Hilfe der Antisense Technologie in ihrer Flavanon-3-hydroxylase Aktivität reduziert sind, lassen sich auch andere literaturbekannte molekulargenetische Methoden wie Co-Suppression oder die Expression von spezifischen Antikörpern verwenden, um diesen Effekt zu erreichen.

25

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen den Befall mit bakteriellen und pilzlichen Pathogenen durch Reduktion der Flavanon-3-hydroxylase Enzymaktivität kann erfolgreich bei folgenden Kulturpflanzen ausgeübt werden: Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Reis, Mais, Hirse, Zuckerrohr, Banane, Tomate, Tabak, Paprika, Kartoffel, Raps, Zuckerrübe, Soja, Baumwolle, Obstgehölze aus der Familie der Rosaceen, wie Apfel und Birne, Pflaume, Zwetschge, Pfirsich, Nektarine und Kirsche sowie Weinreben.

35

Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen *Venturia inaequalis* in Apfel und Birne sowie gegen *Botrytis cinerea* bei Weinreben.

Transgene Pflanzen mit reduzierter Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase hergestellt nach der in den Beispielen beschriebenen Methode zeigen überraschenderweise eine erhöhte Widerstandskraft gegenüber dem Befall mit phytopathogenen Bakterien. Dies konnte am Beispiel des Befalls von transgenen Tomatpflanzen, deren Flavanon-3-hydroxylase Aktivität reduziert ist,

45

mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) gezeigt werden, siehe Beispiel 3

Pflanzen, deren Flavanon-3-hydroxylase mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden reduziert wurde, zeigten auch eine erhöhte Widerstandskraft gegen Befall mit *Erwinia amylovora* und anderen phytopathogenen Bakterien. Die wichtigsten phytopathogenen Bakterien können aus der Publikation "European Handbook of Plant Diseases", Eds. Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A. Phillips, 10 D.H. and Archer, S.A. Blackwell Scientific Publications, 1988, entnommen werden.

Insbesondere eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft gegen folgende pflanzenpathogene Pilze:

- 15 Erysiphe graminis (echter Mehltau) an Getreide  
Erysiphe cichoracearum und Sphaerotheca fuliginea an Kürbisgewächsen  
Podospaera leucotricha an Äpfeln,
- 20 Uncinula necator an Reben,  
Puccinia-Arten an Getreide,  
Rhizoctonia-Arten an Baumwolle, Reis und Rasen,  
Ustilago-Arten an Getreide und Zuckerrohr,  
Venturia -Arten (Schorf) an Äpfeln und Birnen
- 25 Helminthosporium-Arten an Getreide,  
Septoria-Arten an Weizen  
Botrytis cinerea (Grauschimmel) an Erdbeeren, Gemüse, Zierpflanzen und Reben,  
Cercospora arachidicola an Erdnüssen,
- 30 Pseudocercospora herpotrichoides an Weizen und Gerste,  
Pyricularia oryzae an Reis,  
Phytophthora infestans an Kartoffeln und Tomaten,  
Plasmopara viticola an Reben,  
Pseudoperonospora-Arten in Hopfen und Gurken,
- 35 Alternaria-Arten an Gemüse und Obst,  
Mycosphaerella-Arten in Bananen und Erdnüssen sowie  
Fusarium- und Verticillium-Arten in Getreide, Gemüse und Zierpflanzen.

#### 40 Beispiel 1

Klonierung des Gens einer Flavanone-3-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* Mill.cv. MoneyMaker.

- 45 Reife Tomatenfrüchte von *Lycopersicon esculentum* Mill.cv. MoneyMaker wurden gewaschen, getrocknet und mittels einer sterilen Klinge das Perikarp von Samen, mittlere Kolumella und Holzteilen

- befreit. Das Perikarp (ca. 50 g) wurde in fluessigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschliessend in einem Mixer zerkleinert. Das zerkleinerte Material wurde in einem vorgekühlten Mörser mit 100 ml Homogenisierungs-Medium versetzt und gemischt.
- 5 Die Suspension wurde dann in Zentrifugenbecher überführt, indem sie durch sterile Mulltücher gepreßt wurde. Anschließend wurde 1/10 Vol 10% SDS hinzugefügt und gut gemischt. Nach 10 Minuten auf Eis, wurde 1 Vol Phenol/Chloroform zugegeben, der Zentrifugenbecher verschlossen und gut gemischt. Nach 15 minütiger
- 10 Zentrifugation bei 4000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es schlossen sich drei weitere Phenol/Chloroform Extraktionen und eine Chloroform Extraktion an. Im folgenden wurde 1 Vol 3 M NaAc und 2.5 Vol Ethanol zugegeben. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte über Nacht bei -20°C. Am näch-
- 15 sten Morgen wurden die Nukleinsäuren für 15 Minuten bei 10000 rpm in der Kühlzentrifuge (4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5-10 ml kaltem 3 M NaAc resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen. Das vollständig getrocknet Pellet
- 20 wurde in ca. 0,5 ml sterilem DEPC Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

- 20 µg gesamt RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetat-Lösung, 2 µl 1M Magnesiumsulfat-Lösung versetzt und auf 100 µl End-
- 25 volumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde ein Microliter Rnase freie Dnase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37° Grad inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA
- 30 aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco BRL) in cDNA umgeschrieben.

- Unter Verwendung von Aminosäuresequenzen die aus für Flavone-3-Hydroxylase kodierenden cDNA Klonen abgeleitet wurden,
- 35 konnten konservierte Bereiche in der Primärsequenz identifiziert werden (Britsch et al., Eur. J. Biochem. 217, 745 -754 (1993), die als Grundlage für das Design von degenerierten PCR Oligonukleotiden dienten. Das 5' Oligonukleotid wurde unter Verwendung der Peptidsequenz SRWPK (Aminosäure 147-152 in der Sequenz FL3H
- 40 PETHY aus *Petunia hybrida*) ermittelt und hatte folgende Sequenz:

5'-TCI (A/C) G (A/G) TGG CC(A/C/G) GA (C/T) AA (A/G) CC-3.

Die Sequenz des unter Verwendung der Peptidsequenz DHQAVV (Aminosäure 276281 in der Sequenz FL3H PETHY aus *Petunia hybrida*) abgeleiteten Oligonukleotides lautete wie folgt: 5'-CTT CAC ACA (C/G/T) GC (C/T) TG (A/G)TG (A/G)TC-3.

5

Die PCR-Reaktion wurde unter Verwendung der *tTth*-Polymerase von Perkin-Elmer nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Template wurden 1/8 der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

10

30 Zyklen

94 Grad 4 sec

40 Grad 30 sec

72 Grad 2 min

15 72 Grad 10 min

Das Fragment wurde nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-T von Promega kloniert.

- 20 Die Richtigkeit des Fragmentes wurde durch Sequenzierung überprüft. Das PCR Fragment wurde unter Verwendung der im Polylinker des Vektors pGEM-T vorhandenen Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Pst*I isoliert und die überstehenden Enden unter Verwendung der T4-Polymerase in glatte Enden überführt. Dieses Fragment
- 25 wurde in einen *Sma*I (blunt)geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, *Plant Sci.* 66: 221 -230 (1990)) kloniert (siehe Abbildung 2). Dieser enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., *Cell* 21: 285 - 294 (1980)) und das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al.,
- 30 EMBO J. 3: 835 - 846 (1984)). Dieser Vector vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Die erhaltenen DNA Konstrukte enthielten das PCR Fragment in Sense und Antisense Orientierung. Das Antisensekonstrukt wurde zur Erzeugung transgener Pflanzen eingesetzt.

35

Abbildung 2: Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus). Fragment B das Fragment des F3H Gens in Antisense-Orientierung. Fragment C (192 Bp) enthält das Terminationssignal des Octopin-Syn-

40 thase Gens.

Klonierung eines größeren cDNA Fragmentes der Flavanone-3-Hydroxylase aus *Lycopersicon esculentum* Mill.cv. Moneymaker unter Verwendung des 5'RACESystems.

45



Um auszuschließen, dass die Erzeugung von Pflanzen mit reduzierter mRNA Fließgleichgewichtsmenge der F3H aufgrund der geringen Größe des im Antisensekonstrukt verwendeten F3H PCR Fragmentes nicht erfolgreich ist, sollte ein zweites Antisense-Konstrukt unter Verwendung eines größeren F3H Fragmentes erzeugt werden.

Zum Zweck der Klonierung eines größeren Fragmentes der F3H wurde die 5'RACE Methode (System for Rapid amplification of cDNA ends) angewendet.

10

Verlängerung des F3H PCR Fragmentes durch die 5'RACE-Methode unter Verwendung des 5'RACE System for rapid amplification of cDNA ends, Version 2~0 von Life Tecgnologies™.

15 Aus reifen Tomatenfrüchten von *Lycopersicon esculentum* Mill.cv. Moneymaker wurde gesamt RNA isoliert (siehe oben).

Die cDNA Erststrang-Synthese wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des GSP-1 (Gen spezifischer Primer) 5'-TTCAC-

20 CACTGCCTGGTGGTCC-3' durchgeführt. Im Anschluß an einen Rnase Verdau, wurde die cDNA unter Anwendung des GlassMAX spin Systems von Life Tecgnologies™ gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

An das 3'Ende der gereinigten einzelsträngigen F3H cDNA wurde unter Verwendung der terminalen deoxynukleotidyl-Transferase gemäß den Herstellerangaben ein Cytosin Homopolymer addiert.

Die Amplifikation der 5' verlängerten F3H cDNA erfolgte unter Verwendung eines zweiten Gen spezifischen Primers (GSP-2) der im Bereich 3' vor der GSP-1 Erkennungssequenz bindet und somit eine „nested“ PCR ermöglichte. Als 5'Primer wurde der vom Hersteller gelieferte "5'RACE abridged anchor primer" verwendet, der komplementär zum homopolymeren dC-Schwanz der cDNA ist.

35 Das so amplifizierte und als F3H<sub>extended</sub> bezeichnete cDNA Fragment wurde nach Herstellerangaben in den Vektor pGEM-T von Promega kloniert.

Die Identität der cDNA wurde durch Sequenzierung bestätigt.

40

Das F3H<sub>extended</sub> cDNA Fragment wurde unter Verwendung der im Polylinker des Vektors pGEM-T vorhandenen Restriktionsschnittstellen NcoI und PstI isoliert und die überstehenden Enden unter Verwendung der T4-Polymerase und glatter Enden überführt. Dieses Fragment wurde in einen SmaI (blunt) geschnittenen Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990) kloniert (siehe Abbildung 3). Dieser enthält den 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus)

(Franck et al., 1980) und das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., 1984). Dieser Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin. Die erhaltenen DNA Konstrukte enthielten das PCR Fragment in Sense und Antisense Orientierung. Das Antisensekonstrukt wurde zur Erzeugung transgener Pflanzen eingesetzt.

Abbildung 3: Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des CaMV (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus). Fragment B das Fragment des F3H Gens in Antisense-Orientierung. Fragment C (192 Bp) enthält das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

#### Beispiel 2

15

Herstellung transgener *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker die ein Teilfragment der Flavanone-3-Hydroxylase in Antisense Orientierung exprimieren.

20 Es wurde die Methode nach Ling et al., Plant Cell Report 17, 843 - 847 ( 1998 ) genutzt. Die Kultivierung erfolgt bei ca. 22°C unter einem 16 h - Licht / 8 h - Dunkel - Regime.

Tomatensamen (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker) wurden durch 10 minütige Inkubation in 4%iger Natriumhypochloritlösung inkubiert, anschließend 3 - 4 mal mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und auf MS Medium mit 3 % Saccharose, pH 6,1 zur Keimung ausgelegt. Nach einer Keimdauer von 7 - 10 d konnten die Kotyledonen für die Transformation eingesetzt werden.

30

Tag 1: Petrischalen mit dem Medium "MSBN" wurden mit 1,5 ml einer ca. 10 d alten Tabaksuspensionskultur überschichtet. Die Platten wurden mit Folie abgedeckt und bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur inkubiert.

35

Tag 2: Auf die mit der Tabaksuspensionskultur beschichteten Platten wurde steriles Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Darauf wurden die quer geschnittenen Keimblätter mit der Oberseite nach unten aufgelegt. Die Petrischalen wurden für 3 Tage im Kulturreaum inkubiert.

40

Tag 5: Die Agrobakterienkultur (LBA4404) wurde durch Zentrifugation bei ca. 3000g für 10 min sedimentiert und in MS-Medium resuspendiert, so daß die OD 0,3 beträgt. In diese Suspension wurden die Keimblattstückchen gegeben, die unter leichtem Schütteln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Keimblattstückchen auf sterilem Filterpa-

45

pier etwas abgetrocknet und wieder zurück auf ihre Ausgangsplatten für die Fortsetzung der Cocultivierung für 3 Tage im Kulturrenraum gelegt.

- 5 Tag 8: Die cocultivierten Keimblattstückchen wurden auf MSZ2K50+ $\beta$  gelegt und für die nächsten 4 Wochen im Kulturrenraum inkubiert. Danach erfolgte die Subkultivierung.

Sich bildende Sprosse wurden auf Wurzelinduktionsmedium gebracht.

10

Nach erfolgreicher Bewurzelung konnten die Pflanzen getestet und ins Gewächshaus überführt werden.

Beispiel 3

15

Transgene Tomatenpflanzen mit reduzierter Flavanon-3-hydroxylase Aktivität wurden mit *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) infiziert.

- 20 Cmm wurde auf Hefe-Dextrose-Ca Agar (YDC) bei 28°C 2 Tage kultiviert. Die Bakterien wurden mit sterilem Wasser abgeschwemmt und ihre Zelldichte bestimmt. Zur Inokulation wurde die Zelldichte mit sterilem Wasser auf 10<sup>6</sup> Zellen / ml eingestellt. Die Injektionen wurden mit Injektionsnadeln (Nr. 20), die mit der Bakterien-
- 25 suspension gefüllt waren, durchgeführt. Sie erfolgten in die Blattachsel des obersten voll entwickelten Blattes junger Pflanzen, die insgesamt 3-4 Blätter besaßen. Die Evaluierung der Infektion erfolgte durch Beurteilung des sich entwickelnden Phänotyps.

30

Während in Wildtyp-Pflanzen mehr als 75 % der Blätter verwelkt waren, war demgegenüber in den transgenen Tomatenpflanzen ein signifikant geringerer Verwelkungsgrad zu verzeichnen.

35 Beispiel 4

Test auf Erhöhung der Widerstandskraft gegen den Befall mit *Phytophthora infestans* in Tomaten mit Flavanon-3-hydroxylase in Antisens-Orientierung.

40

- Die Blätter von nicht gentechnisch modifizierten bzw. erfindungsgemäß gentechnisch modifizierten Tomatenpflanzen der Sorte "Money-maker" wurden eine Woche nach dem 4-Blattstadium mit einer wäßrigen Zoosporenaufschwemmung von *Phytophthora infestans* infiziert.
- 45 ziert. Anschließend wurden die Pflanzen in einer wasserdampfgesättigten Kammer bei Temperaturen zwischen 16 und 18°C aufgestellt. Nach 6 Tagen hatte sich die Krautfäule auf den gentech-

nisch nicht modifizierten Kontrollpflanzen stark entwickelt. Tomatenpflanzen, die ein Antisens-Konstrukt der Flavanon-3-hydroxylase exprimierten zeigten einen deutlich geringeren Befall mit *Phytophthora infestans* als die Kontrolle.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung der Widerstandskraft von Kulturpflanzen gegen bakterielle und pilzliche Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß mit molekulargenetischen Methoden eine Pflanze hergestellt wird, in der die Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase reduziert ist.  
5
- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym Flavanon-3-hydroxylase durch molekularbiologische Verfahren (z.B. Anti-Sense-Konstrukt, Co-Suppression, der Expression spezifischer Antikörper oder der Expression spezifischer Inhibitoren) ganz oder teilweise, andauernd oder vorübergehend, in der gesamten Pflanze oder in Teilen der Pflanze in seiner Aktivität gehemmt wird.  
15
3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Kulturpflanzen um Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Reis, Mais, Hirse, Zuckerrohr, Banane, Tomate, Tabak, Paprika, Kartoffel, Raps, Zuckerrübe, Soja, Baumwolle, Obstgehölze aus der Familie der Rosaceen, wie Apfel und Birne, Pflaume, Zwetschge, Pfirsich, Nektarine und Kirsche sowie um Weinreben handelt.  
20
4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Widerstandskraft gegen *Venturia inaequalis* in Apfel und Birne erhöht wird.  
25
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Widerstandskraft gegen *Botrytis cinerea* bei Weinrebe erhöht wird.  
30
6. Pflanze mit erhöhter Widerstandskraft gegen bakterielle und pilzliche Pathogene, dadurch gekennzeichnet, daß durch molekulargenetische Methoden die Aktivität des Enzyms Flavanon-3-hydroxylase reduziert ist.  
35

40

45

Abbildung 1

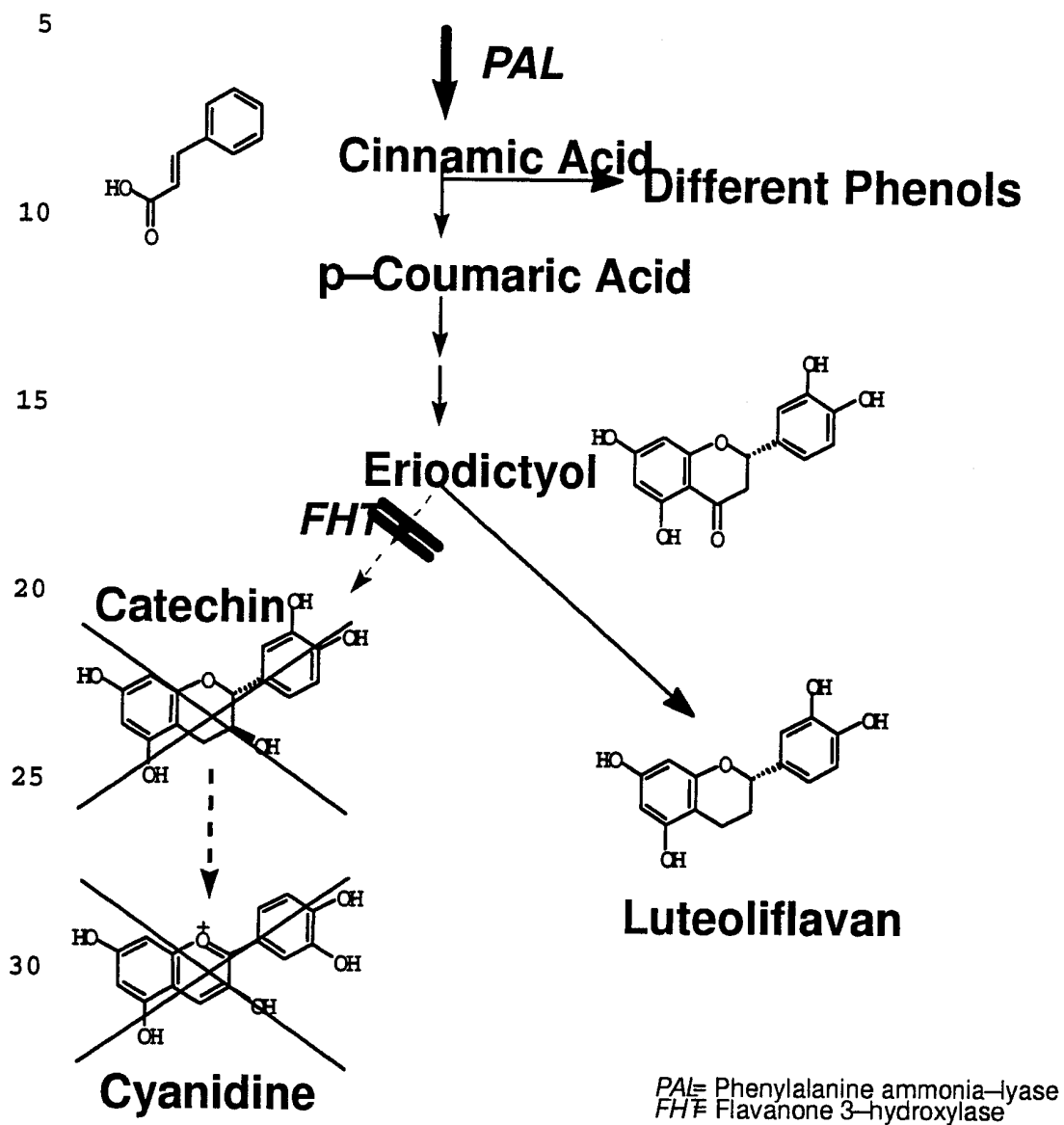
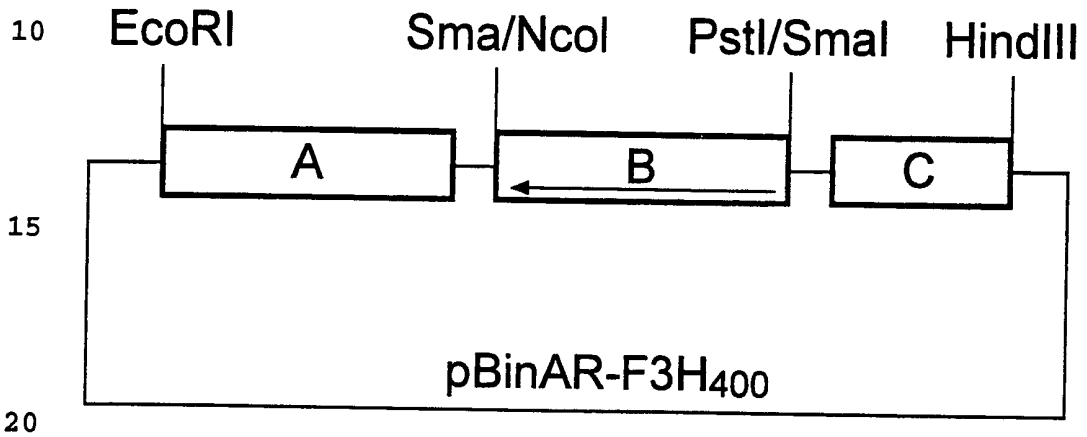


Abbildung 2

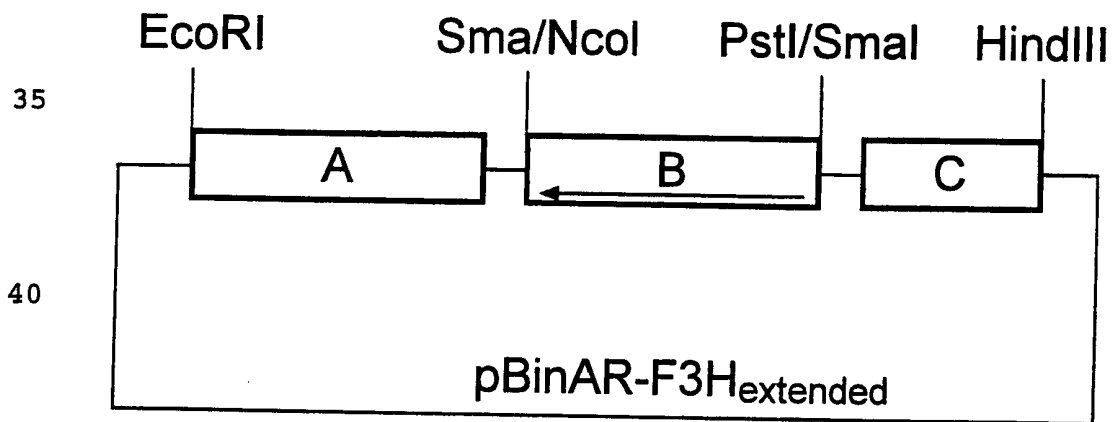
5



25

Abbildung 3

30



45

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/EP 00/05259

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	C12N15/82	C12N15/53
	C12N15/11	A01H5/00
		A01N65/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7	C12N	A01H A01N
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OVADIS ET AL: "A highly efficient procedure for generating carnation plants with novel traits" ACTA HORTICULTURAE, INTERNATIONAL SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, ,NL, 27 July 1998 (1998-07-27), pages 49-51, XP000946845 ISSN: 0567-7572 the whole document <div style="text-align: center;">--- -/--</div>	6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 October 2000	07/11/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Maddox, A	



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No

PCT/EP 00/05259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TANAKA Y ET AL: "METABOLIC ENGINEERING TO MODIFY FLOWER COLOR" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, JAPANESE SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, XX, vol. 39, November 1998 (1998-11), pages 1119-1126, XP000922977 ISSN: 0032-0781 page 1122, right-hand column -page 1125 & ZUKER, A., ET AL.: ABST. IX. INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1998, page 35	6
X	WO 93 18142 A (UNIV WASHINGTON) 16 September 1993 (1993-09-16) page 5 -page 11	6
X	WO 97 21816 A (ZENECA LTD ; MANNING KENNETH (GB)) 19 June 1997 (1997-06-19) the whole document	6
X	DEDIO J ET AL: "MOLECULAR CLONING OF THE FLAVANONE 3SS-HYDROXYLASE GENE (FHT) FROM CARNATION (DIANTHUS CARYOPHYLLUS) AND ANALYSIS OF STABLE AND UNSTABLE FHT MUTANTS" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, DE, SPRINGER, BERLIN, vol. 90, no. 5, 1995, pages 611-617, XP000915009 ISSN: 0040-5752 the whole document	6
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06) RADEMACHER W ET AL: "Induction of resistance against bacterial and fungal pathogens in apple by prohexadione-Ca." Database accession no. PREV199900379593 XP002150833 abstract & PHYTOPATHOLOGY, vol. 89, no. 6 SUPPL., June 1999 (1999-06), page S63 Annual Meeting of the American Phytopathological Society; Montreal, Quebec, Canada; August 7-11, 1999 ISSN: 0031-949X	6
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 00/05259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!                      BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,                      PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)                      COSTA G ET AL: "Reduction of fire blight                      incidence in pears, cv. 'Abate Fetel,' by                      the plant growth regulator                      prohexadione-Ca."                      Database accession no. PREV199900382649                      XP002150834                      abstract                      &amp; PHYTOPATHOLOGY,                      vol. 89, no. 6 SUPPL.,                      June 1999 (1999-06), page S18                      Annual Meeting of the American                      Phytopathological Society;Montreal,                      Quebec, Canada; August 7-11, 1999                      ISSN: 0031-949X</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!                      BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,                      PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)                      COSTA G ET AL: "Prohexadione-Ca: Growth                      regulation and reduction of fire blight                      incidence in pears, cv. 'Abate Fetel'."                      Database accession no. PREV199900407325                      XP002150835                      abstract                      &amp; HORTSCIENCE,                      vol. 34, no. 3, June 1999 (1999-06), page                      481                      96th Annual International conference of                      the American Society for Horticultural                      Science;Minneapolis, Minnesota, USA; July                      27-31, 1999                      ISSN: 0018-5345</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!                      BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,                      PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)                      RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:                      Effects against scab in apples."                      Database accession no. PREV199900376570                      XP002150836                      abstract                      &amp; PHYTOPATHOLOGY,                      vol. 89, no. 6 SUPPL.,                      June 1999 (1999-06), pages S63-S64,                      Annual Meeting of the American                      Phytopathological Society;Montreal,                      Quebec, Canada; August 7-11, 1999                      ISSN: 0031-949X</p>	6

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 00/05259

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!                      BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,                      PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)                      RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:                      Induction of resistance against bacterial                      and fungal pathogens in apple."                      Database accession no. PREV199900407495                      XP002150837                      abstract                      &amp; HORTSCIENCE,                      vol. 34, no. 3, June 1999 (1999-06), pages                      535-536,                      96th Annual International conference of                      the American Society for Horticultural                      Science; Minneapolis, Minnesota, USA; July                      27-31, 1999                      ISSN: 0018-5345</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!                      BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,                      PHILADELPHIA, PA, US; June 1999 (1999-06)                      RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:                      Effects against apple scab (<i>Venturia                      inaequalis</i>)."                      Database accession no. PREV199900412250                      XP002150838                      abstract                      &amp; HORTSCIENCE,                      vol. 34, no. 3, June 1999 (1999-06), page                      480                      96th Annual International conference of                      the American Society for Horticultural                      Science; Minneapolis, Minnesota, USA; July                      27-31, 1999                      ISSN: 0018-5345</p>	6
P, X	<p>WO 99 43825 A (DU PONT ;ALLEN STEPHEN M                      (US); FADER GARY M (US); KINNEY ANTHONY J)                      2 September 1999 (1999-09-02)                      the whole document</p>	6
E	<p>WO 00 50613 A (VAINSTEIN ALEXANDER ;YISSUM                      RES DEV CO (IL); OVADIS MARIANNA (IL);)                      31 August 2000 (2000-08-31)                      page 29 -page 34</p>	6
A	<p>WO 93 18171 A (PIONEER HI BRED INT ;UNIV                      WASHINGTON (US))                      16 September 1993 (1993-09-16)                      the whole document</p>	1-6
	<p style="text-align: center;">-/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No

PCT/EP 00/05259

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; 1998            RADEMACHER W: "Prohexadione-Ca: Uses and            modes of action of a plant bioregulator            with interesting physiological            properties."            Database accession no. PREV200000396673            XP002150839            abstract            &amp; BULGARIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY,            no. Special Issue, 1998, page 303            11th Congress of the Federation of            European Societies of Plant            Physiology; Varna, Bulgaria; September            07-11, 1998            ISSN: 1310-4586</p>	1-6
A	<p>SKADHAUGE B ET AL: "The role of the            barley testa layer and its flavonoid            content in resistance to Fusarium            infections"            HEREDITAS, SE, LUND,            vol. 126, no. 2, 1997, pages 147-160,            XP002081490            ISSN: 0018-0661            the whole document</p>	1-6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/EP 00/05259
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9318142    A	16-09-1993	AU 668548 B	09-05-1996
		AU 3786493 A	05-10-1993
		BG 99033 A	29-09-1995
		BR 9306047 A	18-11-1997
		CA 2131704 A	16-09-1993
		EP 0630403 A	28-12-1994
		HU 69991 A	28-09-1995
		JP 7506963 T	03-08-1995
		NZ 251069 A	26-01-1996
		US 5733759 A	31-03-1998
WO 9721816    A	19-06-1997	AU 1106297 A	03-07-1997
WO 9943825    A	02-09-1999	AU 2766099 A	15-09-1999
WO 0050613    A	31-08-2000	NONE	
WO 9318171    A	16-09-1993	US 5432068 A	11-07-1995
		AU 682001 B	18-09-1997
		AU 3799093 A	05-10-1993
		BG 99101 A	28-07-1995
		BR 9306066 A	13-01-1998
		CA 2131819 C	10-09-1996
		EP 0631630 A	04-01-1995
		HU 67838 A	29-05-1995
		JP 7507680 T	31-08-1995
		KR 196622 B	15-06-1999
NZ 251139 A	28-05-1996		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05259

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPK 7	C12N15/82	C12N15/53
	C12N15/11	A01H5/00
		A01N65/00
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)		
IPK 7	C12N	A01H A01N
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	OVADIS ET AL: "A highly efficient procedure for generating carnation plants with novel traits" ACTA HORTICULTURAE, INTERNATIONAL SOCIETY FOR HORTICULTURAL SCIENCE, NL, 27. Juli 1998 (1998-07-27), Seiten 49-51, XP000946845 ISSN: 0567-7572 das ganze Dokument	6
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
23. Oktober 2000	07/11/2000	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter	
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Maddox, A	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TANAKA Y ET AL: "METABOLIC ENGINEERING TO MODIFY FLOWER COLOR" PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, JAPANESE SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, XX, Bd. 39, November 1998 (1998-11), Seiten 1119-1126, XP000922977 ISSN: 0032-0781 Seite 1122, rechte Spalte -Seite 1125 & ZUKER, A., ET AL.: ABST. IX. INTERNATIONAL CONGRESS ON PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, 1998, Seite 35	6
X	WO 93 18142 A (UNIV WASHINGTON) 16. September 1993 (1993-09-16) Seite 5 -Seite 11	6
X	WO 97 21816 A (ZENECA LTD ;MANNING KENNETH (GB)) 19. Juni 1997 (1997-06-19) das ganze Dokument	6
X	DEDIO J ET AL: "MOLECULAR CLONING OF THE FLAVANONE 3SS-HYDROXYLASE GENE (FHT) FROM CARNATION (DIANTHUS CARYOPHYLLUS) AND ANALYSIS OF STABLE AND UNSTABLE FHT MUTANTS" THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, DE, SPRINGER, BERLIN, Bd. 90, Nr. 5, 1995, Seiten 611-617, XP000915009 ISSN: 0040-5752 das ganze Dokument	6
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06) RADEMACHER W ET AL: "Induction of resistance against bacterial and fungal pathogens in apple by prohexadione-Ca." Database accession no. PREV199900379593 XP002150833 Zusammenfassung & PHYTOPATHOLOGY, Bd. 89, Nr. 6 SUPPL., Juni 1999 (1999-06), Seite S63 Annual Meeting of the American Phytopathological Society; Montreal, Quebec, Canada; August 7-11, 1999 ISSN: 0031-949X	6

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06)            COSTA G ET AL: "Reduction of fire blight            incidence in pears, cv. 'Abate Fetel,' by            the plant growth regulator            prohexadione-Ca."            Database accession no. PREV199900382649            XP002150834            Zusammenfassung            &amp; PHYTOPATHOLOGY,            Bd. 89, Nr. 6 SUPPL., Juni 1999 (1999-06),            Seite S18            Annual Meeting of the American            Phytopathological Society;Montreal,            Quebec, Canada; August 7-11, 1999            ISSN: 0031-949X</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06)            COSTA G ET AL: "Prohexadione-Ca: Growth            regulation and reduction of fire blight            incidence in pears, cv. 'Abate Fetel'."            Database accession no. PREV199900407325            XP002150835            Zusammenfassung            &amp; HORTSCIENCE,            Bd. 34, Nr. 3, Juni 1999 (1999-06), Seite            481            96th Annual International conference of            the American Society for Horticultural            Science;Minneapolis, Minnesota, USA; July            27-31, 1999            ISSN: 0018-5345</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06)            RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:            Effects against scab in apples."            Database accession no. PREV199900376570            XP002150836            Zusammenfassung            &amp; PHYTOPATHOLOGY,            Bd. 89, Nr. 6 SUPPL., Juni 1999 (1999-06),            Seiten S63-S64,            Annual Meeting of the American            Phytopathological Society;Montreal,            Quebec, Canada; August 7-11, 1999            ISSN: 0031-949X</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	6



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06)            RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:            Induction of resistance against bacterial            and fungal pathogens in apple."            Database accession no. PREV199900407495            XP002150837            Zusammenfassung            &amp; HORTSCIENCE,            Bd. 34, Nr. 3, Juni 1999 (1999-06), Seiten            535-536,            96th Annual International conference of            the American Society for Horticultural            Science;Minneapolis, Minnesota, USA; July            27-31, 1999            ISSN: 0018-5345</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; Juni 1999 (1999-06)            RADEMACHER W ET AL: "Prohexadione-Ca:            Effects against apple scab (Venturia            inaequalis)."            Database accession no. PREV199900412250            XP002150838            Zusammenfassung            &amp; HORTSCIENCE,            Bd. 34, Nr. 3, Juni 1999 (1999-06), Seite            480            96th Annual International conference of            the American Society for Horticultural            Science;Minneapolis, Minnesota, USA; July            27-31, 1999            ISSN: 0018-5345</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
P,X	<p>WO 99 43825 A (DU PONT ;ALLEN STEPHEN M            (US); FADER GARY M (US); KINNEY ANTHONY J)            2. September 1999 (1999-09-02)            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
E	<p>WO 00 50613 A (VAINSTEIN ALEXANDER ;YISSUM            RES DEV CO (IL); OVADIS MARIANNA (IL);)            31. August 2000 (2000-08-31)            Seite 29 -Seite 34</p> <p style="text-align: center;">---</p>	6
A	<p>WO 93 18171 A (PIONEER HI BRED INT ;UNIV            WASHINGTON (US))            16. September 1993 (1993-09-16)            das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-6

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!            BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,            PHILADELPHIA, PA, US; 1998            RADEMACHER W: "Prohexadione-Ca: Uses and            modes of action of a plant bioregulator            with interesting physiological            properties."            Database accession no. PREV200000396673            XP002150839            Zusammenfassung            &amp; BULGARIAN JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY,            Nr. Special Issue, 1998, Seite 303            11th Congress of the Federation of            European Societies of Plant            Physiology;Varna, Bulgaria; September            07-11, 1998            ISSN: 1310-4586</p>	1-6
A	<p>SKADHAUGE B ET AL: "The role of the            barley testa layer and its flavonoid            content in resistance to Fusarium            infections"            HEREDITAS, SE, LUND,            Bd. 126, Nr. 2, 1997, Seiten 147-160,            XP002081490            ISSN: 0018-0661            das ganze Dokument</p>	1-6

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. ionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05259

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9318142 A	16-09-1993	AU 668548 B	09-05-1996
		AU 3786493 A	05-10-1993
		BG 99033 A	29-09-1995
		BR 9306047 A	18-11-1997
		CA 2131704 A	16-09-1993
		EP 0630403 A	28-12-1994
		HU 69991 A	28-09-1995
		JP 7506963 T	03-08-1995
		NZ 251069 A	26-01-1996
		US 5733759 A	31-03-1998
-----	-----	-----	-----
WO 9721816 A	19-06-1997	AU 1106297 A	03-07-1997
-----	-----	-----	-----
WO 9943825 A	02-09-1999	AU 2766099 A	15-09-1999
-----	-----	-----	-----
WO 0050613 A	31-08-2000	KEINE	
-----	-----	-----	-----
WO 9318171 A	16-09-1993	US 5432068 A	11-07-1995
		AU 682001 B	18-09-1997
		AU 3799093 A	05-10-1993
		BG 99101 A	28-07-1995
		BR 9306066 A	13-01-1998
		CA 2131819 C	10-09-1996
		EP 0631630 A	04-01-1995
		HU 67838 A	29-05-1995
		JP 7507680 T	31-08-1995
		KR 196622 B	15-06-1999
NZ 251139 A	28-05-1996		
-----	-----	-----	-----