



(10) DE 11 2011 101 566 T5 2013.05.08

(12)

Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2011/145015**
in deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2011 101 566.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB2011/051919**
(86) PCT-Anmeldetag: **02.05.2011**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **24.11.2011**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **08.05.2013**

(51) Int Cl.: **C12N 15/82 (2013.01)**
A01H 1/00 (2013.01)
C12N 15/05 (2013.01)
C12N 5/04 (2013.01)
C12N 5/14 (2013.01)

(30) Unionspriorität:
10161867.6 **04.05.2010** **EP**
61/330922 **04.05.2010** **US**

(72) Erfinder:
Mietzner, Thomas, 76855, Annweiler, DE;
Witschel, Matthias, Dr., 67098, Bad Dürkheim, DE;
Hutzler, Johannes, Dr., 67165, Waldsee, DE;
Ehrhardt, Thomas, Dr., 67346, Speyer, DE; Tresch, Stefan, 67281, Kirchheim, DE

(71) Anmelder:
BASF SE, 67063, Ludwigshafen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **PFLANZEN MIT ERHÖHTER HERBIZIDTOLERANZ**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschtem Pflanzenwuchs an einem Pflanzenkultivierungsort. Das Verfahren umfasst die Schritte Bereitstellen, an diesem Ort, einer Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure umfasst, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die für eine Wildtyp-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase oder eine mutierte Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (mut-HPPD) codiert, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent und/oder tolerant ist, und/oder eine Nukleotidsequenz umfasst, die für eine Wildtyp-Homogentisatsolaneyltransferase oder eine mutierte Homogentisatsolaneyltransferase (mut-HST) codiert, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, und dann Ausbringen einer wirksamen Menge dieses Herbizids auf die Pflanzenkultivierungsstelle. Weiterhin betrifft die Erfindung Pflanzen, umfassend mut-HPPD, sowie Verfahren zum Erzeugen von solchen Pflanzen.

```
Cr_HPPD1 : -----* 20 * 40 * 60
Cr_HPPD2 : -----HGAGGASTTVANGGKLVGHKNEVRYN PQSDREAIKRFHsPFWCADAT : 49
Pp_HPPD1 : -----MGAGGAGTGDREGGIKLVGKNEVRYNRLSDKEITVHKFHHIDFHCDDAT : 49
Os_J_HPPD1 : -----MGLDKSBSRGSVVGPLHLVGCBEVRYNNEKTDREJGVERFHHVBFHCDDAS : 50
Ta_HPPD1 : HPPPTTPTATGAGAAAVTPEIARF--E--RIVREHRSDRHLSFHFVHCADAA : 55
Zm_HPPD1* : HPPPTT-AAAAGA AVAAASAAQAARLVGHRNFVFNPRSDREHTLAFHHVBLHCADAA : 59
At_HPPD : --MGHQAAVSENGHDDGAASSPGEKLVGSKFVRKNPKSDKEKVKRFHHIBFHCDDAT : 58
Gm_HPPD : -----MCNEIQAQAQAQAOPGKLVGSKNEVRYNPKSDREQVNRFHIBFHCDDAT : 51
Vv_HPPD : -----HGKQNTTNNPAPGKLVGSKNEVRYNPKSDREQVNRFHIBFHCDDAT : 49
lvj fGR NP 3D4E P h e Wc DA

Cr_HPPD1 : NTYKRFSGLGMPILVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCASVSEGV : 105
Cr_HPPD2 : NTSKRFSGLGMPILVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCASVSEGV : 105
Pp_HPPD1 : NTRRFSGLGMPILVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCIDTNTKH : 106
Os_J_HPPD1 : SAAGRFAPALGAPLARSDLSTGNSAHAILLRSASVAFLETAPYSGDH-GVGAADATTA : 119
Ta_HPPD1 : SAAGRFAPALGAPLARSDLSTGNSAHAILLRSASVAFLETAPYSGDH-GVGAADATTA : 109
Zm_HPPD1* : SAAGRFSGLAPLARSDLSTGNSAHAILLRSASVAFLETAPYSGDH-GVGAADATTA : 113
Zm_HPPD1** : SAAGRFSGLAPLARSDLSTGNSAHAILLRSASVAFLETAPYSGDH-GVGAADATTA : 118
At_HPPD : NVARFSGLGMPILVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCIDTNTKH : 110
Gm_HPPD : NARRFSGLGMPIVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCIDTNTKH : 110
Vv_HPPD : NLARFSGLGMPILVAKSDOSTNNOLEAVLRSNDLVFPTAIFYR---KCIDTNTKH : 109
RFSGLG p A4SD 3TGN as rs 6 F F3APY

Cr_HPPD1 : PLRHYNI DHAYEPINS HGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 165
Cr_HPPD2 : PLRHYNI DHAYEPINS HGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 165
Pp_HPPD1 : PHPGYKSDARFPTDSHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 166
Os_J_HPPD1 : SIPEFSGAARFADHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 176
Ta_HPPD1 : SIPEFSGAARFADHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 166
Zm_HPPD1* : ALPFSAAAARFADHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 170
Zm_HPPD1** : ALPFSAAAARFADHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 170
At_HPPD : SIPEFDHSCRFEPSSHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 175
Gm_HPPD : SIPEFDHSCRFEPSSHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 167
Vv_HPPD : SIPEFDHSCRFEPSSHGLAVRAVGLLVDADTAIYEVSAHGA KGVLPVBLRDEASGTS : 167
p 5 z HGL Vrc6 6 V DA A5 Bva GA p 6

Cr_HPPD1 : QVISEVILYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 212
Cr_HPPD2 : QVISEVILYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 212
Pp_HPPD1 : VVMAEVLKLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 213
Os_J_HPPD1 : --LAEVLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 223
Ta_HPPD1 : --FAEVELYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 213
Zm_HPPD1* : --LAEVLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 218
Zm_HPPD1** : --LAEVLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 218
At_HPPD : --LAEVLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 226
Gm_HPPD : --FAEVELYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 225
Vv_HPPD : --LAEVLYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH : 222
EV EYGVVIRYVSGSEFPGP-----FVAGVLPVTDSS-----PVASIGLQVVDH
```

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Verfahren, mit denen Pflanzen eine landwirtschaftsmäßige Toleranz gegenüber einem Herbizid verliehen wird. Insbesondere betrifft die Erfindung Pflanzen mit einer erhöhten Toleranz gegenüber „Cumaronderivat“-Herbiziden. Genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren und Pflanzen, die durch Mutagenese und Kreuzungszüchtung und Transformation erhalten werden und die eine erhöhte Toleranz gegenüber „Cumaronderivat“-Herbiziden aufweisen.

ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Herbizide, die die 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (4-HPPD; EC 1.13.11.27), ein Schlüsselenzym in der Biosynthese der Prenylchinone Plastochinon und Tocopherole, inhibieren, sind für die selektive Unkrautbekämpfung seit Anfang 1990 verwendet worden. Sie blockieren die Umwandlung von 4-Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat im Biosyntheseweg (Matringe et al., 2005, Pest Manag. Sci., Bd. 61: 269–276; Mitchell et al., 2001, Pest Manag. Sci. Bd. 57: 120–128). Plastochinon gilt als erforderlicher Cofaktor des Enzyms Phytoendesaturase in der Carotenoidbiosynthese (Boeger und Sandmann, 1998, Pestic. Outlook, Bd. 9: 29–35). Seine Hemmung führt zur Verarmung der pflanzlichen Plastochinon- und Vitamin-E-Reserven, was zu Ausbleichsymptomen führt. Der Verlust von Carotenoiden, insbesondere in ihrer Funktion als Schutz der Fotosysteme gegen Fotooxidation, führt zum oxidativen Abbau des Chlorophylls und der Fotosynthesemembranen in wachsenden Sprossgeweben. Dies führt zu Störungen der Chloroplastensynthese und -funktion. (Boeger und Sandmann, 1998). Das Enzym Homogentisatsolanesylyltransferase (HST) katalysiert den Schritt nach der HPPD im Plastochinonbiosyntheseweg. Bei der HST handelt es sich um eine Prenyltransferase, die sowohl Homogentisat decarboxyliert als auch die Solanesylgruppe von Solanesyldiphosphat auf es überträgt, wodurch 2-Methyl-6-solanesyl-1,4-benzochinon (MSBQ), ein Zwischenprodukt im Biosyntheseweg zu Plastochinon, bildet. Die HST-Enzyme sind membrangebunden, und die Gene, die für sie codieren, beinhalten eine Plastidenadressierungssequenz.

[0003] Zu den wichtigsten chemischen Klassen der im Handel erhältlichen 4-HPPD-Hemmer-Herbizide zählen die Pyrazolone, die Triketone und die Isoxazole. Die Hemmer imitieren die Bindung des Substrats 4-Hydroxyphenylpyruvat an ein enzymgebundenes Eisen(II)-Ion im aktiven Zentrum durch Bildung eines stabilen Ionen-Dipol-Ladungsübertragungskomplexes. Unter den 4-HPPD-Hemmer-Herbiziden war das Triketonsulcotrion das erste Beispiel dieser Gruppe von Herbiziden, das in der Landwirtschaft verwendet wurde und dessen Wirkungsmechanismus identifiziert wurde. (Schulz et al., 1993, FEBS Lett. Bd. 318: 162–166). Die Triketone wurden als Derivate des Leptospermon beschrieben, einer herbiziden Komponente der Zylinderputzer-Pflanze, *Callistemon* spp. (Lee et al. 1997, Weed Sci. Bd. 45, 162–166).

[0004] Einige dieser Moleküle wurden als Herbizide verwendet, da die Hemmung der Reaktion in Pflanzen zum Ausbleichen der Blätter der behandelten Pflanzen und zum Absterben dieser Pflanzen führt (Pallett, K. E. et al. 1997 Pestic. Sci. 50 83–84). Die Herbizide, bei denen die HPPD der Angriffspunkt ist und die im Stand der Technik beschrieben sind, sind, insbesondere, die Isoxazole (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, U.S. Pat. Nr. 5,424,276), insbesondere Isoxaflutol, ein selektives Mais-Herbizid, Diketonitrile (EP496630, EP496631), insbesondere 2-Cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃phenyl)propan-1,3-dion und 2-Cyano-3-cyclopropyl-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂phenyl)propan-1,3-dion, Triketone, wie sie in EP625505, EP625508, U.S. Pat. Nr. 5,506,195 beschrieben sind, insbesondere Sulcotrion, oder auch Pyrazolate. Außerdem verursacht das gut bekannte Herbizid Topramezon in empfindlichen Pflanzenarten dieselbe Art von phytotoxischen Symptomen, also Chlorophyllverlust und Nekrose in wachsenden Sprossgeweben, wie die oben beschriebenen 4-HPPD-hemmenden „Bleacher“-Herbizide. Topramezon gehört zu der chemischen Klasse der Pyrazolone oder Benzoylpyrazole und gelangte 2006 auf den Markt. Wenn die Verbindung im Nachauflauf ausgebracht wird, bekämpft sie selektiv ein weites Spektrum von einjährigen einkeimblättrigen und zweikeimblättrigen Unkräutern im Mais.

[0005] Über eine Pflanzentoleranz gegenüber „Cumaronderivat-Herbiziden“ wurde auch in verschiedenen Patenten berichtet. Die internationale Anmeldung Nr. WO2010/029311 beschreibt allgemein die Verwendung einer HPPD-Nukleinsäure und/oder einer HST-Nukleinsäure, um Herbizidtoleranz in Pflanzen zu verursachen. WO2009/090401, WO2009/090402, WO2008/071918, WO2008/009908 beschreiben spezifisch bestimmte „Cumaronderivat-Herbizide“ und Pflanzenlinien, die gegenüber „Cumaronderivat-Herbiziden“ tolerant sind.

[0006] Für die Herstellung von Pflanzen mit Toleranz gegenüber Herbiziden stehen drei Hauptstrategien zur Verfügung, und zwar (1) Detoxifizieren des Herbizids mit einem Enzym, das das Herbizid oder sein aktives Stoffwechselprodukt in nichttoxische Produkte umwandelt, wie zum Beispiel die Enzyme für Toleranz gegenüber Bromoxynil oder gegenüber Basta (EP242236, EP337899); (2) Mutieren des als Angriffspunkt dienenden Enzyms in ein funktionelles Enzym, das gegenüber dem Herbizid oder seinem wirksamen Stoffwechselprodukt weniger empfindlich ist, wie zum Beispiel die Enzyme für Toleranz gegenüber Glyphosat (EP293356, Padgett S. R. et al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991); oder (3) Überexprimieren des empfindlichen Enzyms, so dass Mengen an als Angriffspunkt dienendem Enzym in der Pflanze gebildet werden, die in Bezug auf das Herbizid in Hinblick auf die Kinetikkonstanten dieses Enzyms ausreichen, so dass trotz Vorhandensein des Hemmers ausreichend funktionelles Enzym verfügbar ist. Die dritte Strategie wurde für die erfolgreiche Herstellung von Pflanzen mit Toleranz gegenüber HPPD-Hemmern beschrieben (WO96/38567). US2009/0172831 beschreibt Nukleotidsequenzen, die für Aminosäuresequenzen mit enzymatischer Aktivität codieren, so dass die Aminosäuresequenzen gegenüber herbiziden HPPD-Hemmer-Chemikalien resistent sind, insbesondere triketonhemmerspezifische HPPD-Mutanten.

[0007] Bis jetzt sind im Stand der Technik noch keine cumaronderivatherbizidtoleranten Pflanzen, die mindestens eine mutierte HPPD-Nukleinsäure enthalten, beschrieben worden; ebenso wenig sind im Stand der Technik cumaronderivatherbizidtolerante Kulturpflanzen beschrieben worden, die Mutationen in Genomen enthalten, bei denen es sich nicht um das Genom, von dem das HPPD-Gen stammt, handelt. In dem Fachgebiet besteht daher ein Bedarf an der Identifikation von Cumaronderivatherbizid-Toleranzgenen aus zusätzlichen Genomen und Arten. Ebenso besteht auf dem Fachgebiet ein Bedarf an Kulturpflanzen und Kulturpflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber Herbiziden wie Cumaronderivatherbizid, die mindestens eine mutierte HPPD-Nukleinsäure enthalten. Außerdem besteht ein Bedarf an Verfahren zum Bekämpfen von Unkrautwachstum in der Nähe von solchen Kulturpflanzen oder Kulturpflanzen. Diese Zusammensetzungen und Verfahren würden den Einsatz von Überspritztechniken beim Ausbringen von Herbiziden auf Flächen, die Kulturpflanzen oder Kulturpflanzen enthalten, gestatten.

DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die Aufgabe wird von der vorliegenden Erfindung gelöst, die ein Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschtem Pflanzenwuchs an einem Pflanzenkultivierungsort betrifft, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen, an diesem Ort, einer Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure umfasst, die Folgendes umfasst:
 - (i) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase oder für eine mutierte Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (mut-HPPD), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, und/oder
 - (ii) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Homogentisatsolanesylyltransferase oder für eine mutierte Homogentisatsolanesylyltransferase (mut-HST), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert,
- b) Ausbringen einer wirksamen Menge des Herbizids auf diesen Ort.

[0009] Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren eines Cumaronderivatherbizids durch Verwendung einer mut-HPPD, die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 umfasst oder einer Variante davon codiert wird, und/oder durch Verwendung einer mut-HST, die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 7 oder 9 umfasst oder einer Variante davon codiert wird.

[0010] Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- a) Erzeugen einer transgenen Zelle oder Pflanze, die eine Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, umfasst, wobei die mut-HPPD exprimiert wird;
- b) Ausbringen eines Cumaronderivatherbizids auf die transgene Zelle oder Pflanze von a) und auf eine Kontrollzelle oder Kontrollpflanze derselben Sorte;
- c) Bestimmen des Wachstums oder der Lebensfähigkeit der transgenen Zelle oder Pflanze und der Kontrollzelle oder Kontrollpflanze nach Ausbringen der Testverbindung, und
- d) Selektieren von Testverbindungen, die den Kontrollzellen oder Kontrollpflanzen im Vergleich zum Wachstum der transgenen Zelle oder Pflanze ein reduziertes Wachstum verleihen.

[0011] Ein weiterer Gegenstand betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer Nukleotidsequenz, die für eine mut-HPPD, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Erzeugen einer Bibliothek von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren,
- b) Screenen einer Population der erhaltenen mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren durch Exprimieren jeder der Nukleinsäuren in einer Zelle oder Pflanze und Behandeln der Zelle oder Pflanze mit einem Cumaronderivatherbizid,
- c) Vergleichen der von der Population von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren bereitgestellten Cumaronderivatherbizid-Toleranzniveaus mit dem von einer HPPD-codierenden Kontrollnukleinsäure bereitgestellten Cumaronderivatherbizid-Toleranzniveau,
- d) Selektieren von mindestens einer mut-HPPD-codierenden Nukleinsäure, die im Vergleich zu dem von der HPPD-codierenden Kontrollnukleinsäure bereitgestellten Toleranzniveau ein signifikant erhöhtes Toleranzniveau bereitstellt.

[0012] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die in Schritt d) selektierte mut-HPPD-codierende Nukleinsäure mindestens zweimal so viel Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu derjenigen, die von der HPPD-codierenden Kontrollnukleinsäure bereitgestellt wird, bereit.

[0013] Die Resistenz oder Toleranz kann durch Erzeugen einer transgenen Pflanze, die eine Nukleinsäuresequenz der Bibliothek von Schritt a) umfasst, und Vergleichen der transgenen Pflanze mit einer Kontrollpflanze bestimmt werden.

[0014] Ein weiterer Gegenstand betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer Pflanze oder Alge, die eine Nukleinsäure enthält, die für eine mut-HPPD oder mut-HST codiert, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Identifizieren einer wirksamen Menge eines Cumaronderivatherbizids in einer Kultur von Pflanzenzellen oder Grünalgen,
- b) Behandeln der Pflanzenzellen oder Grünalgen mit einem Mutagenisierungsmittel,
- c) Inkontaktbringen der mutagenisierten Zellpopulation mit einer wirksamen Menge Cumaronderivatherbizid gemäß Identifikation in a),
- d) Selektieren von mindestens einer Zelle, die diese Testbedingungen überlebt,
- e) PCR-Amplifikation und Sequenzieren der HPPD- und/oder HST-Gene aus in d) selektierten Zellen und Vergleichen von solchen Sequenzen mit Wildtyp-HPPD- bzw. -HST-Gensequenzen.

[0015] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mutagenisierungsmittel um Ethylmethansulfonat.

[0016] Ein weiterer Gegenstand betrifft eine isolierte Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, wobei die Nukleinsäure nach einem wie oben definierten Verfahren identifizierbar ist.

[0017] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Pflanzenzelle, die mit einer Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäure transformiert worden ist, oder eine Pflanze, die so mutiert worden ist, dass man zu einer Pflanze gelangt, die eine Wildtyp- oder eine mut-HPPD-Nukleinsäure exprimiert, vorzugsweise überexprimiert, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanzenzelle im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanzenzelle zu einer erhöhten Resistenz oder Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid führt.

[0018] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine transgene Pflanze, die eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle umfasst, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanze zu einer im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze erhöhten Resistenz der Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid führt.

[0019] Die Pflanzen der vorliegenden Erfindung können transgen oder nichttransgen sein.

[0020] Vorzugsweise führt die Expression der Nukleinsäure in der Pflanze zu einer im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze erhöhten Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid in der Pflanze.

[0021] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Samen, der von einer transgenen Pflanze, die eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle umfasst, produziert wird, wobei der Samen für eine im Vergleich zu einer Wildtypsorte des Samens erhöhte Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid reinerbig ist.

[0022] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle mit einer im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanzenzelle erhöhten Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid, wobei das Verfahren das Transformieren der Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, umfasst.

[0023] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, das Folgendes umfasst: a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine Wildtyp- oder eine mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, und b) Erzeugen, aus der Pflanzenzelle, einer Pflanze mit einer erhöhten Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid.

[0024] Vorzugsweise umfasst die Expressionkassette weiterhin eine in der Pflanze funktionelle Transkriptionsinitiationsregulationsregion und eine Translationsinitiationsregulationsregion.

[0025] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen mut-HPPD als Selektionsmarker. Die Erfindung stellt ein Verfahren zum Identifizieren oder Selektieren einer transformierten Pflanzenzelle, eines transformierten Pflanzengewebes, einer transformierten Pflanze oder Teils davon bereit, das Folgendes umfasst: a) Bereitstellen einer transformierten Pflanzenzelle, eines transformierten Pflanzengewebes, einer transformierten Pflanze oder eines Teils davon, wobei die transformierte Pflanzenzelle, das transformierte Pflanzengewebe, die transformierte Pflanze oder der Teil davon eine isolierte Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes mut-HPPD-Polypeptid wie im Folgenden beschrieben, codiert, umfasst, wobei das Polypeptid als Selektionsmarker verwendet wird und wobei die transformierte Pflanzenzelle, das transformierte Pflanzengewebe, die transformierte Pflanze oder der Teil davon gegebenenfalls eine weitere interessierende isolierte Nukleinsäure umfassen kann; b) Inkontaktbringen der transformierten Pflanzenzelle, des transformierten Pflanzengewebes, der transformierten Pflanze oder des Teils davon mit mindestens einer cumaronderivathemmenden Verbindung; c) Bestimmen, ob die Pflanzenzelle, das Pflanzengewebe, die Pflanze oder der Teil davon von dem Hemmer oder der hemmenden Verbindung beeinflusst wird; und d) Identifizieren oder Selektieren der transformierten Pflanzenzelle, des transformierten Pflanzengewebes, der transformierten Pflanze oder des Teils davon.

[0026] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind aufgereinigte mut-HPPD-Proteine, die die im vorliegenden Text beschriebenen Mutationen enthalten und die sich für Molecular-Modelling-Untersuchungen für weitere Verbesserungen der Herbizidtoleranz eignen. Proteinaufreinigungsverfahren sind gut bekannt und können leicht unter Verwendung von im Handel erhältlichen Produkten oder spezifisch entwickelten Verfahren, wie sie zum Beispiel in Protein Biotechnology, Walsh und Headon (Wiley, 1994) beschrieben sind, durchgeführt werden.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0027] **Fig. 1** Aminosäuresequenz-Alignment und konservierte Regionen von HPPD-Enzymen aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr_HPPD1a, Cr_HPPD1b), *Physcomitrella patens* (Pp_HPPD1), *Oryza sativa* (Os_HPPD1), *Triticum aestivum* (Ta_HPPD1), *Zea mays* (Zm_HPPD1), *Arabidopsis thaliana* (At_HPPD), *Glycine max* (Gm_HPPD) und *Vitis vinifera* (Vv_HPPD).

* Sequenz aus dem Genom-Sequenzierungsprojekt. Locus-ID: GRMZM2G088396

** Aminosäuresequenz basiert auf NCBI GenPept-Eintrag CAG25475

[0028] **Fig. 2** Selektion von *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämmen mit Resistenz gegen „Cumaronderivatherbizide“. (A) Mutagenisierte Zellen, die auf festes Medium ohne Selektionsmittel ausplattiert wurden. (B) Mutagenisierte Zellen, die auf festes Medium mit 50 µM 4-Hydroxy-3-[2-methyl-3-(5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-3-yl)-4-methylsulfonylphenyl]pyrano[3,2-b]pyridin-2-on ausplattiert wurden. Zellen mit Resistenz gegen „Cumaronderivatherbizide“ sind zur Koloniebildung befähigt (umkringelt), während empfindliche Zellen wachstumsunfähig sind.

[0029] **Fig. 3** zeigt eine Vektorkarte eines Pflanzentransformationsvektors, der für die Sojabohnentransformation mit HPPD/HST-Sequenzen verwendet wird.

[0030] **Fig. 4** Herbizidspritztests mit transgenen T0-Sojabohnenstecklingen, die *Arabidopsis*-Wildtyp-HPPD (AtHPPD) exprimieren. Bei AV3639, AV3641 und AV3653 handelt es sich um einzelne Events. Untransformierte Kontrollpflanzen sind als Wildtyp gekennzeichnet. Das mit einem Sternchen gekennzeichnete „Cumaronderivat“ entspricht * 3-[2,4-dichlor-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]-1-(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxypyrido[3,2-c]thiazin-4-ol.

SEQUENZBESCHREIBUNG

Tabelle 1

SEQ ID NO:	Beschreibung	Organismus	Locus	Eintragsnummer
1	HPPD-Nukleinsäure	Arabidopsis	At1g06570	AF047834
2	HPPD-Aminosäure	Arabidopsis	At1g06570	AAC15697
3	HPPD-Nukleinsäure1	Chlamydomonas		
4	HPPD-Aminosäure1	Chlamydomonas		
5	HPPD-Nukleinsäure2	Chlamydomonas		XM_001694671.1
6	HPPD-Aminosäure2	Chlamydomonas		Q70ZL8
7	HST-Nukleinsäure	Arabidopsis	At3g11945	DQ231060
8	HST-Aminosäure	Arabidopsis	At3g11945	Q1ACB3
9	HST-Nukleinsäure	Chlamydomonas		AM285678
10	HST-Aminosäure	Chlamydomonas		A1JHN0
11	HPPD-Aminosäure	Physcomitrella		A9RPY0
12	HPPD-Aminosäure	Oryza	Os02g07160	
13	HPPD-Aminosäure	Triticum		Q45FE8
14	HPPD-Aminosäure	Zea		CAG25475
15	HPPD-Aminosäure	Glycine		A5Z1N7
16	HPPD-Aminosäure	Vitis		A5ADC8
17	HPPD-Aminosäure	Pseudomonas fluorescens Stamm 87-79		AXW96633
18	HPPD-Aminosäure	Pseudomonas fluorescens		ADR00548
19	HPPD-Aminosäure	Avena sativa		AXW96634

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

[0031] Die Artikel „ein(es)“, „eine“ und „ein(er)“ bezeichnen im vorliegenden Zusammenhang ein, eine oder einen bzw. mehr als ein, eine oder einen (d. h. mindestens ein, eine bzw. einen) des grammatischen Objekts mit diesem Artikel. So zum Beispiel bedeutet „ein Element“ ein oder mehrere Elemente.

[0032] Im vorliegenden Zusammenhang ist das Wort „umfassend“ oder Variationen wie „umfasst“ oder „umfassen“ so zu verstehen, dass ein genanntes Element, eine genannte ganze Zahl oder ein genannter Schritt bzw. Gruppe von Elementen, ganzen Zahlen oder Schritten eingeschlossen sind, jedoch nicht, dass ein anderes Element, eine andere ganze Zahl oder ein anderer Schritt bzw. Gruppe von Elementen, ganzen Zahlen oder Schritten ausgeschlossen ist.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschtem Pflanzenwuchs an einem Pflanzenkultivierungsort, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

c) Bereitstellen, an diesem Ort, einer Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure umfasst, die Folgendes umfasst:

(i) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD) oder für eine mutierte Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (mut-HPPD), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, und/oder

(ii) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Homogentisatsolanesyltransferase (HST) oder für eine mutierte Homogentisatsolanesyltransferase (mut-HST), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert,

d) Ausbringen einer wirksamen Menge des Herbizids auf diesen Ort.

[0034] Unter dem Begriff „Bekämpfung von unerwünschtem Pflanzenwuchs“ versteht man das Abtöten von Unkräutern und/oder das sonstige Verzögern oder Hemmen des normalen Unkrautwachstums. Unter Unkräutern versteht man im weitesten Sinn alle diejenigen Pflanzen, die an Stellen wachsen, wo sie unerwünscht sind. Zu den Unkräutern der vorliegenden Erfindung zählen zum Beispiel zweikeimblättrige und einkeimblättrige Unkräuter. Zu den zweikeimblättrigen Unkräutern zählen, jedoch ohne Einschränkung, Unkräuter der Gattungen: *Sinapis*, *Lepidium*, *Galium*, *Stellaria*, *Matricaria*, *Anthemis*, *Galinsoga*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Senecio*, *Amaranthus*, *Portulaca*, *Xanthium*, *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Polygonum*, *Sesbania*, *Ambrosia*, *Cirsium*, *Carduus*, *Sonchus*, *Solanum*, *Rorippa*, *Rotala*, *Lindernia*, *Lamium*, *Veronica*, *Abutilon*, *Emex*, *Datura*, *Viola*, *Galeopsis*, *Papaver*, *Centaurea*, *Trifolium*, *Ranunculus* und *Taraxacum*. Zu den einkeimblättrigen Unkräutern zählen, jedoch ohne Einschränkung, Unkräuter der Gattungen: *Echinochloa*, *Setaria*, *Panicum*, *Digitaria*, *Phleum*, *Poa*, *Festuca*, *Eleusine*, *Brachiaria*, *Lolium*, *Bromus*, *Avena*, *Cyperus*, *Sorghum*, *Agropyron*, *Cynodon*, *Monochoria*, *Fimbristylis*, *Sagittaria*, *Eleocharis*, *Scirpus*, *Paspalum*, *Ischaemum*, *Sphenoclea*, *Dactyloctenium*, *Agrostis*, *Alopecurus* und *Apera*. Außerdem können die Unkräuter der vorliegenden Erfindung zum Beispiel Kulturpflanzen, die an einer unerwünschten Stelle wachsen, zählen. So zum Beispiel kann eine Mais-Durchwuchspflanze in einem Feld, das hauptsächlich Sojabohnenpflanzen umfasst, dann als Unkraut gelten, wenn die Maispflanze in dem Feld mit Sojabohnenpflanzen unerwünscht ist.

[0035] Der Begriff „Pflanze“ wird im weitesten Sinn eingesetzt, er betrifft organisches Material und soll eukaryontische Organismen, die zum Pflanzenreich gehören, umfassen; Beispiele umfassen, jedoch nicht einschränkend, Gefäßpflanzen, Gemüse, Körner, Blumen, Bäume, Kräuter, Sträucher, Gräser, Rankgewächse, Farne, Moose, Pilze und Algen usw. sowie Klone, Absenker und Pflanzenteile, die für die ungeschlechtliche Vermehrung verwendet werden (z. B. Ableger, „Pipings“, Sprosse, Rhizome, unterirdische Stengel, Klumpen, Setzlinge, Zwiebeln, Rhizomknollen, Sprossknollen, Rhizome, in Gewebekultur produzierte Pflanzen/Gewebe usw.). Der Begriff „Pflanze“ umfasst weiterhin ganze Pflanzen, Vorfahren und Nachkommen der Pflanzen und Pflanzenteile, einschließlich Samen, Sprosse, Stengel, Blätter, Wurzeln (einschließlich Knollen), Blüten, Blütenchen, Früchten, Blütenstile, Blütenstanzstile, Staubblatt, Anthere, Narbe, Griffel, Ovarium, Blütenchromblatt, Kelchblatt, Fruchtblatt, Wurzelspitze, Wurzelhaube, Wurzelhaar, Blatthaar, Samenhaar, Pollenkorn, Mikrospore, Keimblatt, Hypokotyl, Epikotyl, Xylem, Phloem, Parenchym, Endosperm, eine Begleitzelle, eine Schließzelle und beliebige sonstige bekannte Organe, Gewebe und Zellen einer Pflanze, sowie Gewebe und Organe, wobei jeder der oben genannten Teile das interessierende Gen bzw. die interessierende Nukleinsäure umfasst. Der Begriff „Pflanze“ umfasst auch Pflanzenzellen, Suspensionskulturen, Kallusgewebe, Embryonen, Meristemregionen, Gametophyten, Sporophyten, Pollen und Mikrosporen, wobei wiederum jeder der genannten Teile das interessierende Gen bzw. die interessierende Nukleinsäure umfasst.

[0036] Zu den Pflanzen, die sich für die erfindungsgemäßen Verfahren besonders eignen, zählen alle Pflanzen, die zu der Oberfamilie Viridiplantae gehören, insbesondere einkeimblättrige und zweikeimblättrige Pflanzen, einschließlich (Grün-)Futterleguminosen, Zierpflanzen, Nahrungsmittelkulturen, Bäume oder Sträucher aus der Liste, umfassend *Acer* spp., *Actinidia* spp., *Abelmoschus* spp., *Agave sisalana*, *Agropyron* spp., *Agrostis stolonifera*, *Allium* spp., *Amaranthus* spp., *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, *Annona* spp., *Apium graveolens*, *Arachis* spp., *Artocarpus* spp., *Asparagus officinalis*, *Avena* spp. (z. B. *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsa*, *Beta vulgaris*, *Brassica* spp. (z. B. *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Canola, Raps, Rüben]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, *Capsicum* spp., *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, *Carya* spp., *Carthamus tinctorius*, *Castanea* spp., *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, *Cinnamomum* spp., *Citrullus lanatus*, *Citrus* spp., *Cocos* spp., *Coffea* spp., *Colocasia esculenta*, *Cola* spp., *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, *Corylus* spp., *Crataegus* spp., *Crocus sativus*, *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp., *Cynara* spp., *Daucus carota*, *Desmodium* spp., *Dimocarpus longan*, *Dioscorea* spp., *Diospyros* spp., *Echinochloa* spp., *Elaeis* (z. B. *Elaeis guineensis*, *Elaeis oleifera*), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora*, *Fagopyrum* spp., *Fagus* spp., *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, *Fortunella* spp., *Fragaria* spp., *Ginkgo biloba*, *Glycine* spp. (z. B. *Glycine max*, Soja hispida oder Soja max), *Gossypium hirsutum*, *Helianthus* spp. (z. B. *Helianthus annuus*), *Hemerocallis fulva*, *Hibiscus* spp., *Hordeum* spp. (z. B. *Hordeum vulgare*), *Ipomoea batatas*, *Juglans* spp., *Lactuca sativa*, *Lathyrus* spp., *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*, *Litchi chinensis*, *Lotus* spp., *Luffa acutangula*, *Lupinus* spp., *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon* spp. (z. B. *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*), *Macrotyloma* spp., *Malus* spp., *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*, *Mangifera indica*, *Manihot* spp., *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, *Melilotus* spp., *Mentha* spp., *Miscanthus sinensis*, *Momordica* spp., *Morus nigra*, *Musa* spp., *Nicotiana* spp., *Olea* spp., *Opuntia* spp., *Ornithopus* spp., *Oryza* spp. (z. B. *Oryza sativa*, *Oryza latifolia*), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum* sp., *Persea* spp., *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, *Phaseolus* spp., *Phleum pratense*, *Phoenix* spp., *Phragmites australis*, *Physalis* spp., *Pinus* spp., *Pistacia vera*, *Pisum* spp., *Poa* spp., *Populus* spp., Pro-

sopis spp., Prunus spp., Psidium spp., Punica granatum, Pyrus communis, Quercus spp., Raphanus sativus, Rheum rhabarbarum, Ribes spp., Ricinus communis, Rubus spp., Saccharum spp., Salix sp., Sambucus spp., Secale cereale, Sesamum spp., Sinapis sp., Solanum spp. (z. B. Solanum tuberosum, Solanum integrifolium oder Solanum lycopersicum), Sorghum bicolor, Spinacia spp., Syzygium spp., Tagetes spp., Tamarindus indica, Theobroma cacao, Trifolium spp., Tripsacum dactyloides, Triticosecale rimpai, Triticum spp. (z. B. Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha, Triticum sativum, Triticum monococcum oder Triticum vulgare), Tropaeolum minus, Tropaeolum majus, Vaccinium spp., Vicia spp., Vigna spp., Viola odorata, Vitis spp., Zea mays, Zizania palustris, Ziziphus spp., Amaranth, Artischoke, Spargel, Brokkoli, Rosenkohl, Kraut/Kohl, Canola, Karotte, Blumenkohl, Sellerie, Staudenkohl, Flachs, Grünkohl, Linsen, Raps, Okra, Zwiebel, Kartoffel, Reis, Sojabohne, Erdbeere, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Sonnenblume, Tomate, Sommerkürbis, Tee und Algen, sowie andere mehr. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Pflanze um eine Kulturpflanze. Zu Kulturpflanzen zählen zum Beispiel unter anderem Sojabohne, Sonnenblume, Canola, Luzerne, Rapssamen, Baumwolle, Tomate, Kartoffel oder Tabak. Weiterhin handelt es sich bevorzugt bei der Pflanze um eine einkeimblättrige Pflanze wie Zuckerrohr. Weiter bevorzugt handelt es sich bei der Pflanze um ein Getreide, wie Reis, Mais, Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Sorghum oder Hafer.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Pflanze vorab durch ein Verfahren erzeugt worden, bei dem man eine Pflanze rekombinant dadurch erzeugt, dass man ein Wildtyp- oder mut-HPPD- und/oder Wildtyp- oder mut-HST-Transgen einführt und überexprimiert, wie dies genauer im folgenden Text beschrieben wird.

[0038] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Pflanze vorab durch ein Verfahren erzeugt worden, bei dem man in situ Pflanzenzellen mutagenisiert, um zu Pflanzenzellen zu gelangen, die eine mut-HPPD und/oder mut-HST exprimieren.

[0039] Wie im vorliegenden Text beschrieben werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eingesetzt, um die Herbizidtoleranz von Pflanzen zu verstärken, die in ihren Genomen ein Gen umfassen, das für ein herbizidtolerantes Wildtyp- oder mut-HPPD- und/oder Wildtyp- oder mut-HST-Protein codiert. Bei solch einem Gen kann es sich um ein endogenes Gen oder um ein Transgen handeln, wie dies im Folgenden beschrieben ist. Außerdem können in gewissen Ausführungsformen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit einer beliebigen Kombination von interessierenden Polynukleotidsequenzen kombiniert werden („stacked“), um Pflanzen mit einem gewünschten Phänotyp zu erzeugen. So zum Beispiel können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit beliebigen anderen Polynukleotiden kombiniert werden, die für Polypeptide mit pestizider und/oder insektizider Wirksamkeit codieren, wie zum Beispiel Toxinproteine aus *Bacillus thuringiensis* (beschrieben in US-Patent Nr. 5,366,892; 5,747,450; 5,737,514; 5,723,756; 5,593,881 und Geiser et al. (1986) Gene 48: 109). Die erzeugten Kombinationen können auch mehrfache Kopien von einem beliebigen der interessierenden Polynukleotide beinhalten.

[0040] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Pflanze mindestens eine zusätzliche heterologe Nukleinsäure, die Folgendes umfasst: (iii) eine Nukleotidsequenz, die für ein Herbizidtoleranzenzym, zum Beispiel aus der Gruppe bestehend aus 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS), Glyphosat-Acetyltransferase (GAT), Cytochrom P450, Phosphinothricinacetyltransferase (PAT), Acetohydroxysäuresynthase (AHAS; EC 4.1.3.18, auch unter der Bezeichnung Acetolactatsynthase oder ALS bekannt), Protoporphyrinogenoxidase (PPGO), Phytoendesaturase (PD) und Dicamba-abbauenden Enzymen wie in WO 02/068607 beschrieben codiert.

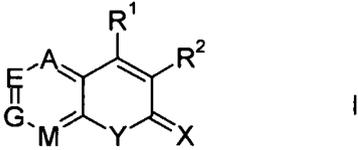
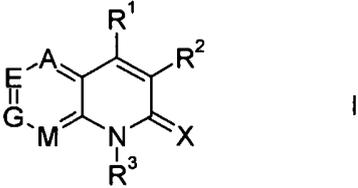
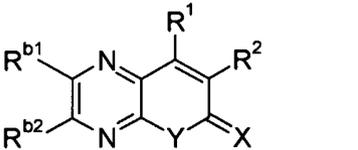
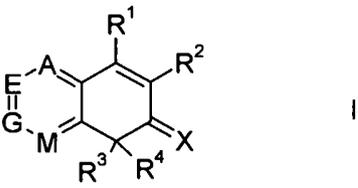
[0041] Im Allgemeinen versteht man unter dem Begriff „Herbizid“ im vorliegenden Zusammenhang einen Wirkstoff, der das Wachstum von Pflanzen abtötet, bekämpft oder auf sonstige Weise ungünstig beeinflusst. Die bevorzugte Menge oder Konzentration an Herbizid ist eine „wirksame Menge“ oder „wirksame Konzentration“. Unter „wirksame Menge“ und „wirksame Konzentration“ versteht man eine Menge bzw. Konzentration, die ausreicht, um das Wachstum einer ähnlichen Wildtyppflanze, eines ähnlichen Wildtyppflanzengewebes, einer ähnlichen Wildtyppflanzenzelle oder einer ähnlichen Wildtypwirtszelle abtötet oder hemmt, wobei diese Menge jedoch das Wachstum der/des erfindungsgemäßen herbizidresistenten Pflanzen, Pflanzengewebes, Pflanzenzellen und Wirtszellen nicht abtötet oder gleich stark hemmt. Typischerweise handelt es sich bei der wirksamen Menge eines Herbizids um eine Menge, die routinemäßig in landwirtschaftlichen Produktionssystemen eingesetzt wird, um interessierende Unkräuter abzutöten. Der Durchschnittsfachmann ist mit einer solchen Menge vertraut. Das erfindungsgemäße Cumarinderivatherbizid weist eine herbizide Wirksamkeit auf, wenn sie direkt auf die Pflanze oder auf den Ort der Pflanze zu einem beliebigen Wachstumsstadium oder vor dem Auspflanzen oder dem Auflaufen ausgebracht wird. Die beobachtete Wirkung hängt von der zu bekämpfenden Pflanzenart, dem Wachstumsstadium der Pflanze, den Ausbringungsparametern Verdünnung und Sprühtröpf-

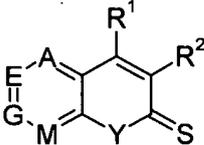
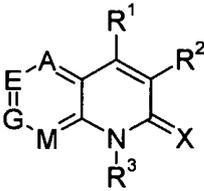
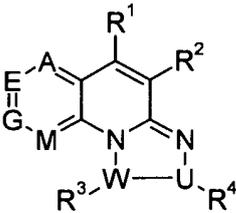
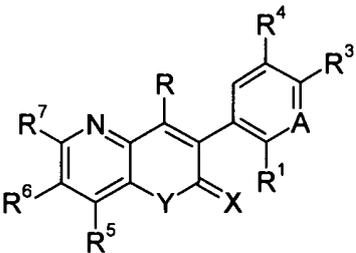
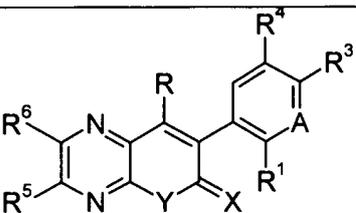
chengröße, der Teilchengröße der festen Komponenten, der Umweltbedingungen zum Verwendungszeitpunkt, der jeweiligen eingesetzten Verbindung, den jeweiligen eingesetzten Hilfsmitteln und Trägern, der Bodenart und dergleichen sowie der eingesetzten Chemikalienmenge ab. Diese und andere Faktoren können auf fachbekannte Art und Weise eingestellt werden, um eine nichtselektive oder selektive Herbizidwirkung zu fördern. Im Allgemeinen wird bevorzugt, dass das Cumaronderivatherbizid im Nachauflauf auf eine relativ unreife unerwünschte Vegetation ausgebracht wird, um eine maximale Unkrautbekämpfungswirkung zu erzielen.

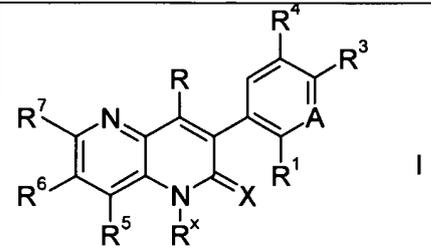
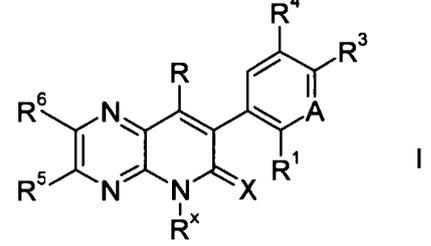
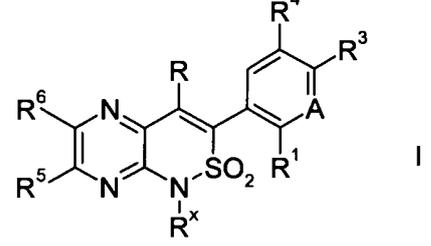
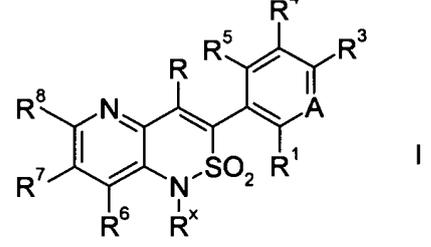
[0042] Unter einer „herbizidtoleranten“ oder „herbizidresistenten“ Pflanze versteht man, dass eine Pflanze gegen mindestens ein Herbizid bei einer Aufwandmenge, die normalerweise das Wachstum einer normalen Pflanze bzw. Wildtyppflanze abtöten oder hemmen würde, tolerant oder resistent ist. Unter „herbizidtolerantem mut-HPPD-Protein“ oder „herbizidresistentem mut-HPPD-Protein“ versteht man, dass solch ein mut-HPPD-Protein in Gegenwart von mindestens einem Herbizid, von dem bekannt ist, dass es die HPPD-Aktivität stört und bei einer Konzentration oder Aufwandmenge des Herbizids, von der bekannt ist, dass es die HPPD-Aktivität des Wildtyp-mut-HPPD-Proteins hemmt, eine in Bezug auf die HPPD-Aktivität eines Wildtyp-mut-HPPD-Proteins höhere HPPD-Aktivität aufweist. Weiterhin kann die HPPD-Aktivität solch eines herbizidtoleranten oder herbizidresistenten mut-HPPD-Proteins im vorliegenden Zusammenhang als „herbizidtolerante“ oder „herbizidresistente“ HPPD-Aktivität bezeichnet werden.

[0043] Das erfindungsgemäße „Cumaronderivatherbizid“ umfasst die in Tabelle 2 unten dargestellten Verbindungen.

Tabelle 2

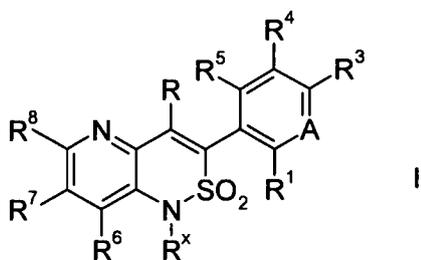
Nr.	Allgemeine Struktur	Anmeldungsnummer und -bezugszeichen	Veröffentlichungsnummer	Seiten
1		PCT/EP2009/063387 (PF61381-1)	WO2010/049270	1 bis 2
2		PCT/EP2009/063386 (PF61381-2)	WO2010/049269	1 bis 2
3		EP09162085.6 (PF62203)	WO2010/139657 WO2010/139658	1 bis 2
4		EP09174833.5 EP10189606.6 (PF62704)		1 bis 2

5		EP09174585.1 (PF62698)		1 bis 2
6		EP09175673.4 PCT/EP2010/067059 (PF62736)		1 bis 2
7		EP09175959.7 PCT/EP2010/067176 (PF62752)		1 bis 2
8		EP10157312.9 US61/316400 PCT/EP2011/054258 (PF70482)		1 bis 2
9		EP10157290.7 US61/316394 PCT/EP2011/054281 (PF70483)		1 bis 3

10		EP10157296.4 US61/316398 PCT/EP2011/054280 (PF70484)		1 bis 3
11		EP10157282.4 US61/316396 PCT/EP2011/054403 (PF70485)		1 bis 3
12		EP10157352.5 US61/316405 PCT/EP2011/054128 PF70528		1 bis 3
13		EP10157419.2 US61/316461 PCT/EP2011/054129 (PF70527)		1 bis 2
14	Formeln 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1ia, 1ib, 1ic, 1id, 1ie, 1if	PCT/GB2009/002188	WO2010/029311	3 bis 11; 12 bis 18
15	Formel I (a bis d)	PCT/GB2009/000126	WO2009/090401	1 bis 17
16	Formel I (a bis d)	PCT/GB2009/000127	WO2009/090402	1 bis 17
17	Formel I (a, b)	PCT/GB2007/004662	WO2008/071918	1 bis 11
18	Formel I (a bis d)	PCT/GB2007/002668	WO2008/009908	1 bis 16

[0044] Die oben zitierten Anmeldungen, insbesondere die Offenbarungen, die sich auf die Verbindungen von Tabelle 2 und ihre möglichen Substituenten beziehen, gelten voll inhaltlich durch Bezugnahme als Bestandteil des vorliegenden Texts.

[0045] Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Cumarinderivat-herbizid gemäß Nr. 13 von Tabelle 2 oben mit der Formel:



I

in der die Variablen die folgende Bedeutung aufweisen:

R bedeutet O-R^A, S(O)_n-R^A oder O-S(O)_n-R^A;

R^A bedeutet Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, Z-C₃-C₆-Cycloalkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₂-C₆-Alkenyl, Z-C₃-C₆-Cycloalkenyl, C₂-C₆-Alkyl, Z-(Tri-C₁-C₄-alkyl)silyl, Z-C(=O)-R^a, Z-NRⁱ-C(O)-NRⁱⁱ, Z-P(=O)(R^a)₂, NRⁱRⁱⁱ, einen 3- bis 7-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome aus der Gruppe bestehend aus O, N und S enthält und der teilweise oder vollständig durch Gruppen R^a und/oder R^b substituiert sein kann,

R^a bedeutet Wasserstoff, OH, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, Z-C₃-C₆-Cycloalkyl, C₂-C₈-Alkenyl, Z-C₅-C₆-Cycloalkenyl, C₂-C₈-Alkyl, Z-C₁-C₆-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Halogenalkoxy, Z-C₃-C₈-Alkenyloxy, Z-C₃-C₈-Alkinyloxy, NRⁱRⁱⁱ, C₁-C₆-Alkylsulfonyl, Z-(Tri-C₁-C₄-alkyl)silyl, Z-Phenyl, Z-Phenoxy, Z-Phenylamino oder einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei die cyclischen Gruppen unsubstituiert oder durch 1, 2, 3 oder 4 Gruppen R^b substituiert sind;

Rⁱ, Rⁱⁱ bedeuten unabhängig voneinander Wasserstoff, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₃-C₈-Alkenyl, C₃-C₈-Alkyl, Z-C₃-C₆-Cycloalkyl, Z-C₁-C₈-Alkoxy, Z-C₁-C₈-Halogenalkoxy, Z-C(=O)-R^a, Z-Phenyl, einen 3- bis 7-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält und der über Z gebunden ist;

Rⁱ und Rⁱⁱ gemeinsam mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, können auch einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, bedeuten;

R^b bedeuten unabhängig voneinander Z-CN, Z-OH, Z-NO₂, Z-Halogen, Oxo (=O), =N-R^a, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkyl, Z-C₁-C₈-Alkoxy, Z-C₁-C₈-Halogenalkoxy, Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, O-Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Z-C(=O)-R^a, NRⁱRⁱⁱ, Z-(Tri-C₁-C₄-alkyl)silyl, Z-Phenyl und S(O)_nR^{bb}; zwei Gruppen R^b können gemeinsam einen Ring bilden, der drei bis sechs Ringglieder aufweist und der zusätzlich zu Kohlenstoffatomen auch Heteroatome aus der Gruppe bestehend aus O, N und S enthalten kann und der unsubstituiert oder durch weitere Gruppen R^b substituiert sein kann;

R^{bb} bedeutet C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Halogenalkenyl, C₂-C₆-Halogenalkyl oder C₁-C₆-Halogenalkyl;

Z bedeutet eine kovalente Bindung oder C₁-C₄-Alkylen;

n bedeutet 0, 1 oder 2;

R¹ bedeutet Cyano, Halogen, Nitro, C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkyl, C₁-C₆-Halogenalkyl, Z-C₁-C₆-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkylthio, Z-C₁-C₄-Alkylthio-C₁-C₄-alkylthio, C₂-C₆-Alkenyloxy, C₂-C₆-Alkinyloxy, C₁-C₆-Halogenalkoxy, C₁-C₄-Halogenalkoxy-C₁-C₄-alkoxy, S(O)_nR^{bb}, Z-Phenoxy, Z-Heterocyclyloxy, wobei Heterocyclyl einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, teilweise ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus bedeutet, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei cyclische Gruppen unsubstituiert oder teilweise oder vollständig durch R^b substituiert sind;

A bedeutet N oder C-R²;

R², R³, R⁴, R⁵ bedeuten unabhängig voneinander Wasserstoff, Z-Halogen, Z-CN, Z-OH, Z-NO₂, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkyl, C₂-C₈-Halogenalkenyl, C₂-C₈-Halogenalkyl, Z-C₁-C₈-Alkoxy, Z-C₁-C₈-Halogenalkoxy, Z-C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkylthio, Z-C₁-C₄-Alkylthio-C₁-C₄-alkylthio, Z-C₁-C₆-Halogenalkylthio, C₂-C₆-Alkenyloxy, C₂-C₆-Alkinyloxy, C₁-C₆-Halogenalkoxy, C₁-C₄-Halogenalkoxy-C₁-C₄-alkoxy, Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, O-Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Z-C(=O)-R^a, NRⁱRⁱⁱ, Z-(Tri-C₁-C₄-alkyl)silyl, S(O)_nR^{bb}, Z-Phenyl, Z¹-Phenyl, Z-Heterocyclyl, Z¹-Heterocyclyl, wobei Heterocyclyl einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, teilweise ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus bedeutet, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei cyclische Gruppen unsubstituiert oder teilweise oder vollständig durch R^b substituiert sind;

R² gemeinsam mit der an den benachbarten Kohlenstoff gebundenen Gruppe kann auch einen fünf- bis zehngliedrigen gesättigten oder teilweise oder vollständig ungesättigten einkernigen oder zweikernigen Ring bilden,

der zusätzlich zu Kohlenstoffatomen 1, 2 oder 3 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthalten kann und der durch weitere Gruppen R^b substituiert sein kann;

Z^1 bedeutet eine kovalente Bindung, C_1 - C_4 -Alkylenoxy, C_1 - C_4 -Oxyalkylen oder C_1 - C_4 -Alkylenoxy- C_1 - C_4 -alkylen;

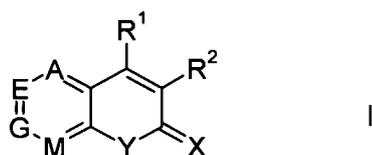
R^6 bedeutet Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, C_1 - C_4 -Halogenalkyl, C_1 - C_4 -Alkoxy, C_1 - C_4 -Alkylthio, C_1 - C_4 -Halogenalkoxy, C_1 - C_4 -Halogenalkylthio;

R^7 , R^8 bedeuten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen oder C_1 - C_4 -Alkyl;

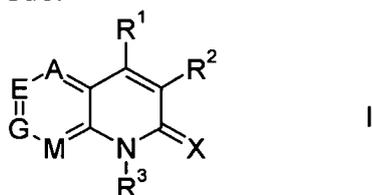
R^x bedeutet C_1 - C_6 -Alkyl, C_1 - C_4 -Halogenalkyl, C_1 - C_2 -Alkoxy- C_1 - C_2 -alkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, C_2 - C_6 -Halogenalkenyl, C_3 - C_6 -Alkynyl, C_3 - C_6 -Halogenalkynyl oder Z-Phenyl, das unsubstituiert oder durch 1 bis 5 Gruppen R^b substituiert ist;

wobei in den Gruppen R^A und R^1 , R^2 , R^3 , R^4 und R^5 und ihren Untersubstituenten die Kohlenstoffketten und/oder die cyclischen Gruppen teilweise oder vollständig durch Gruppen R^b substituiert sein können, oder ein N-Oxid oder ein landwirtschaftlich geeignetes Salz davon.

[0046] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Cumaronderivatherbizid gemäß Nr. 1 und 2 von Tabelle 2 oben mit der Formel:

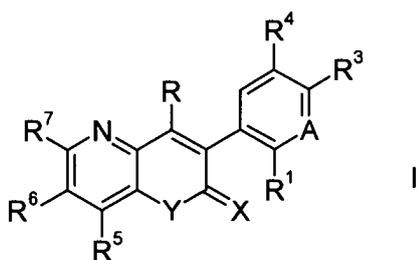


oder



in denen die Variablen wie in WO2010/049270 und WO2010/049269 beschrieben sind.

[0047] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform entspricht das Cumaronderivatherbizid, das sich für die vorliegende Erfindung eignet, der folgenden Formel (Tabelle 2, Nr. 8)



in der die Variablen die folgende Bedeutung aufweisen:

R bedeutet $O-R^A$, $S(O)_n-R^A$ oder $O-S(O)_n-R^A$;

R^A bedeutet Wasserstoff, C_1 - C_4 -Alkyl, Z- C_3 - C_6 -Cycloalkyl, C_1 - C_4 -Halogenalkyl, C_2 - C_6 -Alkenyl, Z- C_3 - C_6 -Cycloalkenyl, C_2 - C_6 -Alkynyl, Z-(Tri- C_1 - C_4 -alkyl)silyl, Z-C(=O)- R^a , Z-NRⁱ-C(O)-NRⁱⁱ, Z-P(=O)(R^a)₂, NRⁱRⁱⁱ, einen 3- bis 7-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome aus der Gruppe bestehend aus O, N und S enthält und der teilweise oder vollständig durch Gruppen R^a und/oder R^b substituiert sein kann,

R^a bedeutet Wasserstoff, OH, C_1 - C_8 -Alkyl, C_1 - C_4 -Halogenalkyl, Z- C_3 - C_6 -Cycloalkyl, C_2 - C_8 -Alkenyl, Z- C_5 - C_6 -Cycloalkenyl, C_2 - C_8 -Alkynyl, Z- C_1 - C_6 -Alkoxy, Z- C_1 - C_4 -Halogenalkoxy, Z- C_3 - C_8 -Alkenyloxy, Z- C_3 - C_8 -Alkinyloxy, NRⁱRⁱⁱ, Alkylsulfonyl, Z-(Tri- C_1 - C_4 -alkyl)silyl, Z-Phenyl, Z-Phenoxy, Z-Phenylamino oder einem 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei die cyclischen Gruppen unsubstituiert oder durch 1, 2, 3 oder 4 Gruppen R^b substituiert sind;

Rⁱ, Rⁱⁱ bedeuten unabhängig voneinander Wasserstoff, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₃-C₈-Alkenyl, C₃-C₈-Alkynyl, Z-C₃-C₆-Cycloalkyl, Z-C₁-C₈-Alkoxy, Z-C₁-C₈-Halogenalkoxy, Z-C(=O)-R^a, Z-Phenyl, einen 3- bis 7-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält und der über Z gebunden ist;

Rⁱ und Rⁱⁱ gemeinsam mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, können auch einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen Heterocyclus, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, bedeuten;

Z bedeutet eine kovalente Bindung oder C₁-C₄-Alkylen;

n bedeutet 0, 1 oder 2;

R¹ bedeutet Cyano, Halogen, Nitro, C₁-C₆-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₁-C₆-Halogenalkyl, Z-C₁-C₆-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkylthio, Z-C₁-C₄-Alkylthio-C₁-C₄-alkylthio, C₂-C₆-Alkenyloxy, C₂-C₆-Alkinyloxy, C₁-C₆-Halogenalkoxy, C₁-C₄-Halogenalkoxy-C₁-C₄-alkoxy, S(O)_nR^{bb}, Z-Phenoxy, Z-Heterocyclyloxy, wobei Heterocyclyl einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, teilweise ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus bedeutet, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei cyclische Gruppen unsubstituiert oder teilweise oder vollständig durch R^b substituiert sind;

R^{bb} bedeutet C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₂-C₆-Alkynyl, C₂-C₆-Halogenalkenyl, C₂-C₈-Halogenalkynyl oder C₁-C₆-Halogenalkyl und n bedeutet 0, 1 oder 2;

A bedeutet N oder C-R²;

R² bedeutet Z¹-Phenyl, Phenoxy oder Z¹-Heterocyclyl, wobei Heterocyclyl einen 5- oder 6-gliedrigen einkernigen oder 9- oder 10-gliedrigen zweikernigen gesättigten, teilweise ungesättigten oder aromatischen Heterocyclus bedeutet, der 1, 2, 3 oder 4 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthält, wobei cyclische Gruppen unsubstituiert oder teilweise oder vollständig durch R^b substituiert sind; C₁-C₈-Alkyl, C₂-C₄-Halogenalkyl, C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkyl, C₁-C₄-Alkylthio-C₁-C₄-alkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkynyl, C₂-C₈-Halogenalkenyl, C₂-C₈-Halogenalkynyl, C₂-C₆-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Alkoxy-C₁-C₄-alkoxy, Z-C₁-C₄-Halogenalkoxy-C₁-C₄-alkoxy, C₂-C₆-Halogenalkoxy, C₃-C₆-Alkenyloxy, C₃-C₆-Alkinyloxy, C₂-C₆-Alkylthio, C₂-C₆-Halogenalkylthio, Z-C(=O)-R^a, S(O)₁₋₂R^{bb};

Z¹ bedeutet eine kovalente Bindung, C₁-C₄-Alkylenoxo, C₁-C₄-Oxyalkylen oder C₁-C₄-Alkylenoxo-C₁-C₄-alkylen;

R^b bedeuten unabhängig voneinander Z-CN, Z-OH, Z-NO₂, Z-Halogen, Oxo (=O), =N-R^a, C₁-C₈-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₂-C₈-Alkenyl, C₂-C₈-Alkynyl, Z-C₁-C₈-Alkoxy, Z-C₁-C₈-Halogenalkoxy, Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, O-Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, Z-C(=O)-R^a, NRⁱRⁱⁱ, Z-(Tri-C₁-C₄-alkyl)silyl, Z-Phenyl und S(O)_nR^{bb}; zwei Gruppen R^b können gemeinsam einen Ring bilden, der drei bis sechs Ringglieder aufweist und der zusätzlich zu Kohlenstoffatomen auch Heteroatome aus der Gruppe bestehend aus O, N und S enthalten kann und der unsubstituiert oder durch weitere Gruppen R^b substituiert sein kann;

R² gemeinsam mit der an das benachbarte Kohlenstoffatom gebundenen Gruppe kann auch einen fünf- bis zehngliedrigen gesättigten oder teilweise oder vollständig ungesättigten einkernigen oder zweikernigen Ring bilden, der zusätzlich zu Kohlenstoffatomen 1, 2 oder 3 Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus O, N und S, enthalten kann und der durch weitere Gruppen R^b substituiert sein kann;

R³ bedeutet Wasserstoff, Halogen, Cyano, Nitro, C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₁-C₄-Alkoxy, C₁-C₄-Halogenalkoxy, C₂-C₄-Alkenyl, C₂-C₄-Alkynyl, C₂-C₄-Alkenyloxy, C₂-C₄-Alkinyloxy, S(O)_nR^{bb};

R⁴ bedeutet Wasserstoff, Halogen oder C₁-C₄-Halogenalkyl;

R⁵ bedeutet Wasserstoff, C₁-C₄-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₁-C₄-Alkoxy, C₁-C₄-Alkylthio, C₁-C₄-Halogenalkoxy, C₁-C₄-Halogenalkylthio;

R⁶, R⁷ bedeuten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen oder C₁-C₄-Alkyl;

Y bedeutet O oder S;

X bedeutet O, S oder N-R^x;

R^x bedeutet Wasserstoff, C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, C₂-C₆-Alkenyl, C₃-C₆-Alkynyl, Z-C₃-C₁₀-Cycloalkyl, C₁-C₆-Alkoxy-C₁-C₆-alkyl, C₁-C₆-Cyanoalkyl, Z-Phenyl, Z-C(=O)-R^{a2} oder Tri-C₁-C₄-alkylsilyl;

R^{a2} bedeutet C₁-C₆-Alkyl, C₁-C₄-Halogenalkyl, Z-C₁-C₆-Alkoxy, Z-C₁-C₄-Halogenalkoxy oder NRⁱRⁱⁱ;

wobei in den Gruppen R^A und ihren Untersubstituenten die Kohlenstoffketten und/oder die cyclischen Gruppen teilweise oder vollständig durch Gruppen R^b substituiert sein können, oder ein N-Oxid oder ein landwirtschaftlich geeignetes Salz davon.

[0048] Die erfindungsgemäßen Cumaronderivate werden häufig am besten zusammen mit einem oder mehreren weiteren Herbiziden, denen die HPPD und/oder die HST als Angriffspunkt dient, ausgebracht, um ein breiteres Spektrum an unerwünschter Vegetation zu bekämpfen. Werden die im Vorliegenden beanspruchten Verbindungen zusammen mit weiteren Herbiziden, denen die HPPD und/oder HST als Angriffspunkt dient, verwendet, so können sie mit dem anderen Herbizid bzw. den anderen Herbiziden formuliert werden, mit dem

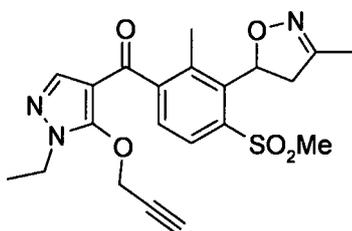
anderen Herbizid bzw. den anderen Herbiziden als Tank-Mix eingesetzt werden oder nacheinander mit dem anderen Herbizid oder den anderen Herbiziden ausgebracht werden.

[0049] Zu einigen der Herbizide, die zusammen mit den erfindungsgemäßen Cumaronderivaten nützlich sind, zählen Benzobicyclon, Mesotrion, Sulcotrion, Tefuryltrion, Tembotrion, 4-Hydroxy-3-[[2-(2-methoxyethoxy)methyl]-6-(trifluormethyl)-3-pyridinyl]carbonyl]-bicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (Bicyclopyron), Ketospiradox oder dessen freie Säure, Benzofenap, Pyrasulfotol, Pyrazolynat, Pyrazoxyfen, Topramezon, [2-Chlor-3-(2-methoxyethoxy)-4-(methylsulfonyl)phenyl](1-ethyl-5-hydroxy-1H-pyrazol-4-yl)methanon, (2,3-Dihydro-3,3,4-trimethyl-1,1-dioxidobenzo[b]thien-5-yl)(5-hydroxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)methanon, Isoxachlortol, Isoxaflutol, α -(Cyclopropylcarbonyl)-2-(methylsulfonyl)- β -oxo-4-chlorbenzolpropannitril sowie α -(Cyclopropylcarbonyl)-2-(methylsulfonyl)- β -oxo-4-(trifluormethyl)benzolpropannitril.

[0050] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem zusätzlichen Herbizid um Topramezon.

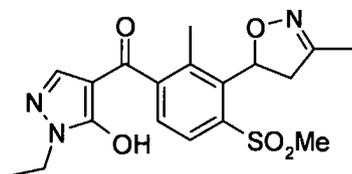
[0051] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem zusätzlichen Herbizid um

(1-Ethyl-5-prop-2-inyloxy-1H-pyrazol-4-yl)-[4-methansulfonyl-2-methyl-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]methanon



oder

(1-Ethyl-5-hydroxy-1H-pyrazol-4-yl)-[4-methansulfonyl-2-methyl-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]methanon



[0052] Die oben beschriebenen Verbindungen sind ausführlicher in EP 09177628.6 beschrieben, die voll inhaltlich durch Bezugnahme in den vorliegenden Text aufgenommen wird.

[0053] Die erfindungsgemäßen herbiziden Verbindungen können weiterhin zusammen mit zusätzlichen Herbiziden verwendet werden, gegen die die Kulturpflanze auf natürliche Weise tolerant ist oder gegen die sie durch Expression von einem oder mehreren zusätzlichen Transgenen, wie oben erwähnt, resistent ist. Zu einigen der Herbizide, die gemeinsam mit den erfindungsgemäßen Verbindungen verwendet werden können, zählen Sulfonamide wie Metosulam, Flumetsulam, Cloransulam-methyl, Diclosulam, Penoxsulam und Florasulam, Sulfonylharnstoffe wie Chlorimuron, Tribenuron, Sulfometuron, Nicosulfuron, Chlorsulfuron, Amidosulfuron, Triasulfuron, Prosulfuron, Tritosulfuron, Thifensulfuron, Sulfosulfuron und Metsulfuron, Imidazolinone wie Imazaquin, Imazapic, Imazethapyr, Imzapyr, Imazamethabenz und Imazamox, Phenoxyalkansäuren wie 2,4-D, MCPA, Dichlorprop und Mecoprop, Pyridinyloxyessigsäuren wie Triclopyr und Fluroxypyr, Carbonsäuren wie Clopyralid, Picloram, Aminopyralid und Dicamba, Dinitroaniline wie Trifluralin, Benefin, Benfluralin und Pendimethalin, Chloracetanilide wie Alachlor, Acetochlor und Metolachlor, Semicarbazone (Auxintransporthemmer) wie Chlorfurenol und Diflufenzopyr, Aryloxyphenoxypropionate wie Fluazifop, Haloxyfop, Diclofop, Clodinafop und Fenoxaprop und andere geläufige Herbizide einschließlich Glyphosat, Glufosinat, Acifluorfen, Bentazon, Clomazon, Fumiclorac, Fluometuron, Fomesafen, Lactofen, Linuron, Isoproturon, Simazin, Norflurazon, Paraquat, Diuron, Diflufenican, Picolinafen, Cinidon, Sethoxydim, Tralkoxydim, Quinmerac, Isoxaben, Bromoxynil, Metribuzin und Mesotrion.

[0054] Die erfindungsgemäßen Cumaronderivatherbizide können weiterhin zusammen mit Glyphosat und Glufosinat an Glyphosat-toleranten oder Glufosinat-toleranten Kulturen verwendet werden.

[0055] Falls nicht bereits in der Beschreibung oben aufgezählt können die erfindungsgemäßen Cumaronderivatherbizide weiterhin zusammen mit den folgenden Verbindungen verwendet werden:

(a) aus der Gruppe der Lipidbiosynthesehemmer:

Alloxydim, Alloxydim-Natrium, Butoxydim, Clethodim, Clodinafop, Clodinafop-propargyl, Cycloxydim, Cyhalofop, Cyhalofop-butyl, Diclofop, Diclofop-methyl, Fenoxaprop, Fenoxaprop-Ethyl, Fenoxaprop-P, Fenoxaprop-P-ethyl, Fluazifop, Fluazifop-butyl, Fluazifop-P, Fluazifop-P-butyl, Haloxyfop, Haloxyfop-methyl, Haloxyfop-P, Haloxyfop-P-methyl, Metamifop, Pinoxaden, Profoxydim, Propaquizafop, Quizalofop, Quizalofop-ethyl, Quizalofop-tefuryl, Quizalofop-P, Quizalofop-P-ethyl, Quizalofop-P-tefuryl, Sethoxydim, Tepraloxymid, Tralkoxydim, Benfuresat, Butylat, Cycloact, Dalapon, Dimepiperat, EPTC, Esprocarb, Ethofumesat, Flupropanat, Molinat, Orbencarb, Pebulat, Prosulfocarb, TCA, Thiobencarb, Tiocarbazil, Triallat und Ver-nolat;

(b) aus der Gruppe der ALS-Hemmer:

Amidosulfuron, Azimsulfuron, Bensulfuron, Bensulfuron-methyl, Bispyribac, Bispyribacnatrium, Chlorimuron, Chlorimuron-ethyl, Chlorsulfuron, Cinosulfuron, Cloransulam, Cloransulam-methyl, Cyclosulfamuron, Diclosulam, Ethametsulfuron, Ethametsulfuronmethyl, Ethoxysulfuron, Flazasulfuron, Florasulam, Flucarbazon, Flucarbazon-Natrium, Flucetosulfuron, Flumetsulam, Flupyrsulfuron, Flupyrsulfuron-Methylnatrium, Foramsulfuron, Halosulfuron, Halosulfuron-methyl, Imazamethabenz, Imazamethabenz-methyl, Imazamox, Imazapic, Imazapyr, Imazaquin, Imazethapyr, Imazosulfuron, Iodosulfuron, Iodosulfuronmethyl-Natrium, Mesosulfuron, Metosulam, Metsulfuron, Metsulfuron-methyl, Nicosulfuron, Orthosulfamuron, Oxasulfuron, Penoxsulam, Primisulfuron, Primisulfuron-methyl, Propoxycarbazon, Propoxycarbazon-Natrium, Prosulfuron, Pyrazosulfuron, Pyrazosulfuronethyl, Pyribenzoxim, Pyrimisulfan, Pyriftalid, Pyriminobac, Pyriminobac-methyl, Pyri-thiobac, Pyri-thiobac-natrium, Pyroxulam, Rimsulfuron, Sulfometuron, Sulfometuron-methyl, Sulfosulfuron, Thiencarbazon, Thiencarbazon-methyl, Thifensulfuron, Thifensulfuron-methyl, Triasulfuron, Tribenuron, Tribenuron-methyl, Trifloxysulfuron, Triflusulfuron, Triflusulfuronmethyl und Tritosulfuron;

(c) aus der Gruppe der Fotosynthesehemmer:

Ametryn, Amicarbazon, Atrazin, Bentazon, Bentazon-Natrium, Bromacil, Bromofenoxim, Bromoxynil und seine Salze und Ester, Chlorobromuron, Chloridazon, Chlorotoluron, Chloroxuron, Cyanazin, Desmedipham, Desmetryn, Dimefuron, Dimethametryn, Diquat, Diquat-dibromid, Diuron, Fluometuron, Hexazinon, Ioxynil und seine Salze und Ester, Isoproturon, Isouron, Karbutilat, Lenacil, Linuron, Metamitron, Methabenzthiazuron, Metobenzuron, Metoxuron, Metribuzin, Monolinuron, Neburon, Paraquat, Paraquat-dichlorid, Paraquat-dimetilsulfat, Pentanochlor, Phenmedipham, Phenmedipham-ethyl, Prometon, Prometryn, Propanil, Propazin, Pyridafol, Pyridat, Siduron, Simazin, Simetryn, Tebuthiuron, Terbacil, Terbumeton, Terbutylazin, Terbutryn, Thidiazuron und Trietazin;

d) aus der Gruppe der Protoporphyrinogen-IX-Oxidasehemmer:

Acifluorfen, Acifluorfen-natrium, Azafenidin, Bencarbazon, Benzfendizon, Bifenox, Butafenacil, Carfentra-zon, Carfentrazon-ethyl, Chlormethoxyfen, Cinidon-ethyl, Fluazolat, Flufenpyr, Flufenpyr-ethyl, Flumiclorac, Flumiclorac-pentyl, Flumioxazin, Fluoroglycofen, Fluoroglycofen-ethyl, Fluthiacet, Fluthiacet-methyl, Fome-safen, Halosafen, Lactofen, Oxadiargyl, Oxadiazon, Oxyfluorfen, Pentoxazon, Profluazol, Pyraclonil, Pyraflufen, Pyraflufen-ethyl, Saflufenacil, Sulfentrazon, Thidiazimin, 2-Chlor-5-[3,6-dihydro-3-methyl-2,6-dioxo-4-(trifluormethyl)-1(2H)-pyrimidinyl]-4-fluor-N-[(isopropyl)methylsulfamoyl]benzamid (H-1; CAS 372137-35-4), [3-[2-Chlor-4-fluor-5-(1-methyl-6-trifluormethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-3-yl)phenoxy]-2-pyridyloxy]essigsäureethylester (H-2; CAS 353292-31-6), N-Ethyl-3-(2,6-dichlor-4-trifluormethylphenoxy)-5-methyl-1H-pyrazol-1-carboxamid (H-3; CAS 452098-92-9), N-Tetrahydrofurfuryl-3-(2,6-dichlor-4-trifluormethylphenoxy)-5-methyl-1H-pyrazol-1-carboxamid (H-4; CAS 915396-43-9), N-Ethyl-3-(2-chlor-6-fluor-4-trifluormethylphenoxy)-5-methyl-1H-pyrazol-1-carboxamid (H-5; CAS 452099-05-7) und N-Tetrahydrofurfuryl-3-(2-chlor-6-fluor-4-trifluormethylphenoxy)-5-methyl-1H-pyrazol-1-carboxamid (H-6; CAS 45100-03-7);

e) aus der Gruppe der Bleacher-Herbizide:

Aclonifen, Amitrol, Beflubutamid, Benzobicyclon, Benzofenap, Clomazon, Diflufenican, Fluridon, Flurochloridon, Flurtamon, Isoxaflutol, Mesotrion, Norflurazon, Picolinafen, Pyrasulfutol, Pyrazolynat, Pyrazoxyfen, Sulcotrion, Tefuryltrion, Tembotrion, Topramezon, 4-Hydroxy-3-[[2-[(2-methoxyethoxy)methyl]-6-(trifluormethyl)-3-pyridyl]carbonyl]bicyclo[3.2.1]oct-3-en-2-on (H-7; CAS 352010-68-5) und 4-(3-Trifluormethylphenoxy)-2-(4-trifluormethylphenyl)pyrimidin (H-8; CAS 180608-33-7);

f) aus der Gruppe der EPSP-Synthasehemmer:

Glyphosat, Glyphosat-isopropylammonium und Glyphosat-trimesium (Sulfosat);

g) aus der Gruppe der Glutaminsynthasehemmer:

Bilanaphos (Bialaphos), Bilanaphos-Natrium, Glufosinat und Glufosinat-ammonium;

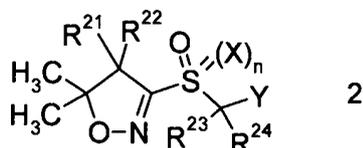
h) aus der Gruppe der DHP-Synthasehemmer: Asulam;

i) aus der Gruppe der Mitosehemmer:

Amiprofos, Amiprofos-methyl, Benfluralin, Butamiphos, Butralin, Carbetamid, Chlorpropham, Chlorthal, Chlorthal-dimethyl, Dinitramin, Dithiopyr, Ethalfuralin, Fluchloralin, Oryzalin, Pendimethalin, Prodiamin, Propham, Propyzamid, Tebutam, Thiazopyr und Trifluralin;

j) aus der Gruppe der VLCFA-Hemmer:

Acetochlor, Alachlor, Anilofos, Butachlor, Cafenstrol, Dimethachlor, Dimethanamid, Dimethenamid-P, Diphenamid, Fentrazamid, Flufenacet, Mefenacet, Metazachlor, Metolachlor, Metolachlor-S, Naproanilid, Napropamid, Pethoxamid, Piperophos, Pretilachlor, Propachlor, Propisochlor, Pyroxasulfon (KIH-485) und Thenylchlor; Verbindungen der Formel 2:



Besonders bevorzugte Verbindungen der Formel 2 sind:

3-[5-(2,2-Difluorethoxy)-1-methyl-3-trifluormethyl-1H-pyrazol-4-ylmethansulfonyl]-4-fluor-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol (2-1); 3-[[5-(2,2-Difluorethoxy)-1-methyl-3-trifluormethyl-1H-pyrazol-4-yl]-fluormethansulfonyl]-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol (2-2); 4-(4-Fluor-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol-3-sulfonylmethyl)-2-methyl-5-trifluormethyl-2H-[1,2,3]triazol (2-3); 4-[[5,5-Dimethyl-4,5-dihydroisoxazol-3-sulfonyl]-fluormethyl]-2-methyl-5-trifluormethyl-2H-[1,2,3]triazol (2-4); 4-(5,5-Dimethyl-4,5-dihydroisoxazol-3-sulfonylmethyl)-2-methyl-5-trifluormethyl-2H-[1,2,3]triazol (2-5); 3-[[5-(2,2-Difluorethoxy)-1-methyl-3-trifluormethyl-1H-pyrazol-4-yl]-difluormethansulfonyl]-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol (2-6); 4-[[5,5-Dimethyl-4,5-dihydroisoxazol-3-sulfonyl]-difluormethyl]-2-methyl-5-trifluormethyl-2H-[1,2,3]triazol (2-7); 3-[[5-(2,2-Difluorethoxy)-1-methyl-3-trifluormethyl-1H-pyrazol-4-yl]-difluormethansulfonyl]-4-fluor-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol (2-8); 4-[Difluor-(4-fluor-5,5-dimethyl-4,5-dihydroisoxazol-3-sulfonyl)-methyl]-2-methyl-5-trifluormethyl-2H-[1,2,3]triazol (2-9);

k) aus der Gruppe der Cellulosebiosynthesehemmer:

Chlorthiamid, Dichlobenil, Flupoxam und Isoxaben;

l) aus der Gruppe der Entkoppler-Herbizide:

Dinoseb, Dinoterb und DNOC und seine Salze;

m) aus der Gruppe der Auxinherbizide:

2,4-D und seine Salze und Ester, 2,4-DB und seine Salze und Ester, Aminopyralid und seine Salze wie Aminopyralid-tris(2-hydroxypropyl)ammonium und seine Ester, Benazolin, Benazolin-ethyl, Chloramben und seine Salze und Ester, Clomeprop, Clopyralid und seine Salze und Ester, Dicamba und seine Salze und Ester, Dichlorprop und seine Salze und Ester, Dichlorprop-P und seine Salze und Ester, Fluroxypyr, Fluroxypyr-butometyl, Fluroxypyr-meptyl, MCPA und ihre Salze und Ester, MCPA-thioethyl, MCPB und seine Salze und Ester, Mecoprop und seine Salze und Ester, Mecoprop-P und seine Salze und Ester, Picloram und seine Salze und Ester, Quinclorac, Quinmerac, TBA (2,3,6) und ihre Salze und Ester, Triclopyr und seine Salze und Ester und 5,6-Dichlor-2-cyclopropyl-4-pyrimidincarbonsäure (H-9; CAS 858956-08-8) und ihre Salze und Ester;

n) aus der Gruppe der Auxintransporthemmer: Diflufenzopyr, Diflufenzopyr-Natrium, Naptalam und Naptalam-Natrium;

o) aus der Gruppe der sonstigen Herbizide: Bromobutid, Chlorflurenol, Chlorflurenol-methyl, Cinmethylin, Cumyluron, Dalapon, Dazomet, Difenzoquat, Difenzoquat-metilsulfat, Dimethipin, DSMA, Dymron, Endothal und seine Salze, Etobenzanid, Flamprop, Flampropisopropyl, Flamprop-methyl Flamprop-M-isopropyl, Flamprop-M-methyl, Flurenol, Flurenol-butyl, Flurprimidol, Fosamin, Fosamin-ammonium, Indanofan, Maleinsäurehydrazid, Mefluidid, Metam, Methylazid, Methylbromid, Methyl-dymron, Methyljodid, MSMA, Ölsäure, Oxaziclomefon, Pelargonsäure, Pyributicarb, Quinoclammin, Triaziflam, Tridiphan und 6-Chlor-3-(2-cyclopropyl-6-methylphenoxy)-4-pyridazinol (H-10; CAS 499223-49-3) und seine Salze und Ester.

[0056] Beispiele für bevorzugte Safener C sind Benoxacor, Cloquintocet, Cyometrinil, Cyprosulfamid, Dichloramid, Dicyclonon, Dietholat, Fenchlorazol, Fenclorim, Flurazol, Fluxofenim, Furilazol, Isoxadifen, Mefenpyr, Mephenat, Naphthalinsäureanhydrid, Oxabetrinil, 4-(Dichloracetyl)-1-oxa-4-azaspiro[4.5]decan (H-11; MON4660, CAS 71526-07-3) und 2,2,5-Trimethyl-3-(dichloracetyl)-1,3-oxazolidin (H-12; R-29148, CAS 52836-31-4).

[0057] Die Verbindungen der Gruppen a) bis o) und die Safeners C sind bekannte Herbizide und Safener, siehe z. B. The Compendium of Pesticide Common Names (<http://www.alanwood.net/pesticides/>); B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicides, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995. Weitere herbizide Effektoren sind aus WO 96/26202, WO 97/41116, WO 97/41117, WO 97/41118, WO 01/83459 und WO 2008/074991 sowie

aus W. Krämer et al. (Hrsg.) "Modern Crop Protection Compounds", Bd. 1, Wiley VCH, 2007 und der darin zitierten Literatur bekannt.

[0058] Es ist allgemein bevorzugt, die erfindungsgemäßen Verbindungen in Kombination mit Herbiziden zu verwenden, die für die behandelte Kultur selektiv sind und die das von diesen Verbindungen bei der eingesetzten Aufwandmenge bekämpfte Unkrautspektrum ergänzen.

[0059] Es ist weiterhin allgemein bevorzugt, die erfindungsgemäßen Verbindungen und andere komplementäre Herbizide gleichzeitig, entweder als Kombi-Formulierung oder als Tankmischung, auszubringen.

[0060] Der Begriff „mut-HPPD-Nukleinsäure“ bezieht sich auf eine HPPD-Nukleinsäure mit einer Sequenz, die von einer Wildtyp-HPPD-Nukleinsäure mutiert ist und die einer Pflanze, in der sie exprimiert wird, erhöhte „Cumarinderivatherbizid“-Toleranz verleiht. Weiterhin bezieht sich der Begriff „mutierte Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (mut-HPPD)“ auf den Ersatz einer Aminosäure der Wildtyp-Primärsequenzen SEQ ID NO: 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, einer Variante, eines Derivats, eines Homologs, eines Orthologs oder eines Paralogs davon durch eine andere Aminosäure. Der Begriff „mutierte Aminosäure“ wird im Folgenden verwendet, um diejenige Aminosäure zu bezeichnen, die durch eine andere Aminosäure ersetzt wird, und bezeichnet so die Stelle der Mutation in der Primärsequenz des Proteins.

[0061] Der Begriff „mut-HST-Nukleinsäure“ bezieht sich auf eine HST-Nukleinsäure mit einer Sequenz, die von einer Wildtyp-HST-Nukleinsäure mutiert ist und die einer Pflanze, in der sie exprimiert wird, erhöhte „Cumarinderivatherbizid“-Toleranz verleiht. Weiterhin bezieht sich der Begriff „mutierte Homogentisatsolanessyltransferase (mut-HST)“ auf den Ersatz einer Aminosäure der Wildtyp-Primärsequenzen SEQ ID NO: 8 oder 10 durch eine andere Aminosäure. Der Begriff „mutierte Aminosäure“ wird im Folgenden verwendet, um diejenige Aminosäure zu bezeichnen, die durch eine andere Aminosäure ersetzt wird, und bezeichnet so die Stelle der Mutation in der Primärsequenz des Proteins.

[0062] Verschiedene HPPD und ihre Primärsequenzen sind im Stand der Technik beschrieben worden, insbesondere die HPPD von Bakterien wie *Pseudomonas* (Ruetschi et al., Eur. J. Biochem., 205, 459–466, 1992, WO96/38567), von Pflanzen, wie *Arabidopsis* (WO96/38567, Genebank AF047834) oder von der Karotte (WO96/38567, Genebank 87257), von *Coccicoides* (Genebank COITRP), HPPD aus *Arabidopsis*, *Brassica*, Baumwolle, *Synechocystis* und Tomate (US 7,297,541), von Säugetieren wie der Maus oder dem Schwein. Weiterhin sind künstliche HPPD-Sequenzen beschrieben worden, wie zum Beispiel in US6,768,044; US6,268,549.

[0063] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleotidsequenz von (i) die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon.

[0064] In einer weiteren Ausführungsform umfasst die Nukleotidsequenz von (ii) die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder eine Variante oder ein Derivat davon.

[0065] Weiterhin wird dem Fachmann klar sein, dass die Nukleotidsequenzen gemäß (i) oder (ii) Homologe, Paraloge und Orthologe von SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 bzw. SEQ ID NO: 7 oder 9 wie im Folgenden definiert umfassen.

[0066] Der Begriff „Variante“ soll in Bezug auf eine Sequenz (z. B. eine Polypeptidsequenz oder Nukleinsäuresequenz wie zum Beispiel eine erfindungsgemäße Transkriptionsregulationsnukleotidsequenz) im Wesentlichen ähnliche Sequenzen bedeuten. Bei Nukleotidsequenzen, die ein offenes Leseraster umfassen, beinhalten Varianten diejenigen Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes für die identische Aminosäuresequenz des nativen Proteins codieren. Natürlich vorkommende Allelvarianten wie diese können durch Verwendung von gut bekannten molekularbiologischen Techniken identifiziert werden, wie zum Beispiel mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und mit Hybridisierungstechniken. Zu Nukleotidvariantensequenzen zählen auch synthetisch abgeleitete Nukleotidsequenzen, wie diejenigen, die zum Beispiel mittels ortsgerechter Mutagenese erzeugt werden und für offene Leseraster für das native Protein codieren, sowie diejenigen, die für ein Polypeptid mit Aminosäuresubstitutionen in Bezug auf das native Protein codieren. Im Allgemeinen weisen erfindungsgemäße Nukleotidsequenzvarianten mindestens 30, 40, 50, 60 bis 70%, z. B. vorzugsweise 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% bis 79%, im Allgemeinen mindestens 80%, z. B. 81%–84%, mindestens 85%, z. B. 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% bis 98% und 99% Nukleotid-„Sequenzidentität“ zu der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 oder 9 auf. Unter Polypeptid-„Variante“ versteht man ein Polypeptid, das sich von dem Protein gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8

oder 10 durch Deletion (sogenannte Verkürzung) oder durch Addition von einer oder mehr Aminosäuren an das N-terminale und/oder C-terminale Ende des nativen Proteins, durch Deletion oder Addition von einer oder mehr Aminosäuren und einer oder mehr Stellen in dem nativen Protein, oder durch Substitution von einer oder mehr Aminosäuren an einer oder mehr Stellen in dem nativen Protein ableitet. Solche Varianten können zum Beispiel das Ergebnis von genetischem Polymorphismus oder vom Eingriff des Menschen sein. Verfahren für solche Manipulationen sind allgemein gut fachbekannt.

[0067] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die ortsgerichtete Mutagenese für die Erzeugung einer HPPD-Variante gemäß SEQ ID NO: 2 dadurch, dass man einen oder mehr der Primer, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, einsetzt.

[0068] Es ist klar, dass die erfindungsgemäßen Polynukleotidmoleküle und Polypeptide Polynukleotidmoleküle und Polypeptide umfassen, die ein Nukleotid oder eine Aminosäure umfassen, das bzw. die ausreichend identisch zu Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID No: 1, 3, 5, 7 oder 9 bzw. zu den Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 oder 19 aufweist. Der Begriff „ausreichend identisch“ soll im vorliegenden Zusammenhang eine erste Aminosäure- oder Nukleotidsequenz bezeichnen, die eine ausreichende oder minimale Anzahl identischer oder äquivalenter (z. B. mit ähnlicher Seitenkette) Aminosäurereste oder Nukleotide in Bezug auf eine zweite Aminosäure oder Nukleotidsequenz enthält, so dass die erste und die zweite Aminosäure- oder Nukleotidsequenz eine gemeinsame Strukturdomäne und/oder eine gemeinsame funktionelle Aktivität aufweisen.

[0069] „Sequenzidentität“ bezieht sich auf das Ausmaß, in dem zwei DNA- oder Aminosäuresequenzen mit optimalem Alignment durch ein Alignment-Fenster von Komponenten, zum Beispiel Nukleotiden oder Aminosäuren, invariant sind. Eine „Identitätsfraktion“ für Testsequenz-Abschnitte und einer Bezugssequenz, mit denen ein Alignment durchgeführt wurde, ist die Anzahl der identischen Komponenten, die den beiden Sequenzen mit Alignment gemeinsam sind, dividiert durch die Gesamtzahlkomponenten in dem Referenzsequenzabschnitt, d. h. der gesamten Referenzsequenz oder einem kleineren definierten Teil der Referenzsequenz. „Prozent-Identität“ ist die Identitätsfraktion mal 100. Ein optimales Alignment von Sequenzen, um mit einem Vergleichsfenster ein Alignment durchzuführen, ist dem Fachmann gut bekannt und kann mit Werkzeugen wie dem „Local Homology Algorithm“ von Smith und Waterman, dem „Homology Alignment Algorithm“ von Needleman und Wunsch, der „Search for Similarity“-Methode von Pearson und Lipman, und vorzugsweise durch computergestützte Implementierungen dieser Algorithmen wie GAP, BESTFIT, FASTA und TFASTA, verfügbar als Teil des GCG-Wisconsin-Pakets, durchgeführt werden (Accelrys Inc. Burlington, Mass.).

[0070] Die Begriffe „Polynukleotid(e)“, „Nukleinsäuresequenz(en)“, „Nukleotidsequenz(en)“, „Nukleinsäure(n)“, „Nukleinsäuremolekül(e)“ werden im vorliegenden Text austauschbar verwendet und beziehen sich auf Nukleotide, entweder Ribonukleotide oder Desoxyribonukleotide oder eine Kombination der beiden, in polymerer unverzweigter Form mit einer beliebigen Länge.

[0071] „Derivate“ eines Proteins umfassen Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, Proteine und Enzyme mit Aminosäuresubstitutionen, -deletionen und/oder -insertionen in Bezug auf das jeweilige unmodifizierte Protein und weisen eine ähnliche biologische und funktionelle Aktivität wie das unmodifizierte Protein, von dem sie abgeleitet sind, auf.

[0072] „Homologe“ eines Proteins umfassen Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, Proteine und Enzyme mit Aminosäuresubstitutionen, -deletionen und/oder -insertionen in Bezug auf das jeweilige unmodifizierte Protein und weisen eine ähnliche biologische und funktionelle Aktivität wie das unmodifizierte Protein, von dem sie abgeleitet sind, auf.

[0073] Eine Deletion bezieht sich auf die Entfernung von einer oder mehr Aminosäuren aus einem Protein.

[0074] Eine Insertion bezieht sich auf einen oder mehr Aminosäurereste, der/die in ein Protein an eine vorbestimmte Stelle eingeführt wird/werden. Insertionen können N-terminale und/oder C-terminale Fusionen sowie die Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren innerhalb der Sequenz umfassen. Im Allgemeinen werden Insertionen innerhalb der Aminosäuresequenz kleiner sein als N- oder C-terminale Fusionen, und zwar in der Größenordnung von ungefähr 1 bis 10 Resten. Zu Beispielen für N- oder C-terminale Fusionsproteine oder Peptide zählen die Bindungsdomäne oder die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsaktivators, wie dies im Hefe-2-Hybrid-System, in Phagen-Hüllproteinen, beim (Histidin)-6-Tag, beim Glutathion-S-Transferase-Tag, bei Protein A, beim Maltosebindungsprotein, bei der Dihydrofolatreduktase, beim Tag-100-Epitop, beim

c-myc-Epitop, beim FLAG®-Epitop, beim lacZ, beim CMP (Calmodulin-Binding Peptide), beim HA-Epitop, beim Protein-C-Epitop und beim VSV-Epitop der Fall ist.

[0075] Eine Substitution bezieht sich auf den Ersatz von Aminosäuren des Proteins durch andere Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften (wie ähnliche Hydrophobizität, Hydrophilizität, Antigenität, Neigung, α -Helixstrukturen oder β -Faltblattstrukturen zu bilden oder zu brechen). Aminosäuresubstitutionen sind typischerweise durch einzelne Reste, können jedoch je nach den funktionellen Einschränkungen, denen das Polypeptid unterliegt, als Cluster vorliegen und können 1 bis 10 Aminosäuren groß sein; Insertionen werden üblicherweise in der Größenordnung von ungefähr 1 bis 10 Aminosäureresten groß sein. Die Aminosäuresubstitutionen sind vorzugsweise konservative Aminosäuresubstitutionen. Konservative Substitutionstabellen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt (siehe zum Beispiel Creighton (1984) Proteins. W. H. Freeman and Company (Hrsg.).

Tabelle 3: Beispiele für konservierte Aminosäuresubstitutionen

Rest	Konservative Substitutionen	Rest	Konservative Substitutionen
Ala	Ser	Leu	Ile; Val
Arg	Lys	Lys	Arg; Gln
Asn	Gln; His	Met	Leu; Ile
Asp	Glu	Phe	Met; Leu; Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr; Gly
Cys	Ser	Thr	Ser; Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp; Phe
His	Asn; Gln	Val	Ile; Leu
Ile	Leu, Val		

[0076] Aminosäuresubstitutionen, -deletionen und/oder -insertionen können leicht unter Verwendung von Peptidsynthesetechniken, die in der Fachwelt gut bekannt sind, wie Festphasen-Peptidsynthese und dergleichen, oder durch rekombinante DNA-Manipulation durchgeführt werden. Verfahren für die Manipulation von DNA-Sequenzen zwecks Erzeugung von Substitutions-, Insertions- oder Deletionsvarianten eines Proteins sind in der Fachwelt gut bekannt. So zum Beispiel ist der Fachmann mit Techniken für die Erzeugung von Substitutionsmutationen an vorbekannten Stellen in der DNA gut vertraut, dazu zählen die M13-Mutagenese, die in-vitro-Mutagenese des T7-Gens (USB, Cleveland, OH), QuickChange Site Directed Mutagenesis (Stratagene, San Diego, CA), PCR-vermittelte ortsgerichtete Mutagenese oder sonstige Vorschriften für die ortsgerichtete Mutagenese.

[0077] „Derivate beinhalten weiterhin Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, die im Vergleich zu der Aminosäuresequenz der natürlich vorkommenden Form des Proteins, wie des interessierenden Proteins, Substitutionen von Aminosäuren durch nicht natürlich vorkommende Aminosäurereste oder Additionen von nicht natürlich vorkommenden Aminosäureresten umfassen. „Derivate eines Proteins“ umfassen auch Peptide, Oligopeptide, Polypeptide, die im Vergleich zu der Aminosäuresequenz einer natürlich vorkommenden Form des Polypeptids natürlich vorkommende, veränderte (glykosylierte, acylierte, prenylierte, phosphorylierte, myrestoylierte, sulfatierte usw.) oder nichtnatürliche veränderte Aminosäurereste umfassen. Ein Derivat kann auch eine(n) oder mehr Nichtaminosäure-Substitutionen oder -Additionen im Vergleich zu der Aminosäuresequenz, von dem es sich ableitet, umfassen, zum Beispiel ein Reportermolekül oder einen sonstigen Liganden, die kovalent oder nichtkovalent an die Aminosäuresequenz gebunden sind, wie ein Reportermolekül, das so gebunden ist, dass sein Nachweis erleichtert wird, sowie nicht natürlich vorkommende Aminosäurereste in Bezug auf die Aminosäuresequenz eines natürlich vorkommenden Proteins. Weiterhin beinhalten „Derivate“ auch Fusionen der natürlich vorkommenden Form des Proteins mit Tagging-Peptiden wie FLAG, HIS6 oder Thioredoxin (für einen Übersichtsartikel über Tagging-Peptide, siehe Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523–533, 2003).

[0078] „Orthologe“ und „Paraloge“ umfassen Begriffe aus der Evolution, die verwendet werden, um die Vorfahrenbeziehungen von Genen zu beschreiben. Paraloge sind Gene innerhalb derselben Art, die durch Duplikation eines Vorfahrens entstanden sind; Orthologe sind Gene von unterschiedlichen Organismen, die

durch Artbildung entstanden sind und die ebenfalls von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Eine nichteinschränkende Aufzählung von Beispielen für solche Orthologe ist in Tabelle 1 dargestellt.

[0079] Es ist in der Fachwelt gut bekannt, dass Paralogen und Orthologen abgegrenzte Domänen gemeinsam sein können, die geeignete Aminosäurereste an bestimmten Stellen bergen, wie Bindungstaschen für bestimmte Substrate oder Bindungsmotive für die Interaktion mit anderen Proteinen.

[0080] Der Begriff „Domäne“ bezieht sich auf einen Satz von Aminosäuren, die an spezifischen Positionen entlang eines Alignments von Sequenzen von evolutionsmäßig verwandten Proteinen konserviert sind. Während Aminosäuren an anderen Positionen zwischen Homologen schwanken können, zeigen Aminosäuren, die an spezifischen Positionen stark konserviert sind, Aminosäuren an, die wahrscheinlich für die Struktur, Stabilität oder Funktion eines Proteins essentiell sind. Sie werden durch ihren hohen Konservierungsgrad in als Alignment dargestellten Sequenzen einer Familie von Proteinhomologen identifiziert und können als Identifikationsmittel verwendet werden, um zu bestimmen, ob irgendein bestimmtes Polypeptid zu einer bereits identifizierten Polypeptidfamilie gehört.

[0081] Der Begriff „Motiv“ oder „Konsensusstruktur“ bezieht sich auf eine kurze konservierte Region in der Sequenz von evolutionsmäßig verwandten Proteinen. Bei Motiven handelt es sich häufig um hochkonservierte Teile von Domänen, sie können jedoch auch nur einen Teil der Domäne beinhalten oder außerhalb einer konservierten Domäne lokalisiert sein (wenn alle Aminosäuren des Motivs außerhalb einer definierten Domäne liegen).

[0082] Für die Identifikation von Domänen gibt es Spezial-Datenbanken, zum Beispiel SMART (Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857–5864; Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242–244), InterPro (Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315–318), Prosite (Sucher und Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Hrsg., S. 53–61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32: D134–D137, (2004)) oder Pfam (Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1): 276–280 (2002)). Ein Satz von Werkzeugen für die in-silico-Analyse von Proteinsequenzen ist auf dem ExpASy-Proteomics-Server verfügbar (Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger et al., ExpASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31: 3784–3788 (2003)). Domänen oder Motive können auch unter Verwendung von Routinetechniken, wie durch Sequenz-Alignment, identifiziert werden.

[0083] Verfahren für das Alignment von Sequenzen für Vergleichszwecke sind gut fachbekannt, zu diesen Methoden zählen GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA und TFASTA. Bei GAP wird der Algorithmus von Needleman und Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48: 443–453) eingesetzt, um das globale Alignment (d. h. das Alignment, das die vollständigen Sequenzen überspannt) von zwei Sequenzen zu finden, das die Anzahl „Matches“ maximiert und die Anzahl „gaps“ minimiert. Beim BLAST-Algorithmus (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403–10) wird die Sequenzidentität in Prozent berechnet, und es wird eine statistische Analyse der Ähnlichkeit zwischen den beiden Sequenzen durchgeführt. Die Software für die Durchführung einer BLAST-Analyse ist der Öffentlichkeit über das National Centre for Biotechnology Information (NCBI) zugänglich. Homologe können leicht unter Verwendung von zum Beispiel dem multiplen Sequenz-Alignment-Algorithmus ClustalW (Version 1.83) identifiziert werden, und zwar mit den Default-Parametern für paarweises Alignment und einer Scoring-Methode in Prozent. Die Gesamtprozentsätze der Ähnlichkeit und der Identität können auch unter Verwendung von einer der in dem MatGAT-Software-Paket verfügbaren Methoden bestimmt werden (Campanella et al., BMC Bioinformatics. 10. Juli 2003; 4: 29. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences.). Für eine Optimierung des Alignments zwischen konservierten Motiven können wie dem Fachmann klar wird kleine manuelle Veränderungen vorgenommen werden. So können außerdem statt Vollängen-Sequenzen für die Identifikation von Homologen auch spezifische Domänen verwendet werden. Die Sequenzidentitätswerte können über die gesamte Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz bestimmt werden oder über ausgewählte Domänen oder konservierte Motiv(e), und zwar unter Einsatz der oben erwähnten Programme mit den Default-Parametern. Für lokale Alignments eignet sich besonders der Algorithmus nach Smith-Waterman (Smith TF, Waterman MS (1981) J. Mol. Biol. 147(1); 195–7).

[0084] Überraschenderweise wurde von den Erfindern der vorliegenden Erfindung gefunden, dass durch Substituieren von einem der mehr der Schlüssel-Aminosäurereste die Herbizidtoleranz oder -resistenz im Vergleich zu der Aktivität der Wildtyp-HPPD-Enzyme mit SEQ ID NO: 2, 4 oder 6 beachtlich erhöht werden konnte. Bevorzugte Substitutionen der mut-HPPD sind solche, die die Herbizidtoleranz der Pflanze erhöhen, die die biologische Wirksamkeit der Dioxygenaseaktivität jedoch im Wesentlichen unbeeinflusst lassen.

[0085] Demgemäß sind in einem weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Schlüsselaminosäurereste eines HPPD-Enzyms, einer Variante, eines Derivats, eines Orthologs, eines Paralogs oder eines Homologs davon durch eine beliebige andere Aminosäure substituiert.

[0086] In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Schlüsselaminosäurereste eines HPPD-Enzyms, einer Variante, eines Derivats, eines Orthologs, eines Paralogs oder eines Homologs davon durch eine konservierte Aminosäure wie in Tabelle 3 oben dargestellt substituiert.

[0087] Dem Fachmann ist klar, dass Aminosäuren, die sich sehr nahe zu den Positionen von unten erwähnten Aminosäuren befinden, ebenfalls substituiert werden können. So umfasst in einer weiteren Ausführungsform die Variante von SEQ ID NO: 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eine Variante, ein Derivat, ein Ortholog, ein Paralog oder ein Homolog davon eine mut-HPPD, in der eine Aminosäure ± 3 , ± 2 oder ± 1 Aminosäurepositionen von einer Schlüsselaminosäure durch eine beliebige andere Aminosäure substituiert ist.

[0088] Auf der Grundlage von gut fachbekannten Techniken kann man ein stark charakteristisches Sequenzmuster ausarbeiten, mit dem nach weiteren mut-HPPD-Kandidaten mit der gewünschten Aktivität gesucht werden kann.

[0089] Die Suche nach weiteren mut-HPPD-Kandidaten durch Anwendung eines geeigneten Sequenzmusters wäre ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfasst. Dem mit dem Fachgebiet vertrauten Leser ist klar, dass das vorliegende Sequenzmuster nicht durch die präzisen Abstände zwischen zwei benachbarten Aminosäureresten des Musters eingeschränkt ist. Jeder der Abstände zwischen zwei Nachbarn in den oben genannten Mustern kann zum Beispiel unabhängig voneinander um ± 10 , ± 5 , ± 3 , ± 2 oder ± 1 Aminosäurepositionen variieren, ohne dass die gewünschte Aktivität wesentlich beeinflusst wird.

[0090] Analog der genannten Funktions- und Raumanalyse von einzelnen Aminosäureresten, die auf den Kristallografiedaten, wie sie gemäß der vorliegenden Erfindung erhalten wurden, beruhen, können einzigartige Aminosäurepartialsequenzen, die für potentiell nützliche muta-HPPD-Kandidaten der Erfindung charakteristisch sind, identifiziert werden.

[0091] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Variante oder das Derivat der mut-HPPD gemäß SEQ ID NO: 2 aus der Tabelle 4a unten ausgewählt, und kombinierte Aminosäuresubstitutionen der mut-HPPD gemäß SEQ ID NO: 2 sind aus Tabelle 4b ausgewählt.

Tabelle 4a: (Sequenz-ID No: 2): einzelne Aminosäuresubstitutionen

Schlüsselaminosäureposition	Substituenten	Bevorzugte Substituenten
Gln293	Ala, Leu, Ile, Val, His, Asn	Val, His, Asn
Met335	Ala, Trp, Phe, Leu, Ile, Val, Asn, Gln	Ala, Trp, Phe
Pro336	Ala	Ala
Ser337	Ala, Pro	Ala, Pro
Phe392	Ala, Leu	Ala
Glu363	Gln	Gln
Gly422	His, Met, Phe, Cys	
Leu427	Phe, Trp	Phe
Thr382	Pro	Pro
Leu385	Ala, Val	Val
Ile393	Ala, Leu	Leu

Tabelle 4b: (Sequenz-ID No: 2): kombinierte Aminosäuresubstitutionen

Kombination Nr.	Schlüsselaminosäureposition	Substituenten	Bevorzugte Substituenten
1	Pro336	Ala	Ala
	Glu363	Gln	Gln
2	Thr382	Pro	Pro
	Leu385	Ala, Val	Val
	Ile393	Ala, Leu	Leu

[0092] Es soll klargelegt werden, dass beliebige Aminosäuren, nicht nur diejenigen, die in der Tabelle oben erwähnt sind, als Substituent verwendet werden könnten. Assays zum Prüfen der Funktionalität von solchen Mutanten sind auf dem Fachgebiet gut verfügbar beziehungsweise im Beispielpart der vorliegenden Erfindung beschrieben.

[0093] In einer bevorzugten Ausführungsform unterscheidet sich die Aminosäuresequenz von einer Aminosäuresequenz einer HPPD gemäß SEQ ID NO: 2 in einer oder mehr der folgenden Positionen: 293, 335, 336, 337, 392, 363, 422, 427, 382, 385, 393. Zu Beispielen für Unterschiede an diesen Aminosäurepositionen zählen, jedoch ohne Einschränkung, eine oder mehr der Folgenden: die Aminosäure in Position 293 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutamin; die Aminosäure in Position 335 ist eine beliebige Aminosäure außer Methionin; die Aminosäure in Position 336 ist eine beliebige Aminosäure außer Prolin; die Aminosäure in Position 337 ist eine beliebige Aminosäure außer Serin; die Aminosäure in Position 392 ist eine beliebige Aminosäure außer Phenylalanin; die Aminosäure in Position 363 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutaminsäure; die Aminosäure in Position 422 ist eine beliebige Aminosäure außer Glycin; die Aminosäure in Position 427 ist eine beliebige Aminosäure außer Leucin; die Aminosäure in Position 382 ist eine beliebige Aminosäure außer Threonin; die Aminosäure in Position 385 ist eine beliebige Aminosäure außer Leucin; die Aminosäure in Position 393 ist eine beliebige Aminosäure außer Isoleucin.

[0094] In manchen Ausführungsformen umfasst das HPPD-Enzym gemäß SEQ ID NO: 2 eine oder mehrere der Folgenden: die Aminosäure in Position 293 ist Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Histidin oder Asparagin; die Aminosäure in Position 335 ist Alanin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Asparagin oder Glutamin; die Aminosäure in Position 336 ist Alanin; die Aminosäure in Position 337 ist Alanin oder Prolin; die Aminosäureposition 392 ist Alanin oder Leucin; die Aminosäureposition 363 ist Glutamin; die Aminosäure in Position 422 ist Histidin, Methionin, Phenylalanin oder Cystein; die Aminosäure in Position 427 ist Phenylalanin oder Tryptophan; die Aminosäureposition 382 ist Prolin; die Aminosäure in Position 385 ist Valin oder Alanin; die Aminosäureposition 393 ist Alanin oder Leucin.

[0095] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das HPPD-Enzym gemäß SEQ ID NO: 2 eine oder mehrere der Folgenden: die Aminosäure in Position 336 ist Alanin; die Aminosäureposition 363 ist Glutamin; die Aminosäureposition 393 ist Leucin; die Aminosäure in Position 385 ist Valin.

[0096] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform unterscheidet sich die Aminosäuresequenz von einer Aminosäuresequenz einer HPPD gemäß SEQ ID NO: 6 in Position 418. Vorzugsweise ist die Aminosäure in Position 418 eine beliebige Aminosäure außer Alanin. Stärker bevorzugt ist die Aminosäure in Position 418 Threonin.

[0097] Der Fachmann weiß, wie konservierte Regionen und Motive, die den Homologen, Orthologen und Paralogen gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 bzw. SEQ ID NO: 7 oder 9 gemeinsam sind, wie diejenigen, die in Tabelle 1 dargestellt sind, identifiziert werden können. Wenn man nun solche konservierten Regionen, die geeignete Bindungsmotive darstellen können, identifiziert hat, so können Aminosäuren entsprechend den in Tabelle 4a und 4b angeführten Aminosäuren gewählt werden und durch eine beliebige andere Aminosäure, vorzugsweise durch konservierte Aminosäuren wie in Tabelle 3 dargestellt und stärker bevorzugt durch die Aminosäuren von Tabelle 4a und 4b substituiert werden.

[0098] Zusätzlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren eines Cumarinderivat-herbizids durch Verwendung einer mut-HPPD, die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 umfasst oder eine Variante davon codiert wird und/oder durch Verwendung einer mut-HST,

die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 7 oder 9 umfasst oder einer Variante davon codiert wird.

[0099] Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- a) Erzeugen einer transgenen Zelle oder Pflanze, die eine Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, umfasst, wobei die mut-HPPD exprimiert wird;
- b) Ausbringen eines Cumaronderivatherbizids auf die transgene Zelle oder Pflanze von a) und auf eine Kontrollzelle oder Kontrollpflanze derselben Sorte;
- c) Bestimmen des Wachstums oder der Lebensfähigkeit der transgenen Zelle oder Pflanze und der Kontrollzelle oder Kontrollpflanze nach Ausbringen des Cumaronderivatherbizids, und
- d) Selektieren von „Cumaronderivatherbiziden“, die den Kontrollzellen oder Kontrollpflanzen im Vergleich zum Wachstum der transgenen Zelle oder Pflanze ein reduziertes Wachstum verleihen.

[0100] Unter „Kontrollzelle“ oder „ähnliche(s), Wildtyp, Pflanze, Pflanzengewebe, Pflanzenzelle oder Wirtszelle“ versteht man eine Pflanze, ein Pflanzengewebe, eine Pflanzenzelle bzw. eine Wirtszelle, der/den die Herbizidresistenzigenschaften und/oder das bestimmte Polynukleotid gemäß der Erfindung, die im vorliegenden Text beschrieben sind, fehlt. Die Verwendung des Begriffs „Wildtyp“ soll daher nicht bedeuten, dass einer Pflanze, einem Pflanzengewebe, einer Pflanzenzelle oder einer anderen Wirtszelle rekombinante DNA in ihrem Genom fehlt und/oder dass sie nicht herbizidresistente Eigenschaften, die sich von den im vorliegenden Text beschriebenen unterscheiden, aufweist.

[0101] Ein weiterer Gegenstand betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer Nukleotidsequenz, die für eine mut-HPPD, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Erzeugen einer Bibliothek von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren,
- b) Screenen einer Population der erhaltenen mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren durch Exprimieren von jeder der Nukleinsäuren in einer Zelle oder Pflanze und Behandeln der Zelle oder Pflanze mit einem Cumaronderivatherbizid,
- c) Vergleichen der von der Population von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren bereitgestellten Cumaronderivatherbizid-Toleranzniveaus mit dem von einer Kontroll-HPPD-codierenden Nukleinsäure bereitgestellten Cumaronderivatherbizid-Toleranzniveau,
- d) Selektieren von mindestens einer mut-HPPD-codierenden Nukleinsäure, die einem Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu dem von der Kontroll-HPPD-codierenden Nukleinsäure bereitgestellten Toleranzniveau ein signifikant erhöhtes Toleranzniveau bereitstellt.

[0102] In einer bevorzugten Ausführungsform stellt die in Schritt d) selektierte mut-HPPD-codierende Nukleinsäure mindestens zweimal soviel Resistenz oder Toleranz einer Zelle oder Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu derjenigen, die von der Kontroll-HPPD-codierenden Nukleinsäure bereitgestellt wird, bereit.

[0103] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform stellt die in Schritt d) ausgewählte mut-HPPD-codierende Nukleinsäure mindestens zweimal, mindestens fünfmal, mindestens zehnmal, mindestens zwanzigmal, mindestens fünfzigmal, mindestens hundertmal, mindestens fünfhundertmal soviel Resistenz oder Toleranz einer Zelle oder Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu derjenigen, die von der Kontroll-HPPD-codierenden Nukleinsäure bereitgestellt wird, bereit.

[0104] Die Resistenz oder Toleranz kann durch Erzeugen einer transgenen Pflanze oder Wirtszelle, vorzugsweise einer Pflanzenzelle, die eine Nukleinsäuresequenz der Bibliothek von Schritt a) umfasst, und Vergleichen der transgenen Pflanze mit einer Kontrollpflanze oder Wirtszelle, vorzugsweise einer Pflanzenzelle, bestimmt werden.

[0105] Ein weiterer Gegenstand betrifft ein Verfahren zum Identifizieren einer Pflanze oder Alge, die eine Nukleinsäure, umfassend eine Nukleotidsequenz, enthält, die für eine mut-HPPD oder mut-HST codiert, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

- a) Identifizieren einer wirksamen Menge eines Cumaronderivatherbizids in einer Kultur von Pflanzenzellen oder Grünalgen, die zum Absterben der Zellen führt,
- b) Behandeln der Pflanzenzellen oder Grünalgen mit einem Mutagenisierungsmittel,
- c) Inkontaktbringen der mutagenisierten Zellpopulation mit einer wirksamen Menge Cumaronderivatherbizid gemäß Identifikation in a),
- d) Selektieren von mindestens einer Zelle, die diese Testbedingungen überlebt,
- e) PCR-Amplifikation und Sequenzieren der HPPD- und/oder HST-Gene aus in d) selektierten Zellen und Vergleichen von solchen Sequenzen mit Wildtyp-HPPD- bzw. -HST-Gensequenzen.

[0106] In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mutagenisierungsmittel um Ethylmethansulfonat (EMS).

[0107] Zum Gewinn von geeigneten Kandidatennukleinsäuren zum Identifizieren einer Nukleotidsequenz, die für eine mut-HPPD codiert, aus verschiedenen unterschiedlichen möglichen Ursprungsorganismen, darunter Mikroorganismen, Pflanzen, Pilze, Algen, gemischte Kulturen usw. sowie aus DNA-Ursprungsmaterial aus der Umwelt, wie dem Boden, stehen viele Verfahren, mit denen der Fachmann gut vertraut ist, zur Verfügung. Zu diesen Verfahren zählen unter anderem die Herstellung von cDNA oder genomischen DNA-Bibliotheken, die Verwendung von geeigneten degenerierten Oligonukleotid-Primern, die Verwendung von Sonden, die auf bekannten Sequenzen oder auf Komplementations-Assays (zum Beispiel auf Wachstum auf Tyrosin) beruhen, sowie die Verwendung von Mutagenese und „Shuffling“, um mut-HPPD-codierende Sequenzen, bei denen eine Rekombination oder ein „Shuffling“ stattgefunden hat, bereitzustellen.

[0108] Nukleinsäuren, die Kandidaten- und Kontroll-HPPD-Codiersequenzen umfassen, können in Hefe, in einem Bakterienwirtsstamm, in einer Alge oder in einer höheren Pflanze wie Tabak oder Arabidopsis exprimiert werden, und die relativen Niveaus der inhärenten Toleranz der HPPD-Codiersequenzen können gemäß einem sichtbaren Indikatorphänotyp des transformierten Stamms bzw. der transformierten Pflanze in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen des gewählten Cumaronderivatherbizids gescreent werden. Die mit diesen Indikatorphänotypen einhergehenden Dosisreaktionen und relativen Verschiebungen bei den Dosisreaktionen (Braunfärbung, Wachstumshemmung, Herbizidwirkung usw.) werden bequem zum Beispiel als WR50-Werte (Konzentration für eine 50%ige Wachstumsreduktion) oder MHK-Werte (minimale Hemmkonzentration) ausgedrückt, wobei erhöhte Werte einer erhöhten inhärenten Toleranz der exprimierten HPPD entsprechen. So zum Beispiel kann in einem relativ rasch durchzuführenden Assay-System, das auf der Transformation eines Bakteriums wie E. coli basiert, jede mut-HPPD-Codiersequenz zum Beispiel als DNA-Sequenz unter der Expressionskontrolle eines kontrollierbaren Promoters, wie dem lacZ-Promoter, exprimiert werden, wobei Aspekten wie der „Codon Usage“ durch die Verwendung von synthetischer DNA Rechnung getragen wird, um bei verschiedenen HPPD-Sequenzen ein vergleichbares Expressionsniveau zu erzielen. Solche Stämme, die Nukleinsäuren, umfassend alternative Kandidaten-HPPD-Sequenzen, exprimieren, können auf unterschiedlichen Konzentrationen des gewählten Cumaronderivatherbizids in einem gegebenenfalls mit Tyrosin angereicherten Medium ausplattiert werden und die relativen Niveaus der inhärenten Toleranz der exprimierten HPPD-Enzyme können auf der Grundlage des Ausmaßes und der MHK für die Hemmung der Bildung des braunen ochronotischen Pigments geschätzt werden.

[0109] In einer anderen Ausführungsform werden Kandidatennukleinsäuren in Pflanzenmaterial hineintransformiert, um eine transgene Pflanze zu erzeugen, zu morphologisch normalen fertilen Pflanzen regeneriert, die anschließend auf differenzielle Toleranz gegen ausgewählte Cumaronderivatherbizide vermessen werden. Auf dem Fachgebiet sind viele geeignete Verfahren für die Transformation unter Verwendung von geeigneten Selektionsmarkern wie Kanamycin, binären Vektoren wie aus Agrobakterium, und für die Pflanzenregeneration wie zum Beispiel aus Tabakblattscheiben, gut bekannt. Gegebenenfalls wird eine Kontrollpflanzenpopulation ebenfalls mit einer Nukleinsäure, die die Kontroll-HPPD exprimiert, transformiert. Alternativ dazu kann eine untransformierte zweikeimblättrige Pflanze wie Arabidopsis oder Tabak als Kontrolle verwendet werden, da diese jedenfalls ihre eigene endogene HPPD exprimiert. Durchschnitt und Verteilung der Herbizidtoleranzniveaus von einer Reihe von primären Pflanzentransformations-Events oder ihrer Nachkommen gegenüber einem aus Tabelle 2 ausgewählten Cumaronderivat werden auf normale Art und Weise auf Grundlage von Pflanzenschädigung, Ausbleichsymptomen am Meristem usw. über einen Bereich von unterschiedlichen Herbizidkonzentrationen ausgewertet. Diese Daten können zum Beispiel als WR50-Werte ausgedrückt werden, die sich aus Dosis-Reaktions-Kurven ableiten, bei denen „Dosis“ auf die x-Achse aufgetragen wird und „Abtötung in Prozent“, „Herbizidwirkung“, „Anzahl der auflaufenden grünen Pflanzen“ usw. auf die y-Achse aufgetragen werden, wobei erhöhte WR50-Werte erhöhten Niveaus von inhärenter Toleranz gegen die exprimierte HPPD entsprechen. Die Herbizide können auf geeignete Art und Weise im Voraufbau oder im Nachaufbau ausgebracht werden.

[0110] Ein weiterer Gegenstand betrifft eine isolierte Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, wobei die Nukleinsäure nach einem wie oben definierten Verfahren identifiziert werden kann.

[0111] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung eine Pflanzenzelle, die mit einer Wildtyp- oder einer mut-HPPD-Nukleinsäure transformiert worden ist, oder eine Pflanzenzelle, die dahingehend mutiert worden ist, dass man zu einer Pflanze, die eine Wildtyp- oder eine mut-HPPD-Nukleinsäure exprimiert, gelangt, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanzenzelle zu einer erhöhten Resistenz oder Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanzenzelle führt.

[0112] Unter dem Begriff „Expression/exprimieren“ oder „Genexpression“ versteht man die Transkription eines bestimmten Gens bzw. von bestimmten Genen, oder eines bestimmten Genkonstrukts. Insbesondere bedeutet der Begriff „Expression“ oder „Genexpression“ die Transkription eines Gens bzw. von Genen, oder einem Genkonstrukt, in Struktur-RNA (rRNA, tRNA) oder mRNA, mit oder ohne anschließende Translation von Letzterer in ein Protein. Der Vorgang umfasst die Transkription der DNA und das Processing des erhaltenen mRNA-Produkts.

[0113] Um zu dem gewünschten Effekt zu gelangen, d. h. zu Pflanzen, die gegen das erfindungsgemäße Cumaronderivatherbizid tolerant oder resistent sind, soll klargestellt werden, dass mindestens eine Nukleinsäure nach Verfahren und Mitteln, mit denen der Fachmann vertraut ist, „überexprimiert“ wird.

[0114] Der Begriff „erhöhte Expression“ oder „Überexpression“ bedeutet im vorliegenden Zusammenhang eine beliebige Form der Expression, die zusätzlich zu dem ursprünglichen Wildtypexpressionsniveau ist. Verfahren zum Erhöhen der Expression von Genen oder Genprodukten sind in der Fachwelt gut beschrieben worden; dazu zählen, zum Beispiel, die von geeigneten Promotern vorangetriebene Überexpression, die Verwendung von Transkriptions-Enhancern oder von Translations-Enhancern. Isolierte Nukleinsäuren, die als Promoter- oder Enhancer-Elemente dienen, können an einer geeigneten Position (typischerweise stromaufwärts) einer nichtheterologen Form eines Polynukleotids eingeführt werden, um die Expression einer Nukleinsäure, die für das interessierende Polypeptid codiert, hinaufzuregulieren. So zum Beispiel können endogene Promoter in vivo durch Mutation, Deletion und/oder Substitution verändert werden (siehe Kmiec, US 5,565,350; Zarlino et al., WO9322443), oder es können isolierte Promoter in eine Pflanzenzelle in der korrekten Orientierung und im korrekten Abstand eines erfindungsgemäßen Gens eingeführt werden, so dass die Expression des Gens kontrolliert wird.

[0115] Will man ein Polypeptid exprimieren, so ist es allgemein wünschenswert, eine Polyadenylierungsregion am 3'-Ende einer Polynukleotid-Codierregion mit zu verwenden. Die Polyadenylierungsregion kann von einem natürlichen Gen, von verschiedenen anderen Pflanzengen oder von T-DNA stammen. Die hinzuzufügende 3'-Sequenz kann zum Beispiel vom Nopalinsynthasegen oder vom Octopinsynthasegen oder auch von einem sonstigen pflanzlichen Gen oder, was weniger bevorzugt ist, von einem sonstigen eukaryontischen Gen stammen.

[0116] Um die Menge der reifen Information, die im Cytosol akkumuliert, zu erhöhen, kann der 5'-untranslatierten Region (UTR) oder der Codiersequenz der Partialcodiersequenz auch eine Intronsequenz hinzugefügt werden. Es wurde gezeigt, dass die Mitverwendung eines spleißbaren Introns in der Transkriptionseinheit sowohl bei pflanzlichen als auch bei tierischen Expressionskonstrukten die Genexpression sowohl auf dem mRNA-Niveau als auch auf dem Proteinniveau bis um das 1000fache erhöht (Buchman und Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395–4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1: 1183–1200). Solch eine Intronverstärkung der Genexpression ist typischerweise dann am größten, wenn sie in der Nähe des 5'-Endes der Transkriptionseinheit platziert wird. Die Verwendung der Mais-Introns Adh1-S Intron 1, 2 und 6, des Bronze-1-Introns, sind in der Fachwelt gut bekannt. Allgemeine Informationen finden sich in: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling und Walbot, Hrsg., Springer, N. Y. (1994).

[0117] Der Begriff „Einführung“ oder „Transformation“ umfasst im vorliegenden Zusammenhang den Transfer eines Fremdpolynukleotids in eine Wirtszelle, und zwar unabhängig von dem für den Transfer eingesetzten Verfahren. Pflanzengewebe, das anschließend durch Klonieren vermehrt werden kann, egal, ob durch Organogenese oder Embryogenese, kann mit einem erfindungsgemäßen Genkonstrukt transformiert werden und eine ganze Pflanze kann daraus regeneriert werden. Das jeweilige ausgewählte Gewebe hängt von den jeweiligen Klonierungsvermehrungssystemen ab, die für die jeweilige zu transformierende Art verfügbar und am besten geeignet sind. Zu Zielgeweben zählen zum Beispiel Blattscheiben, Pollen, Embryonen, Kotyledonen, Hypokotyle, Megagametophyten, Kallusgewebe, existierendes Meristemgewebe (z. B. Apikalmeristem, Achselknospen und Wurzelmeristeme) und induziertes Meristemgewebe (z. B. Kotyledonenmeristem und Hypo-

kotylmeristem). Das Polynukleotid kann in eine Wirtszelle transient oder stabil eingeführt werden und in nicht-integrierter Form, zum Beispiel als Plasmid, aufrechterhalten werden. Es kann jedoch auch in das Wirtsgenom integriert werden. Mit den erhaltenen transformierten Pflanzenzellen kann man dann auf fachbekannte Art und Weise eine transformierte Pflanze regenerieren.

[0118] Der Transfer von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird Transformation genannt. Die Transformation von Pflanzenarten ist heutzutage eine ziemliche Routineangelegenheit. Um das interessierende Gen in eine geeignete Vorfahrenzelle einzuführen, kann vorteilhafterweise eine von verschiedenen Transformationsmethoden eingesetzt werden. Die für die Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen beschriebenen Methoden können für die transiente oder für die stabile Transformation eingesetzt werden. Zu den Transformationsmethoden zählen die Verwendung von Liposomen, die Elektroporation, Chemikalien, die die freie DNA-Aufnahme verstärken, die Injektion der DNA direkt in die Pflanze, der Beschuss mit der Genkanone, die Transformation mit Viren oder Pollen und die Mikroprojektion. Die Methoden können aus den folgenden ausgewählt werden: Calcium/Polyethylenglykol-Methode für Protoplasten (Krens, F. A. et al., (1982) *Nature* 296, 72–74; Negrutiu I et al. (1987) *Plant Mol Biol* 8: 363–373); Elektroporation von Protoplasten (Shillito R. D. et al. (1985) *Bio/Technol* 3, 1099–1102); Mikroinjektion in Pflanzenmaterial (Crossway A et al., (1986) *Mol. Gen Genet* 202: 179–185); Beschuss mit mit DNA oder RNA-beschichteten Partikeln (Klein TM et al., (1987) *Nature* 327: 70) Infektion mit (nichtintegrierenden) Viren und dergleichen. Transgene Pflanzen, darunter auch transgene Kulturpflanzen, werden vorzugsweise mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation erzeugt. Eine vorteilhafte Transformationsmethode ist die Transformation in planta. Zu diesem Zweck kann man zum Beispiel die *Agrobacterien* auf Pflanzensamen einwirken lassen oder das Pflanzenmeristem mit *Agrobacterien* inokulieren. Erfindungsgemäß hat es sich als besonders günstig erwiesen, eine Suspension von transformierten *Agrobakterien* auf die intakte Pflanze oder zumindest die Blütenprimordien einwirken zu lassen. Die Pflanze wird anschließend weiter herangezogen, bis man die Samen der behandelten Pflanze erhält (Clough und Bent, *Plant J.* (1998) 16, 735–743). Zu den Methoden für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation des Reises zählen gut bekannte Methoden für die Reistransformation, wie diejenigen, die in einer der folgenden Schriften beschrieben sind: Europäische Patentanmeldung EP 1198985 A1, Aldemita und Hodges (*Planta* 199: 612–617, 1996); Chan et al. (*Plant Mol Biol* 22 (3): 491–506, 1993), Hiei et al. (*Plant J* 6 (2): 271–282, 1994), die hiermit durch Bezugnahme voll inhaltlich in den vorliegenden Text aufgenommen werden. Bei der Transformation des Maises ist die bevorzugte Methode entweder wie bei Ishida et al. (*Nat. Biotechnol* 14(6): 745–50, 1996) oder bei Frame et al. (*Plant Physiol* 129(1): 13–22, 2002) beschrieben, die hiermit durch Bezugnahme voll inhaltlich in den folgenden Text aufgenommen werden. Diese Methoden sind weiterhin zum Beispiel bei B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg. S. D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128–143 und in Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205–225 beschrieben. Die zu exprimierenden Nukleinsäuren bzw. das zu exprimierende Konstrukt werden/wird vorzugsweise in einen Vektor kloniert, der sich für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* eignet, zum Beispiel pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). *Agrobakterien*, die mit solch einem Vektor transformiert wurden, können dann auf bekannte Weise für die Transformation von Pflanzen eingesetzt werden, wie Modellpflanzen, wie *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* zählt im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung nicht als Kulturpflanze), oder von Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Tabakpflanzen, und zwar zum Beispiel dadurch, dass man verwundete Blätter oder zerkleinerte Blätter in einer *Agrobakterienlösung* badet und sie dann in geeigneten Medien kultiviert. Die Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* wird zum Beispiel bei Höfgen und Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem aus F. F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg. S. D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38 bekannt.

[0119] Zusätzlich zu der Transformation von somatischen Zellen, die dann zu intakten Pflanzen regeneriert werden müssen, kann man auch Zellen von pflanzlichen Meristemen transformieren, insbesondere solche Zellen, die sich zu Gameten entwickeln. In diesem Fall folgen die transformierten Gameten der natürlichen Pflanzenentwicklung und ergeben transgene Pflanzen. So werden zum Beispiel Samen von *Arabidopsis* mit *Agrobakterien* behandelt, und man erhält von den sich entwickelnden Pflanzen, von denen ein gewisser Anteil transformiert und daher transgen ist, Samen [Feldman, KA und Marks MD (1987). *Mol. Gen. Genet.* 208: 274–289; Feldmann K (1992). In: C Koncz, N-H Chua und J Shell, Hrsg., *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, S. 274–289]. Andere Methoden beruhen auf der wiederholten Entfernung der Infloreszenzen und Inkubation der Exzisionsstelle in der Mitte der Rosette mit transformierten *Agrobakterien*, wodurch später ebenfalls transformierte Samen erhalten werden können (Chang (1994). *Plant J.* 5: 551–558; Katavic (1994). *Mol. Gen. Genet.*, 245: 363–370). Eine besonders wirksame Methode ist jedoch die Vakuuminfiltrationsmethode mit ihren Modifikationen, wie der „Floral Dip“-Methode. Bei der Vakuuminfiltration von *Arabidopsis* werden intakte Pflanzen unter verringertem Druck mit einer *Agrobacteriensuspension* behandelt [Bechthold, N

(1993). *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.*, 316: 1194–1199], während bei der „Floral Dip“-Methode das sich entwickelnde Blütengewebe kurz mit einer mit Tensid behandelten Agrobaktériensuspension inkubiert wird [Clough, SJ und Bent AF (1998) *The Plant J.* 16, 735–743]. Ein gewisser Anteil transgener Samen wird in beiden Fällen geerntet, und diese Samen lassen sich von nichttransgenen Samen dadurch unterscheiden, dass man sie unter den oben beschriebenen Selektionsbedingungen heranzieht. Außerdem ist die stabile Transformation von Plastiden vorteilhaft, da Plastide bei den meisten Kulturpflanzen mütterlich vererbt werden, wodurch die Gefahr des Transgenflusses durch Pollen reduziert oder eliminiert wird. Die Transformation des Chloroplastengenoms erfolgt im Allgemeinen durch ein Verfahren, das schematisch bei Klaus et al., 2004 [*Nature Biotechnology* 22 (2), 225–229] gezeigt wurde. Kurz gesagt werden die zu transformierenden Sequenzen gemeinsam mit einem Selektionsmarkergen zwischen flankierende Sequenzen, die zu dem Chloroplastengenom homolog sind, kloniert. Diese homologen flankierenden Sequenzen dirigieren die ortsgerichtete Integration in das Plastom. Die Plastidentransformation ist für viele unterschiedliche Pflanzenarten beschrieben worden, und eine Übersicht findet sich bei Bock (2001) *Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology*. *J. Mol. Biol.* 2001 Sep 21; 312 (3): 425–38 oder Maliga, P (2003) *Progress towards commercialization of plastid transformation technology*. *Trends Biotechnol.* 21, 20–28. Über einen weiteren Fortschritt in der Biotechnologie ist in jüngster Zeit in Form von markerfreien Plastidentransformanten, die durch ein transientes cointegriertes Markergen erzeugt werden können, berichtet worden (Klaus et al., 2004, *Nature Biotechnology* 22(2), 225–229). Die genetisch modifizierten Pflanzenzellen können nach allen Verfahren, mit denen der Fachmann vertraut ist, regeneriert werden. Geeignete Methoden finden sich in den oben genannten Arbeiten von S. D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer.

[0120] Im Allgemeinen werden nach der Transformation Pflanzenzellen oder -zellgruppierungen auf das Vorhandensein von einem oder mehreren Markern selektiert, die von in Pflanzen exprimierbaren Genen, die mit dem interessierenden Gen cotransferiert wurden, codiert werden, wonach das transformierte Material zu einer ganzen Pflanze regeneriert wird. Um die transformierten Pflanzen zu selektieren, wird das in der Transformation erhaltene Pflanzenmaterial üblicherweise Selektionsbedingungen unterworfen, so dass man transformierte Pflanzen von untransformierten Pflanzen unterscheiden kann. So können zum Beispiel Samen, die auf die oben beschriebene Art und Weise erhalten wurden, ausgepflanzt werden und nach einer anfänglichen Wachstumsphase durch Spritzen einer geeigneten Selektion unterworfen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass man die Samen, gegebenenfalls nach dem Sterilisieren, auf Agarplatten heranzieht, wobei man ein geeignetes Selektionsmittel verwendet, so dass nur die transformierten Samen zu Pflanzen heranwachsen können. Alternativ dazu werden die transformierten Pflanzen auf das Vorhandensein eines Selektionsmarkers, wie die oben beschriebenen, gescreent.

[0121] Nach dem DNA-Transfer und der Regeneration können mutmaßlich transformierte Pflanzen auch zum Beispiel unter Verwendung der Southern-Analyse auf das Vorhandensein des interessierenden Gens, die Kopienzahl und/oder die Genomorganisation ausgewertet werden. Alternativ dazu oder zusätzlich können die Expressionsniveaus der neu eingeführten DNA mittels Northern- und/oder Western-Analyse verfolgt werden; beide Techniken sind dem Durchschnittsfachmann gut bekannt.

[0122] Die erzeugten transformierten Pflanzen können mit unterschiedlichen Mitteln vermehrt werden, zum Beispiel durch klonale Vermehrung oder durch klassische Züchtungstechniken. So kann zum Beispiel eine transformierte Pflanze der ersten Generation (T1) geselbstet werden, und homozygote Transformanten der zweiten Generation (T2) können selektiert werden, und die T2-Pflanzen können dann mit Hilfe von klassischen Züchtungstechniken weiter vermehrt werden. Die erzeugten transformierten Organismen können in verschiedener Form vorliegen. So kann es sich zum Beispiel um Chimären von transformierten Zellen und untransformierten Zellen handeln; um klonale Transformanten (zum Beispiel wurden alle Zellen dahingehend transformiert, dass sie die Expressionskassette enthalten); um Pfropfmateriale von transformiertem und untransformiertem Gewebe (zum Beispiel bei Pflanzen ein transformierter Wurzelstock, auf den ein untransformiertes Edelreis gepfropft wurde).

[0123] Vorzugsweise umfasst die Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäure (a) oder die Wildtyp- oder mut-HST-Nukleinsäure (b) eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: a) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon; b) ein Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder eine Variante oder ein Derivat davon; c) ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 codiert, oder eine Variante oder ein Derivat davon; d) ein Polynukleotid, umfassend mindestens 60 aufeinanderfolgende Nukleotide gemäß einem von a) bis c); und e) ein Polynukleotid, das zu dem Polynukleotid gemäß einem von a) bis d) komplementär ist.

[0124] Vorzugsweise führt die Expression der Nukleinsäure in der Pflanze zu der erhöhten Resistenz der Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze.

[0125] In einer weiteren Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf eine Pflanze, vorzugsweise eine transgene Pflanze, umfassend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanze zu der erhöhten Resistenz der Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu der Wildtypsorte der Pflanze führt.

[0126] Bei den im vorliegenden Text beschriebenen Pflanzen kann es sich entweder um transgene Kulturpflanzen oder um nichttransgene Pflanzen handeln.

[0127] Für die Zwecke der Erfindung bedeutet „transgen“, „Transgen“ oder „rekombinant“ zum Beispiel in Bezug auf eine Nukleinsäuresequenz, eine Expressionskassette, ein Genkonstrukt oder einen Vektor, umfassend die Nukleinsäuresequenz, oder einen Organismus, transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassetten oder Vektoren, alle diejenigen Konstrukte, die durch rekombinante Verfahren zustande gekommen sind, in denen entweder

- (a) die Nukleinsäuresequenzen, die für in den erfindungsgemäßen Verfahren nützliche Proteine codieren, oder
- (b) (eine) genetische Kontrollsequenz(en) in operativer Verknüpfung mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, zum Beispiel ein Promoter, oder
- (c) a) und b)

sich nicht in ihrer natürlichen genetischen Umwelt befinden oder durch rekombinante Verfahren modifiziert worden sind, wobei es sich bei der Modifikation zum Beispiel um eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion von einem oder mehreren Nukleotidresten handeln kann. Unter der natürlichen genetischen Umwelt versteht man den natürlichen genetischen oder chromosomalen Locus in der Ursprungspflanze oder das Vorhandensein in einer Genombibliothek. Bei einer Genombibliothek bleibt die natürliche genetische Umwelt der Nukleinsäuresequenz vorzugsweise zumindest teilweise erhalten. Die Umwelt flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest auf einer Seite und weist eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, vorzugsweise mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, am stärksten bevorzugt mindestens 5000 bp, auf. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette – zum Beispiel die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promoters der Nukleinsäuresequenzen mit der entsprechenden Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid codiert, das bei dem Verfahren der vorliegenden Erfindung nützlich ist, wie oben definiert – wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese Expressionskassette durch nichtnatürliche, synthetische („künstliche“) Verfahren wie zum Beispiel mutagene Behandlung modifiziert wird. Geeignete Verfahren sind zum Beispiel in US 5,565,350 oder WO 00/15815 beschrieben.

[0128] Unter einer transgenen Pflanze versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wie oben also, dass die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrem natürlichen Locus im Genom dieser Pflanze liegen, wobei die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden können. Wie erwähnt, bedeutet transgen auch, dass die Sequenz in Bezug auf die natürliche Sequenz modifiziert worden ist und/oder dass die Regulationssequenzen der natürlichen Sequenzen modifiziert worden sind, obwohl die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die Nukleinsäuren, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, an ihrer natürlichen Position im Genom einer Pflanze vorliegen. Transgen bedeutet vorzugsweise die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an einem nichtnatürlichen Locus in dem Genom, das heißt, dass eine homologe oder vorzugsweise heterologe Expression der Nukleinsäuren stattfindet. Bevorzugte transgene Pflanzen sind im vorliegenden Text erwähnt. Weiterhin bezieht sich der Begriff „transgen“ auf eine beliebige Pflanze, eine beliebige Pflanzenzelle, einen beliebigen Callus, ein beliebiges Pflanzengewebe oder einen beliebigen Pflanzenteil, die/der/das das gesamte, oder einen Teil von mindestens einem rekombinanten Polynukleotid enthält. In vielen Fällen ist das gesamte oder ein Teil des rekombinanten Polynukleotids stabil in ein Chromosom oder ein stabiles extrachromosomales Element integriert, so dass es an Folgegenerationen weitergegeben wird. Für die Zwecke der Erfindung bezieht sich der Begriff „rekombinantes Polynukleotid“ auf ein Polynukleotid, das gentechnisch verändert, umgeordnet oder modifiziert worden ist. Zu Beispielen zählen beliebige klonierte Polynukleotide, oder Polynukleotide, die mit heterologen Sequenzen verbunden oder verknüpft sind. Der Begriff „rekombinant“ bezieht sich nicht auf Veränderungen von Polynukleotiden, die das Ergebnis von natürlich vorkommenden Ereignissen sind, wie spontane Mutationen, oder die das Ergebnis von nichtspontaner Mutagenese und anschließender Selektionszüchtung sind.

[0129] Mutationen enthaltende Pflanzen, die aufgrund von nichtspontaner Mutagenese und Selektionszüchtung entstehen, werden im vorliegenden Zusammenhang als nichttransgene Pflanzen bezeichnet und sind von der vorliegenden Erfindung umfasst. In Ausführungsformen, in denen die Pflanze transgen ist und multiple mut-

HPPD-Nukleinsäuren umfasst, können die Nukleinsäuren von unterschiedlichen Genomen oder von demselben Genom stammen. Alternativ dazu befinden sich in Ausführungsformen, in denen die Pflanze nicht transgen ist und multiple mut-HPPD-Nukleinsäuren umfasst, die Nukleinsäuren an unterschiedlichen Genomen oder an demselben Genom.

[0130] In bestimmten Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung herbizidresistente Pflanzen, die durch Mutationszüchtung erzeugt werden. Solche Pflanzen umfassen ein Polynukleotid, das für eine mut-HPPD und/oder eine mut-HST codiert und sind gegen ein oder mehr „Cumaronderivatherbizide“ tolerant. Zu solchen Methoden kann zum Beispiel das Exponieren der Pflanzen oder Samen einem Mutagen, insbesondere einem chemischen Mutagen wie zum Beispiel Ethylmethansulfonat (EMS), und das Selektieren auf Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen mindestens ein oder mehr Cumaronderivatherbizide zählen.

[0131] Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf herbizidtolerante Pflanzen beschränkt, die durch ein Mutageneseverfahren, bei dem das chemische Mutagen EMS eingesetzt wird, erzeugt werden. Für die Herstellung der erfindungsgemäßen herbizidresistenten Pflanzen kann jegliches Mutageneseverfahren, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, verwendet werden. Bei solchen Mutageneseverfahren kann zum Beispiel die Verwendung von einem oder mehreren der folgenden Mutagene erfolgen: Strahlung, wie Röntgenstrahlen, Gammastrahlen (z. B. Cobalt 60 oder Cäsium 137), Neutronen (z. B. das Produkt von Kernspaltung durch Uran 235 in einem Atomreaktor), Betastrahlung (z. B. eine Strahlung, die von Radioisotopen wie Phosphor 32 oder Kohlenstoff 14 emittiert wird) und Ultraviolettstrahlung (vorzugsweise von 2500 bis 2900 nm), sowie chemische Mutagene wie Basenanaloga (z. B. 5-Bromuracil), verwandte Verbindungen (z. B. 8-Ethoxycoffein), Antibiotika (z. B. Streptonigrin), Alkylierungsmittel (z. B. Schwefelensäure, Stickstoffdioxid, Epoxide, Ethylenamine, Sulfate, Sulfonate, Sulfone, Lactone), Azid, Hydroxylamin, salpetrige Säure oder Acridine. Herbizidresistente Pflanzen können auch dadurch erzeugt werden, dass man Gewebekulturmethoden für die Selektion von Pflanzen mit Herbizidresistenzmutationen verwendet und dann herbizidresistente Pflanzen aus diesen selektiert; siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 5,773,702 und 5,859,348, die beide durch Bezugnahme voll inhaltlich in den vorliegenden Text aufgenommen werden. Weitere Einzelheiten der Mutationszüchtung finden sich in „Principals of Cultivar Development“ Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company, die inhaltlich hiermit durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0132] Zusätzlich zu der obigen Definition soll der Begriff „Pflanze“ Kulturpflanzen in einem beliebigen Reife- oder Entwicklungsstadium sowie beliebige Gewebe oder Organe (Pflanzenteile), die von solch einer Pflanze entnommen werden oder stammen, umfassen, falls es sich nicht aus dem Zusammenhang eindeutig anders ergibt. Zu Pflanzenteilen zählen, jedoch nicht ausschließlich, Stengel, Wurzeln, Blüten, Ovula, Staubblätter, Blätter, Embryonen, meristematische Regionen, Kallusgewebe, Antherenkulturen, Gametophyten, Sporophyten, Pollen, Mikrosporen, Protoplasten und dergleichen.

[0133] Die erfindungsgemäße Pflanze umfasst mindestens eine mut-HPPD-Nukleinsäure oder überexprimierte Wildtyp-HPPD-Nukleinsäure und weist im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze eine erhöhte Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid auf. Die erfindungsgemäße Pflanze kann multiple Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Genomen aufweisen, da diese Pflanzen mehr als ein Genom enthalten können. So zum Beispiel enthält eine Pflanze zwei Genome, die üblicherweise als das A- und B-Genom bezeichnet werden. Da es sich bei der HPPD um ein essentielles Stoffwechsellenzym handelt, wird angenommen, dass jedes Genom mindestens ein Gen, das für das HPPD-Enzym codiert, aufweist (d. h. mindestens ein HPPD-Gen). Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Begriff „HPPD-Genlocus“ auf die Position eines HPPD-Gens auf einem Genom, und die Begriffe „HPPD-Gen“ und „HPPD-Nukleinsäure“ beziehen sich auf eine Nukleinsäure, die für das HPPD-Enzym codiert. Die HPPD-Nukleinsäure jedes Genoms unterscheidet sich in ihrer Nukleotidsequenz von einer HPPD-Nukleinsäure eines anderen Genoms. Der Fachmann kann das Ursprungsgenom von jeder HPPD-Nukleinsäure durch genetische Kreuzungsmethoden und/oder entweder Sequenziermethoden oder Exonuklease-Verdauungsmethoden, mit denen der Fachmann vertraut ist, bestimmen.

[0134] Die vorliegende Erfindung beinhaltet Pflanzen, die ein, zwei, drei oder mehr mut-HPPD-Allele umfassen, wobei die Pflanze im Vergleich zu einer Wildtypsorte der Pflanze eine erhöhte Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid aufweist. Die mut-HPPD-Allele können eine Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Polynukleotid wie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 5 definiert oder eine Variante oder ein Derivat davon, ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid wie in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 oder SEQ ID NO.: 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 definiert codiert oder eine Variante oder ein Derivat, Homolog, Ortholog, Paralog davon, ein Polynukleotid mit mindestens 60 aufeinanderfolgenden Nukleotiden

gemäß einem der oben genannten Polynukleotide, sowie ein Polynukleotid, das zu einem beliebigen der oben genannten Polynukleotide komplementär ist, umfassen.

[0135] „Allele“ oder „Allelvarianten“ sind alternative Formen eines bestimmten Gens, die sich an derselben Chromosomenposition befinden. Allelvarianten umfassen Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) sowie kleine Insertions/Deletionspolymorphismen (Small Insertion/Deletion Polymorphisms, INDELS). Die Größe der INDELS beträgt üblicherweise weniger als 100 bp. SNPs und INDELS bilden die größte Gruppe von Sequenzvarianten in natürlich vorkommenden polymorphen Stämmen der meisten Organismen.

[0136] Der Begriff „Varietät“ bezieht sich auf eine Gruppe von Pflanzen innerhalb einer Art, die dadurch definiert ist, dass ihr eine gemeinsame Gruppe von Charakteristika oder Merkmalen gemeinsam ist, von denen die Fachwelt anerkennt, dass sie ausreichen, eine Sorte bzw. Varietät von einer anderen Sorte bzw. Varietät zu unterscheiden. Keiner der Begriffe impliziert, dass alle Pflanzen einer bestimmten Sorte oder Varietät entweder auf dem Niveau des gesamten Gens oder auf molekularem Niveau genetisch identisch sein werden, oder dass eine bestimmte Pflanze an allen Loci homozygot sein wird. Eine Sorte oder Varietät gilt als „reinerbig“ für ein bestimmtes Merkmal, wenn die reinerbige Sorte oder Varietät selbst befruchtet wird und die gesamte Nachkommenschaft das Merkmal enthält. Die Begriffe „Zuchtlinie“ oder „Linie“ beziehen sich auf eine Gruppe von Pflanzen innerhalb einer Sorte, die dadurch definiert ist, dass ihr eine gemeinsame Gruppe von Charakteristika oder Merkmalen gemeinsam ist, von denen die Fachwelt anerkennt, dass sie ausreichen, eine Zuchtlinie bzw. Linie von einer anderen Zuchtlinie bzw. Linie zu unterscheiden. Keiner der Begriffe impliziert, dass alle Pflanzen einer bestimmten Zuchtlinie oder Linie entweder auf dem Niveau des gesamten Gens oder auf molekularem Niveau genetisch identisch sein werden, oder dass eine bestimmte Pflanze an allen Loci homozygot sein wird. Eine Zuchtlinie oder Linie gilt als „reinerbig“ für ein bestimmtes Merkmal, wenn die reinerbige Linie oder die Zuchtlinie selbstbefruchtet wird und die gesamte Nachkommenschaft das Merkmal enthält. In der vorliegenden Erfindung entsteht das Merkmal durch eine Mutation in einem HPPD-Gen der Pflanze oder des Samens.

[0137] Die erfindungsgemäßen herbizidresistenten Pflanzen, die Polynukleotide umfassen, die für mut-HPPD- und/oder mut-HST-Polypeptide codieren, lassen sich auch in Verfahren zur Erhöhung der Herbizidresistenz einer Pflanze durch traditionelle Pflanzenzüchtung, wobei auf geschlechtliche Vermehrung zurückgegriffen wird, verwenden. Die Verfahren umfassen das Kreuzen einer ersten Pflanze, bei der es sich um eine erfindungsgemäße herbizidresistente Pflanze handelt, mit einer zweiten Pflanze, die gegen dasselbe Herbizid bzw. dieselben Herbizide wie die erste Pflanze resistent sein kann oder nicht, oder die gegen ein unterschiedliches Herbizid bzw. unterschiedliche Herbizide als die erste Pflanze resistent sein kann. Bei der zweiten Pflanze kann es sich um eine beliebige Pflanze handeln, die, wenn sie mit der ersten Pflanze gekreuzt wird, fähig ist, lebensfähige Nachkommenschaftspflanzen (d. h. Samen) zu produzieren. Typischerweise, jedoch nicht unbedingt, gehören die erste und die zweite Pflanze zu derselben Art. Bei den Methoden kann gegebenenfalls auf das Selektieren auf Nachkommenschaftspflanzen zurückgegriffen werden, die die mut-HPPD- und/oder mut-HST-Polypeptide der ersten Pflanze und die Herbizidresistenzigenschaften der zweiten Pflanze umfassen. Die nach diesem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugten Nachkommenschaftspflanzen weisen im Vergleich zu entweder der ersten oder der zweiten Pflanze oder beiden eine erhöhte Resistenz gegen ein Herbizid auf. Sind die erste und zweite Pflanze gegen unterschiedliche Herbizide resistent, so werden die Nachkommenschaftspflanzen die kombinierten Herbizidtoleranzeigenschaften der ersten und der zweiten Pflanze aufweisen. Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann weiterhin auf eine oder mehr Generationen zurückgegriffen werden, bei denen die Nachkommenschaftspflanzen der ersten Kreuzung mit einer Pflanze derselben Linie oder desselben Genotyps wie entweder die erste oder die zweite Pflanze zurückgekreuzt wird. Alternativ dazu kann die Nachkommenschaft der ersten Kreuzung oder irgendeiner Folgekreuzung mit einer dritten Pflanze gekreuzt werden, die zu einer unterschiedlichen Linie bzw. einem unterschiedlichen Genotyp als entweder die erste oder die zweite Pflanze gehört. Die vorliegende Erfindung stellt auch Pflanzen, Pflanzenorgane, Pflanzengewebe, Pflanzenzellen, Samen und nichtmenschliche Wirtszellen bereit, die mit dem/der mindestens einen erfindungsgemäßen Polynukleotidmolekül, Expressionskassette oder Transformationsvektor transformiert sind. Solchen transformierten Pflanzen, Pflanzenorgane, Pflanzengewebe, Pflanzenzellen, Samen und nichtmenschliche Wirtszellen weisen eine verstärkte Toleranz oder Resistenz gegen mindestens ein Herbizid bei Herbizidraten, die das Wachstum einer untransformierten Pflanze, eines untransformierten Pflanzengewebes, einer untransformierten Pflanzenzelle bzw. einer untransformierten nichtmenschlichen Wirtszelle abtöten oder hemmen, auf. Vorzugsweise handelt es sich bei den erfindungsgemäßen transformierten Pflanzen, Pflanzengewebe, Pflanzenzellen und Samen um *Arabidopsis thaliana* und Kulturpflanzen.

[0138] Es ist klar, dass die erfindungsgemäßen Pflanzen zusätzlich zu einer mut-HPPD-Nukleinsäure eine Wildtyp-HPPD-Nukleinsäure umfassen können. Es ist vorgesehen, dass die cumaronderivatherbizidtoleranten

Linien eine Mutation in nur einem von multiplen HPPD-Isoenzymen enthalten. Die vorliegende Erfindung beinhaltet daher eine Pflanze, die zusätzlich zu einer oder mehr Wildtyp-HPPD-Nukleinsäuren noch eine oder mehr mut-HPPD-Nukleinsäuren umfasst.

[0139] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung einen Samen, der von einer transgenen Pflanze produziert wird, die eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle umfasst, wobei der Samen für im Vergleich zu einer Wildtypvarietät des Samens erhöhte Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid reinerbig ist.

[0140] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanzenzelle mit einer im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Pflanzenzelle erhöhten Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid, wobei das Verfahren das Transformieren der Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, transformiert.

[0141] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, das Folgendes umfasst: (a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, und (b) Herstellen einer Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid aus der Pflanzenzelle.

[0142] Demgemäß werden erfindungsgemäße mut-HPPD-Nukleinsäuren in Expressionskassetten für die Expression in der interessierenden Pflanze bereitgestellt. Die Kassette beinhaltet Regulationssequenzen in operativer Verknüpfung mit einer erfindungsgemäßen mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz. Der Begriff „Regulations-element“ bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf ein Polynukleotid, das fähig ist, die Transkription eines operativ verknüpften Polynukleotids zu regulieren. Es beinhaltet, jedoch ohne Einschränkung, Promoter, Enhancer, Introns, 5' UTRs und 3' UTRs. Unter „operative Verknüpfung“/„operativ verknüpft“ versteht man eine funktionelle Verknüpfung zwischen einem Promoter und einer zweiten Sequenz, wobei die Promotersequenz die Transkription der DNA-Sequenz, die der zweiten Sequenz entspricht, initiiert und vermittelt. Im Allgemeinen bedeutet operative Verknüpfung/operativ verknüpft, dass die verknüpften Nukleinsäuresequenzen ohne Unterbrechung sind und dort, wo es erforderlich ist, dass zwei Proteincodierregionen verbunden werden, ohne Unterbrechung und leserastergerecht sind. Die Kassette kann zusätzlich mindestens ein zusätzliches Gen enthalten, das in den Organismus cotransformiert werden soll. Alternativ dazu kann das zusätzliche Gen, bzw. können die zusätzlichen Gene, auf multiplen Expressionskassetten bereitgestellt werden.

[0143] Solche eine Expressionskassette wird mit einer Mehrzahl von Restriktionsstellen für die Insertion der mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz, die unter der Transkriptionsregulation der Regulationsregionen stehen soll, bereitgestellt. Die Expressionskassette kann zusätzlich Selektionsmarkergene enthalten.

[0144] Die Expressionskassette beinhaltet in 5'-3'-Transkriptionsrichtung eine Transkriptions- und Translationsinitiationsregion (d. h. einen Promoter), eine erfindungsgemäße mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz sowie eine in Pflanzen funktionelle Transkriptions- und Translationsterminationsregion (d. h. Terminationsregion). Der Promoter kann nativ oder analog oder auch fremd bzw. heterolog in Bezug auf den pflanzlichen Wirt und/oder die erfindungsgemäße mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz sein. Zusätzlich kann es sich bei dem Promoter um die natürliche Sequenz oder alternativ um eine synthetische Sequenz handeln. Wenn der Promoter „fremd“ oder „heterolog“ in Bezug auf den pflanzlichen Wirt ist, so versteht man darunter, dass der Promoter nicht in der nativen Pflanze, in die der Promoter eingeführt wird, vorliegt. Wenn der Promoter „fremd“ oder „heterolog“ in Bezug auf die erfindungsgemäße mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz ist, so versteht man darunter, dass es sich bei dem Promoter nicht um den nativen oder natürlich vorkommenden Promoter für die erfindungsgemäße operativ verknüpfte mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz handelt. Im vorliegenden Zusammenhang umfasst ein chimäres Gen eine Codiersequenz in operativer Verknüpfung mit einer Transkriptionsinitiationsregion, die heterolog in Bezug auf die Codiersequenz ist.

[0145] Obwohl es bevorzugt sein kann, die erfindungsgemäßen mut-HPPD-Nukleinsäuren mit heterologen Promotern zu exprimieren, können auch die nativen Promotersequenzen verwendet werden. Solche Konstrukte würden die Expressionsniveaus des mut-HPPD-Proteins in der Pflanze oder Pflanzenzelle verändern. So wird also der Phänotyp der Pflanze oder Pflanzenzelle verändert.

[0146] Die Terminationsregion kann nativ in Bezug auf die Transkriptionsinitiationsregion sein, nativ in Bezug auf die interessierende operativ verknüpfte mut-HPPD-Sequenz sein, nativ in Bezug auf die Wirtspflanze sein oder von einer sonstigen Quellen stammen (d. h. sie kann fremd oder heterolog in Bezug auf den Promoter, die interessierende mut-HPPD-Nukleinsäuresequenz, die Wirtspflanze oder eine beliebige Kombination davon sein). Geeignete Terminationsregionen sind von dem Ti-Plasmid von *A. tumefaciens* verfügbar, wie die Octo-

pinsynthese- und Nopalinsyntheseterminationsregionen; siehe auch Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262: 141–144; Proudfoot (1991) *Cell* 64: 671–674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 141–149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 2: 1261–1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91: 151–158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891–7903 und Joshi [^] [alpha]. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15: 9627–9639. Gegebenenfalls kann das Gen bzw. können die Gene für erhöhte Expression in der transformierten Pflanze optimiert werden, das heißt, dass die Gene unter Verwendung von in Pflanzen bevorzugten Codons für eine verbesserte Expression synthetisiert werden können; siehe zum Beispiel Campbell und Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1–11, wo die wirtsbevorzugte „Codon Usage“ diskutiert wird. Für die Synthese von in Pflanzen bevorzugten Genen sind auf diesem Gebiet Methoden verfügbar; siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 5,380,831 und 5,436,391 sowie Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 477–498, die hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden.

[0147] Es ist bekannt, dass zusätzliche Sequenzmodifikationen die Genexpression in einer Wirtszelle erhöhen. Dazu zählen die Entfernung von Sequenzen, die für überflüssige Polyadenylierungssignale codieren, Exon-Intron-Spleißstellensignale, transposonartige Sequenzwiederholungen sowie sonstige gut beschriebene Sequenzen, die für die Genexpression schädlich sein können. Der G-C-Gehalt der Sequenz kann auf Mengen eingestellt werden, die für eine bestimmte Wirtszelle durchschnittlich sind; dies kann anhand von bekannten Genen, die in der Wirtszelle exprimiert werden, berechnet werden. Wenn möglich wird die Sequenz dahingehend modifiziert, dass vorhergesagte sekundäre mRNA-Haarnadelstrukturen vermieden werden. Nukleotidsequenzen für die Verstärkung der Genexpression können auch in den Pflanzenexpressionsvektoren verwendet werden. Dazu zählen die Introns des Mais-Adh1-Intron1-Gens (Callis et al. *Genes and Development* 1: 1183–1200, 1987) und die Leitsequenzen (W-Sequenz) aus dem Tabakmosaikvirus (TMV), Maize Chlorotic Mottle Virus und Luzernemosaikvirus (Gallie et al. *Nucleic Acid Res.* 15: 8693–8711, 1987 und Skuzeski et al. *Plant Mol. Biol.* 15: 65–79, 1990). Es wurde gezeigt, dass das erste Intron des Shrunken1-Locus des Maises die Expression von Genen in chimären Genkonstrukten erhöht. Die US-Patente Nr. 5,424,412 und 5,593,874 beschreiben die Verwendung von spezifischen Introns in Genexpressionskonstrukten, und von Gallie et al. (*Plant Physiol.* 106: 929–939, 1994) wurde ebenfalls gezeigt, dass sich Introns für die Regulation der Genexpression auf gewebespezifische Weise eignen. Um die mut-HPPD-Genexpression weiterhin zu verstärken oder zu optimieren können die erfindungsgemäßen Pflanzenexpressionsvektoren auch DNA-Sequenzen enthalten, die MARs (Matrix Attachment Regions) enthalten. Pflanzenzellen, die mit solchen modifizierten Expressionssystemen transformiert wurden, können dann eine Überexpression oder konstitutive Expression einer erfindungsgemäßen Nukleotidsequenz aufweisen.

[0148] Die Expressionskassetten können zusätzlich 5'-Leitsequenzen in dem Expressionskassettenkonstrukt enthalten. Die Wirkung von solchen Leitsequenzen kann darin bestehen, dass die Translation verstärkt wird. Translations-Leitsequenzen sind fachbekannt; dazu zählen: Picornavirus-Leitsequenzen, zum Beispiel die EMCV-Leitsequenz (5'-seitige Nichtcodierregion aus Encephalomyocarditis) (Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6126–6130); Potyvirus-Leitsequenzen, zum Beispiel die TEV-Leitsequenz (TEV = Tobacco Etch Virus) (Gallie et al. (1995) *Gene* 165(2): 233–238), MDMV-Leitsequenz (Mais-Verzweigungs-Mosaikvirus) (*Virology* 154: 9–20), sowie das Human-Bip (Human Immunoglobulin Heavy-Chain Binding Protein) (Macejak et al. (1991) *Nature* 353: 90–94); die nichttranslatierte Leitsequenz aus der Hüllprotein-mRNA des Luzernemosaikvirus (AMV RNA 4) (Jobling et al. (1987) *Nature* 325: 622–625); die Tabakmosaikvirusleitsequenz (TMV) (Gallie et al. (1989) in *Molecular Biology of RNA*, Hrsg. Cech (Liss, New York), S. 237–256); sowie die MCMV (Maize Chlorotic Mottle Virus)-Leitsequenz (Lommel et al. (1991) *Virology* 81: 382–385). Siehe auch Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84: 965–968. Es können auch andere Methoden verwendet werden, von denen bekannt ist, dass sie die Translation verstärken, wie zum Beispiel Introns und dergleichen.

[0149] Bei der Herstellung der Expressionskassette können die verschiedenen DNA-Fragmente so manipuliert werden, dass die DNA-Sequenzen in der korrekten Orientierung und gegebenenfalls leserastergerecht vorliegen. Zu diesem Zweck können Adapter oder Linker verwendet werden, um die DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, oder es kann auf andere Manipulationen zurückgegriffen werden, um zweckmäßige Restriktionsstellen bereitzustellen, überflüssige DNA zu entfernen, Restriktionsstellen zu entfernen und dergleichen. Zu diesem Zweck kann auf in-vitro-Mutagenese, Primer-Repair, Restriktion, Annealing, Resubstitutionen, zum Beispiel Transitionen und Transversionen, zurückgegriffen werden.

[0150] Bei der Durchführung der Erfindung können verschiedene Promoter verwendet werden. Die Promoter können in Abhängigkeit von dem gewünschten Ziel ausgewählt werden. Die Nukleinsäuren können mit konstitutiven Promotern, Promotern mit Gewebebevorzugung oder sonstigen Promotern für die Expression in Pflanzen kombiniert werden. Zu diesen konstitutiven Promotern zählen zum Beispiel der Core-Promoter des Rsyn7-Promoters und andere konstitutive Promoter, die in WO 99/43838 und US-Patent Nr. 6,072,050 beschrieben sind; der Core-CaMV-35S-Promoter (Odell et al. (1985) *Nature* 313: 810–812); Reis-Actin (McElroy et al. (1990)

Plant Cell 2: 163–171); Ubiquitin (Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619–632 und Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675–689); pEMU (Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581–588); MAS (Velten et al. (1984) EMBO J. 3: 2723–2730); ALS-Promoter (US-Patent Nr. 5,659,026) und dergleichen. Zu anderen konstitutiven Promotern zählen zum Beispiel US-Patent Nr. 5,608,149; 5,608,144; 5,604,121; 5,569,597; 5,466,785; 5,399,680; 5,268,463; 5,608,142 und 6,177,611.

[0151] Promoter mit Bevorzugung für Gewebe können für die Adressierung der verstärkten mut-HPPD-Expression innerhalb eines bestimmten Pflanzengewebes eingesetzt werden. Zu solchen Promotern mit Gewebebevorzugung zählen, jedoch ohne Einschränkung, Promoter mit Bevorzugung für das Blatt, Promoter mit Bevorzugung für die Wurzel, Promoter mit Bevorzugung für den Samen und Promoter mit Bevorzugung für den Stengel. Zu den Promotern mit Bevorzugung für das Gewebe zählen Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12(2): 255–265; Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol. 38(7): 792–803; Hansen et al. (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3): 337–343; Russell et al. (1997) Transgenic Res. 6(2): 157–168; Rinehart et al. (1996) Plant Physiol. 112(3): 1331–1341; Van Camp et al. (1996) Plant Physiol. 112(2): 525–535; Canevascini et al. (1996) Plant Physiol. 112(2): 513–524; Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol. 35(5): 773–778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181–196; Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol. 23(6): 1129–1138; Matsuoka et al. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586–9590 und Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4(3): 495–505. Solche Promoter können gegebenenfalls für schwache Expression modifiziert werden. In einer Ausführungsform werden die interessierenden Nukleinsäuren für die Expression an den Chloroplasten adressiert. So wird, wenn die interessierende Nukleinsäure nicht direkt in den Chloroplasten insertiert wird, die Expressionskassette zusätzlich eine Chloroplastenadressierungssequenz enthalten, die eine Nukleotidsequenz umfasst, die für ein Chloroplasten-Transitpeptid codiert, um das interessierende Genprodukt an die Chloroplasten zu adressieren. Solche Transitpeptide sind fachbekannt. In Bezug auf Chloroplasten-Adressierungssequenzen bedeutet „operativ verknüpft“, dass die Nukleinsäuresequenz, die für ein Transitpeptid codiert (d. h. die Chloroplasten-Adressierungssequenz) mit der erfindungsgemäßen mut-HPPD-Nukleinsäure so verknüpft ist, dass die beiden Sequenzen ohne Unterbrechung und leserastergerecht sind; siehe zum Beispiel Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104–126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544–17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965–968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414–1421 und Shah et al. (1986) Science 233: 478–481. Jegliches fachbekannte Chloroplasten-Transitpeptid kann mit der Aminosäuresequenz eines reifen erfindungsgemäßen mut-HPPD-Proteins dadurch fusioniert werden, dass man eine Chloroplasten-Adressierungssequenz operativ mit dem 5'-Ende einer Nukleotidsequenz, die für ein reifes erfindungsgemäßes mut-HPPD-Protein codiert, verknüpft. Chloroplasten-Adressierungssequenzen sind fachbekannt; dazu zählen die chloroplastidäre kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) (de Castro Silva Filho et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30: 769–780; Schnell et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(5): 3335–3342); die 5-(Enolpyruvyl)shikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS) (Archer et al. (1990) J. Bioenerg. Biomemb. 22(6): 789–810); die Tryptophansynthase (Zhao et al. (1995) J. Biol. Chem. 270(11): 6081–6087); Plastocyanin (Lawrence et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(33): 20357–20363); Chorismatsynthase (Schmidt et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(36): 27447–27457); sowie das Light Harvesting Chlorophyll a/b Bindungsprotein (LHBP) (Lamppa et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 14996–14999); siehe auch Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104–126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544–17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965–968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414–1421 und Shah et al. (1986) Science 233: 478–481.

[0152] Verfahren für die Transformation von Chloroplasten sind fachbekannt; siehe zum Beispiel Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526–8530; Svab und Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913–917; Svab und Maliga (1993) EMBO J. 12: 601–606. Das Verfahren beruht auf der Abgabe von DNA, die einen Selektionsmarker enthält, mit der Genkanone und auf dem Adressieren der DNA an das Plastidengenom durch homologe Rekombination. Zusätzlich gelingt die Plastidentransformation durch Transaktivierung eines stillen plastidbürtigen Transgens durch gewebebevorzugte Expression einer vom Zellkern codierten und an Plastiden adressierten RNA-Polymerase. Solch ein System wurde bei McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7301–7305 beschrieben. Die interessierenden Nukleinsäuren, die an den Chloroplasten zu adressieren sind, können für Expression in Chloroplasten optimiert werden, um Unterschieden zwischen dem pflanzlichen Zellkern und diesem Organell bezüglich der „Codon Usage“ gerecht zu werden. So können die interessierenden Nukleinsäuren unter Verwendung von Codons mit Bevorzugung für den Chloroplasten synthetisiert werden; siehe zum Beispiel US-Patent Nr. 5,380,831, das hiermit durch Bezugnahme aufgenommen ist.

[0153] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die mut-HPPD-Nukleinsäure (a) oder die mut-HST-Nukleinsäure (b) eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: a) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder einer Variante oder einem Derivat davon; b) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder einer Variante oder einem Derivat davon; c) einem Polynukleotid, das von einem

Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 codiert wird, oder einer Variante oder einem Derivat davon; d) einem Polynukleotid, umfassend mindestens 60 aufeinanderfolgende Nukleotide gemäß einem von a) bis c); sowie e) einem Polynukleotid, das zu dem Polynukleotid gemäß einem von a) bis d) komplementär ist.

[0154] Vorzugsweise umfasst die Expressionskassette weiterhin eine Transkriptionsinitiationsregulationsregion und eine Translationsinitiationsregulationsregion, die in der Pflanze funktionell sind.

[0155] Während die erfindungsgemäßen Polynukleotide als Selektionsmarkergene für die Pflanzentransformation Verwendung finden, können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten weitere Selektionsmarkergene für die Selektion von transformierten Zellen beinhalten. Selektionsmarkergene, einschließlich diejenigen der vorliegenden Erfindung, werden für die Selektion von transformierten Zellen oder Geweben eingesetzt. Zu Markergenen zählen, jedoch ohne Einschränkung, Gene, die für Antibiotikumresistenz codieren, wie diejenigen, die für Neomycinphosphotransferase II (NEO) und Hygromycinphosphotransferase (HPT) codieren, sowie Gene, die Resistenz gegen herbizide Verbindungen, wie Glufosinat-Ammonium, Bromoxynil, Imidazolinone und 2,4-Dichlorphenoxyacetat (2,4-D) vermitteln; siehe allgemein Yarranton (1992) *Curr. Opin. Biotech.* 3: 506–511; Christophers an et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6314–6318; Yao et al. (1992) *Cell* 71: 63–72; Reznikoff (1992) *Mol. Microbiol.* 6: 2419–2422; Barkley et al. (1980) in *The Operon*, S. 177–220; Hu et al. (1987) *Cell* 48: 555–566; Brown et al. (1987) *Cell* 49: 603–612; Figge et al. (1988) *Cell* 52: 713–722; Deuschle et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5400–5404; Fuerst et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2549–2553; Deuschle et al. (1990) *Science* 248: 480–483; Gossen (1993) Doktorarbeit, Universität Heidelberg; Reines et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1917–1921; Labow et al. (1990) *Mol. Cell Biol.* 10: 3343–3356; Zambretti et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3952–3956; Bairn et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5072–5076; Wyborski et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4647–4653; Hillenand-Wissman (1989) *Topics Mol. Struct. Biol.* 10: 143–162; Degenkolb et al. (1991) *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1591–1595; Kleinschmidt et al. (1988) *Biochemistry* 27: 1094–1104; Bonin (1993) Doktorarbeit, Universität Heidelberg; Gossen et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547–5551; Oliva et al. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 913–919; Hlavka et al. (1985) *Handbook of Experimental Pharmacology*, Bd. 78 (Springer-Verlag, Berlin); Gill et al. (1988) *Nature* 334: 721–724. Diese Offenbarungen sind hiermit in den vorliegenden Text durch Bezugnahme aufgenommen. Die genannte Aufzählung von Selektionsmarkergenen soll nicht als einschränkend gelten. Es kann jedes beliebige Selektionsmarkergen in der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0156] Die Erfindung stellt weiterhin einen isolierten rekombinanten Expressionsvektor bereit, der die Expressionskassette, die eine mut-HPPD-Nukleinsäure wie oben beschrieben enthält, umfasst, wobei die Expression des Vektors in einer Wirtszelle zu einer erhöhten Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Wirtszelle führt. Im vorliegenden Zusammenhang bezieht sich der Ausdruck „Vektor“ auf ein Nukleinsäuremolekül, das dazu in der Lage ist, eine andere Nukleinsäure, mit der sie verknüpft worden ist, zu transportieren. Ein Typ von Vektor ist ein „Plasmid“, was sich auf eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife bezieht, in die zusätzliche DNA-Abschnitte ligiert werden können. Ein anderer Vektortyp ist ein Virusvektor, bei dem zusätzliche DNA-Abschnitte in das Virusgenom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren sind zur autonomen Replikation in einer Wirtszelle, in die sie eingeführt worden sind, fähig (z. B. bakterielle Vektoren mit einem bakteriellen Replikationsursprung und episomale Säugetiervektoren). Andere Vektoren (z. B. nichtepisomale Säugetiervektoren) werden, wenn sie in die Wirtszelle eingebracht werden, in das Genom einer Wirtszelle integriert und dort zusammen mit dem Genom des Wirts repliziert. Außerdem sind bestimmte Vektoren in der Lage, die Expression von Genen, mit denen sie operativ verknüpft sind, zu steuern. Solche Vektoren werden im vorliegenden Text als „Expressionsvektoren“ bezeichnet. Im Allgemeinen liegen Expressionsvektoren, die bei DNA-Rekombinationstechniken von Nutzen sind, häufig in Form von Plasmiden vor. In der vorliegenden Beschreibung können „Plasmid“ und „Vektor“ austauschbar verwendet werden, da es sich bei dem Plasmid um die am häufigsten verwendete Form eines Vektors handelt. Die Erfindung soll jedoch auch andere Formen von Expressionsvektoren, wie virale Vektoren (z. B. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoassoziierte Viren), die äquivalente Funktionen erfüllen, einschließen.

[0157] Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich für die Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere auf Grundlage der für die Expression zu verwendenden Wirtszellen selektierte Regulationssequenzen beinhalten, die operativ mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sind. Zu den Regulationssequenzen zählen diejenigen, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Arten von Wirtszellen steuern und diejenigen, die die Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen oder unter bestimmten Bedingungen steuern. Dem Fachmann wird klar sein, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren wie der Auswahl der zu trans-

formierenden Wirtszelle, dem gewünschten Polypeptidexpressionsniveau usw. abhängt. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in Wirtszellen eingebracht werden, um dadurch Polypeptide oder Peptide, einschließlich Fusionspolypeptide oder Fusionspeptide, die von im vorliegenden Text beschriebenen Nukleinsäuren codiert werden, zu produzieren (z. B. mut-HPPD-Polypeptide, Fusionspolypeptide usw.).

[0158] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die mut-HPPD-Polypeptide in Pflanzen und Pflanzenzellen, wie einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen) (siehe Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1(3): 239–251 und darin zitierte Literatur) sowie Pflanzenzellen von höheren Pflanzen (z. B. den Spermatophyten, wie Kulturpflanzen) exprimiert. Ein mut-HPPD-Polynukleotid kann in eine Pflanzenzelle auf beliebige Art und Weise, einschließlich durch Transfektion, Transformation oder Transduktion, Elektroporation, Beschuss mit der Genkanone, Agroinfektion, Biolistik und dergleichen „eingeführt“ werden.

[0159] Geeignete Verfahren für die Transformation oder Transfektion von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, finden sich in Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2., Ausg., Hrsg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Laborhandbüchern wie *Methods in Molecular Biology*, 1995, Bd. 44, *Agrobacterium protocols*, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey. Da es sich bei erhöhter Toleranz gegen Cumarinderivatherbizide um ein allgemeines Merkmal handelt, das man vielen verschiedenen Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Raps und Canola, Maniok, Pfeffer, Sonnenblume und Tagetes, Solanaceenpflanzen wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Luzerne, Strauchpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäumen (Ölpalme, Kokosnuss), mehrjährigen Gräsern und Futterkulturen, vererben will, handelt es sich bei diesen Kulturpflanzen ebenfalls um bevorzugte Zielpflanzen für die Gentechnik als weiterer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Pflanze um eine Kulturpflanze. Zu den Futterkulturen zählen, jedoch ohne Einschränkung, Quecke, Kanariengras, Trespe, Elymus, Rispengras, Knaulgras, Luzerne, Esparsette, Gemeiner Hornklee, Hybridklee, Rotklee und Wiesenklee.

[0160] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung gelingt die Transfektion eines mut-HPPD-Polynukleotids in einer Pflanze durch den Agrobacterium-vermittelten Gentransfer. Ein Transformationsverfahren, mit dem der Fachmann vertraut ist, ist das Tauchen einer blühenden Pflanze in eine Agrobacteria-Lösung, wobei Agrobacteria die mut-HPPD-Nukleinsäure enthält, wonach mit den transformierten Gameten weiter gezüchtet wird. Die Agrobacterium-vermittelte Pflanzentransformation kann zum Beispiel mit dem Agrobacterium tumefaciens-Stamm GV3101(pMP90) (Koncz und Schell, 1986, *Mol. Gen. Genet.* 204: 383–396) oder LBA4404 (Clontech) erfolgen. Die Transformation kann mittels standardmäßigen Transformations- und Regenerations-techniken erfolgen (Deblaere et al., 1994, *Nucl. Acids. Res.* 13: 4777–4788; Gelvin, Stanton B. und Schilperort, Robert A, *Plant Molecular Biology Manual*, 2. Ausg. – Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. – in Sect., Ringbuch Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4; Glick, Bernard R. und Thompson, John E., *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2). So kann zum Beispiel Raps durch Kotyledonen- oder Hypokotyltransformation transformiert werden (Moloney et al., 1989, *Plant Cell Report* 8: 238–242; De Block et al., 1989, *Plant Physiol.* 91: 694–701). Die Verwendung von Antibiotika für Agrobacterium und die Pflanzenselektion hängt von dem binären Vektor und von dem Agrobacterium-Stamm, der für die Transformation verwendet wurde, ab. Die Rapsselektion wird üblicherweise mit Canamycin als Pflanzenselektionsmarker durchgeführt. Der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer in Flachs kann zum Beispiel mit einer von Mlynarova et al., 1994, *Plant Cell Report* 13: 282–285 beschriebenen Technik erfolgen. Außerdem kann die Transformation von Sojabohnen zum Beispiel mit einer in dem europäischen Patent Nr. 0424 047, dem US-Patent Nr. 5,322,783, dem europäischen Patent Nr. 0397 687, dem US-Patent Nr. 5,376,543 oder dem US-Patent Nr. 5,169,770 beschriebenen Technik erfolgen. Die Transformation von Mais kann mittels Beschuss mit der Genkanone, mit der polyethylenglykolvermittelten DNA-Aufnahme oder über die Siliziumcarbidgefasertechnik erzielt werden (siehe zum Beispiel Freeling und Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7). Ein spezifisches Beispiel für die Maistransformation findet sich in US-Patent Nr. 5,990,387, und ein spezifisches Beispiel für die Weizentransformation in der PCT-Anmeldung Nr. WO 93/07256.

[0161] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann das eingeführte mut-HPPD-Polynukleotid stabil in der Pflanzenzelle aufrechterhalten werden, wenn es in ein nichtchromosomales autonomes Replicon eingebaut wird oder in die Pflanzenchromosomen integriert wird. Alternativ dazu kann das eingeführte mut-HPPD-Polynukleotid auf einem extrachromosomalen nichtreplizierenden Vektor vorliegen und transient exprimiert werden oder transient aktiv sein. In einer Ausführungsform kann ein homologer rekombinanter Mikroorganismus erzeugt werden, indem das mut-HPPD-Polynukleotid in ein Chromosom integriert wird, ein Vektor hergestellt werden, der zumindest einen Teil eines HPPD-Gens enthält, in das eine Deletion, Addition oder Substitution eingeführt

wurde, um dadurch das endogene HPPD-Gen zu verändern, zum Beispiel funktionell zu disruptieren, und ein mut-HPPD-Gen zu erzeugen. Um eine Punktmutation auf dem Weg der homologen Rekombination zu erzeugen, können DNA-RNA-Hybride in einer unter der Bezeichnung Chimärplastie bekannten Technik verwendet werden (Cole-Strauss et al., 1999, *Nucleic Acids Research* 27(5): 1323–1330 und Kmiec, 1999, *Gene therapy American Scientist* 87(3): 240–247). Weitere homologe Rekombinationsverfahren in Triticum-Arten sind ebenfalls auf dem Fachgebiet gut bekannt und werden für die vorliegende Verwendung in Betracht gezogen.

[0162] In den homologen Rekombinationsvektor kann das mut-HPPD-Gen an seinem 5'-Ende und seinem 3'-Ende von einem zusätzlichen Nukleinsäuremolekül des HPPD-Gens flankiert sein, um eine homologe Rekombination zwischen dem exogenen mut-HPPD-Gen, das von dem Vektor getragen wird, und einem endogenen HPPD-Gen in einem Mikroorganismus oder einer Pflanze zu gestatten. Das zusätzliche flankierende HPPD-Nukleinsäuremolekül ist ausreichend lang für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen. Typischerweise beinhaltet der Vektor mehrere hunderte Basenpaare bis zu Kilobasen flankierender DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z. B. Thomas, K. R. und Capecchi, M. R., 1987, *Cell* 51: 503 für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren, oder Strepp et al., 1998, *PNAS*, 95 (8): 4368–4373 für die cDNA-basierte Rekombination in *Physcomitrella patens*). Da sich das mut-HPPD-Gen jedoch normalerweise von dem HPPD-Gen an sehr wenigen Aminosäuren unterscheidet, ist eine flankierende Sequenz nicht immer erforderlich. Der homologe Rekombinationsvektor wird in einen Mikroorganismus oder eine Pflanzenzelle eingeführt (z. B. über polyethylenglykolvermittelte DNA), und Zellen, in denen eine homologe Rekombination zwischen dem eingeführten mut-HPPD-Gen und dem endogenen HPPD-Gen erfolgt ist, werden unter Verwendung von fachbekannten Techniken selektiert.

[0163] In einer weiteren Ausführungsform können rekombinante Mikroorganismen hergestellt werden, die ausgewählte Systeme enthalten, die die regulierte Expression des eingeführten Gens gestatten. So zum Beispiel kann man dadurch, dass ein mut-HPPD-Gen auf einem Vektor umfasst ist und so unter die Kontrolle des lac-Operon kommt, das mut-HPPD-Gen ausschließlich in Gegenwart von IPTG exprimieren. Solche Regulationssysteme sind in der Fachwelt gut bekannt.

[0164] Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingeführt worden ist. Die Begriffe „Wirtszelle“ und „rekombinante Wirtszelle“ werden im vorliegenden Text austauschbar verwendet. Es ist klar, dass sich solche Begriffe nicht nur auf das jeweilige Zellsystem beziehen sondern auch auf die Nachkommenschaft oder potentielle Nachkommenschaft von solch einer Zelle zutreffen. Da in aufeinanderfolgenden Generationen entweder aufgrund von Mutation oder aufgrund von Umwelteinflüssen gewisse Modifikationen vorkommen können, ist es möglich, dass solche Nachkommen nicht wirklich mit der Elternzelle identisch sind, sollen jedoch im vorliegenden Zusammenhang trotzdem vom Umfang des Begriffs umfasst sein. Bei einer Wirtszelle kann es sich um eine beliebige prokaryontische oder eukaryontische Zelle handeln. So kann zum Beispiel ein mut-HPPD-Polynukleotid in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Pilzzellen oder Säugetierzellen (wie Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, CHO-Zellen oder COS-Zellen), Algen, Ciliaten, Pflanzenzellen, Pilzen oder andere Mikroorganismen wie *C. glutamicum* exprimiert werden. Der Fachmann ist mit weiteren geeigneten Wirtszellen vertraut.

[0165] Mit einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, wie einer in Kultur befindlichen prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszelle, kann man ein mut-HPPD-Polynukleotid produzieren (d. h. exprimieren). Demgemäß stellt die Erfindung weiterhin Verfahren zum Produzieren von mut-HPPD-Polypeptiden unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren das Kultivieren der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der für ein mut-HPPD-Polypeptid codiert, eingeführt worden ist oder in deren Genom ein Gen, das für ein Wildtyp- oder mut-HPPD-Polypeptid codiert, eingeführt worden ist) in einem geeigneten Medium, bis mut-HPPD-Polypeptid produziert wird. In einer weiteren Ausführungsform umfasst das Verfahren weiterhin das Isolieren von mut-HPPD-Polypeptiden aus dem Medium oder aus der Wirtszelle. Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte mut-HPPD-Polypeptide und biologisch aktive Teile davon. Ein „isoliertes“ oder „gereinigtes“ Polypeptid oder ein „isolierter“ oder „gereinigter“ biologisch aktiver Teil davon ist, wenn es/er durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, frei von einem Teil des Zellmaterials oder, wenn es/er chemisch synthetisiert wird, frei von chemischen Vorstufen oder sonstigen Chemikalien. Die Phrase „im Wesentlichen frei von Zellmaterial“ beinhaltet mut-HPPD-Polypeptidpräparate, in denen das Polypeptid von einigen der Zellbestandteile der Zellen, in denen es auf natürliche oder rekombinante Weise produziert wird, getrennt vorliegt. In einer Ausführungsform beinhaltet die Phrase „im Wesentlichen frei von Zellmaterial“ Präparate eines mut-HPPD-Polypeptids mit weniger als ungefähr 30% (in Bezug auf das Trockengewicht) Nicht-mut-HPPD-Material (im vorliegenden Text auch als „kontaminierendes Polypeptid“ bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als ungefähr 20% Nicht-mut-HPPD-Material, noch stärker

bevorzugt weniger als ungefähr 10% Nicht-mut-HPPD-Material, und am meisten bevorzugt weniger als ungefähr 5% Nicht-mut-HPPD-Material.

[0166] Wird das mut-HPPD-Polypeptid oder der biologisch aktive Teil davon rekombinant produziert, so ist es/er ebenfalls vorzugsweise im Wesentlichen frei von Kulturmedium, das heißt das Kulturmedium macht weniger als ungefähr 20%, stärker bevorzugt weniger als ungefähr 10% und am meisten bevorzugt weniger als ungefähr 5% des Volumens des Polypeptidpräparats aus. Die Phrase „im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder sonstigen Chemikalien“ beinhaltet mut-HPPD-Polypeptidpräparate, in denen das Polypeptid von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien, die an der Polypeptidsynthese beteiligt sind, getrennt vorliegt. In einer Ausführungsform beinhaltet die Phrase „im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder sonstigen Chemikalien“ mut-HPPD-Polypeptidpräparate mit weniger als ungefähr 30% (in Bezug auf das Trockengewicht) chemische Vorstufen oder Nicht-mut-HPPD-Chemikalien, stärker bevorzugt weniger als ungefähr 20% chemische Vorstufen oder Nicht-mut-HPPD-Chemikalien, noch mehr bevorzugt weniger als ungefähr 10% chemische Vorstufen oder Nicht-mut-HPPD-Chemikalien und am stärksten bevorzugt weniger als ungefähr 5% chemische Vorstufen oder Nicht-mut-HPPD-Chemikalien. In bevorzugten Ausführungsformen fehlen den isolierten Polypeptiden oder biologisch aktiven Teilen davon kontaminierende Polypeptide von demselben Organismus, von dem das mut-HPPD-Polypeptid stammt. Typischerweise werden solche Polypeptide durch rekombinante Expression von z. B. einem mut-HPPD-Polypeptid in Pflanzen außer, oder in Mikroorganismen wie *C. glutamicum*, Ciliaten, Algen oder Pilzen produziert.

[0167] Wie oben beschrieben lehrt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zum Erhöhen der Cumaronderivattoleranz einer Kulturpflanze oder eines Samens im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Pflanze oder des Samens. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Cumaronderivattoleranz einer Kulturpflanze oder eines Samens so erhöht, dass die Pflanze oder der Samen einer Cumaronderivatherbizid-Aufwandmenge von vorzugsweise ungefähr 1–1000 g Al ha⁻¹, stärker bevorzugt 20–160 g Al ha⁻¹ und am stärksten bevorzugt 40–80 g Al ha⁻¹, widerstehen kann. Im vorliegenden Zusammenhang bedeutet „einer Cumaronderivatherbizid-Aufwandmenge zu widerstehen“, dass die Pflanze von solch einer Aufwandmenge entweder nicht abgetötet oder nicht geschädigt wird.

[0168] Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung Verfahren bereit, bei denen auf die Verwendung von mindestens einem Cumaronderivatherbizid wie in Tabelle 2 angegeben zurückgegriffen wird.

[0169] In diesen Verfahren kann das Cumaronderivatherbizid nach einem beliebigen fachbekannten Verfahren ausgebracht werden, darunter, jedoch nicht ausschließlich, mittels Samenbehandlung, Bodenbehandlung und Blattbehandlung. Vor der Ausbringung kann das Cumaronderivatherbizid in die üblichen Formulierungen, zum Beispiel Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Stäube, Pulver, Pasten und Granulate, überführt werden. Die Anwendungsform hängt von dem jeweiligen Verwendungszweck ab; jedenfalls sollte sie eine feine und gleichmäßige Verteilung der erfindungsgemäßen Verbindung gewährleisten.

[0170] Dadurch, dass Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen Cumaronderivatherbizid bereitgestellt werden, können verschiedenste Formulierungen für den Schutz von Pflanzen gegen Unkräuter eingesetzt werden, um das Pflanzenwachstum zu fördern und den Wettbewerb um Nahrungsmittel zu reduzieren. Ein Cumaronderivatherbizid kann als solches im Voraufschlag, im Nachaufschlag, vor dem Pflanzen und während des Pflanzens für die Bekämpfung von Unkräutern auf Flächen, die die im vorliegenden Text beschriebenen Kulturpflanzen umgeben, verwendet werden, oder es können Cumaronderivatherbizidformulierungen verwendet werden, die weitere Zusatzstoffe enthalten. Das Cumaronderivatherbizid kann auch als Samenbehandlung verwendet werden. Zu Zusatzstoffen, die in einer Cumaronderivatherbizidformulierung vorliegen, zählen weitere Herbizide, Detergenzien, Hilfsstoffe, Spreitmittel, Haftmittel, Stabilisierungsmittel und dergleichen. Bei den Cumaronderivatherbizidformulierungen kann es sich um ein Nass- oder Trockenpräparat handeln, und dieses kann, jedoch ohne Einschränkung, „Flowable“-Pulver, Emulsionskonzentrate und flüssige Konzentrate beinhalten. Das Cumaronderivatherbizid und die Cumaronderivatherbizidformulierungen können nach traditionellen Verfahren ausgebracht werden, zum Beispiel durch Spritzen, Bewässern, Bestäuben und dergleichen.

[0171] Geeignete Formulierungen sind detailliert in PCT/EP2009/063387 und PCT/EP2009/063386 beschrieben, die in den vorliegenden Text durch Bezugnahme aufgenommen sind.

[0172] Es ist auch klar, dass das Obengesagte bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betrifft, und dass zahlreiche Veränderungen vorgenommen werden können, ohne vom Erfindungsumfang abzuweichen. Die Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Beispiele erläutert, die keinesfalls so zu verstehen sind, dass sie den Erfindungsumfang einschränken. Ganz im Gegenteil ist deutlich zu machen, dass zu

verschiedenen anderen Ausführungsformen, Modifikationen und Äquivalenten davon gegriffen werden kann, die sich nach Durchlesen der vorliegenden Beschreibung dem Fachmann ergeben, ohne vom Erfindungsge-danken und/oder vom Umfang der beigelegten Ansprüche abzuweichen.

BEISPIELE

BEISPIEL 1: Klonieren von HPPD-Codiergenen

(A) Klonieren von Arabidopsis-thaliana-HPPD

[0173] Die partielle Arabidopsis thaliana AtHPPD-Codiersequenz (SEQ ID No: 1) wird mit Standard-PCR-Techniken aus Arabidopsis thaliana cDNA mit den Primern HuJ 101 und HuJ 102 amplifiziert (Tabelle 5).

Tabelle 5: PCR-Primer für die AtHPPD-Amplifikation (SEQ ID NO: 20, 21)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
HuJ101	GGCCACCAAACGCGG
HuJ102	TCATCCCCTAACTGTTTGGCTTC

[0174] Das PCR-Produkt wird nach den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-AtHPPD wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus E. coli TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für AtHPPD mit N-terminalem His₆-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

(B) Klonieren von Chlamydomonas reinhardtii HPPD1

[0175] Die C. reinhardtii-HPPD1 (CrHPPD1)-Codiersequenz (SEQ ID No: 3) wird für Expression in E. coli Codon-optimiert und als synthetisches Gen bereitgestellt (Entelechon, Regensburg, Deutschland). Das partielle synthetische Gen wird mittels Standard-PCR-Techniken mit den Primern Ta1-1 und Ta1-2 amplifiziert (Tabelle 6).

Tabelle 6: PCR-Primer für die CrHPPD1-Amplifikation (SEQ ID NOS: 22, 23)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
Ta1-1	GGCGCTGGCGGTGCGTCCACTAC
Ta1-2	TCAAACGTTCAAGGTACGCTCGTAGTCTTCGATG

[0176] Das PCR-Produkt wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-CrHPPD1 wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus E. coli TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für CrHPPD1 mit N-terminalem His₆-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

(C) Klonieren von C. reinhardtii HPPD2

[0177] Die C. reinhardtii-HPPD2 (CrHPPD2)-Codiersequenz (SEQ ID No: 5) wird für Expression in E. coli Codon-optimiert und als synthetisches Gen bereitgestellt (Entelechon, Regensburg, Deutschland). Das partielle synthetische Gen wird mittels Standard-PCR-Techniken mit den Primern Ta1-3 und Ta1-4 amplifiziert (Tabelle 7).

Tabelle 7: PCR-Primer für die CrHPPD2-Amplifikation (SEQ ID NO: 24, 25)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
Ta1-3	GGTGCGGGTGGCGCTGGCACC
Ta1-4	TCAAACGTTCAAGGTACGTTTCGTAGTCTTCGATGG

[0178] Das PCR-Produkt wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-CrHPPD2 wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für CrHPPD2 mit N-terminalem His6-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

(D) Klonieren der Glycin-max-HPPD

[0179] Die Glycin-max-HPPD (GmHPPD; Glyma14g03410)-Codiersequenz wird für Expression in *E. coli* Codon-optimiert und als synthetisches Gen bereitgestellt (Entelechon, Regensburg, Deutschland). Das partielle synthetische Gen wird mittels Standard-PCR-Techniken mit den Primern Ta2-65 und Ta2-66 amplifiziert (Tabelle 8).

Tabelle 8: PCR-Primer für die GmHPPD-Amplifikation (SEQ ID NO: 26, 27)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
Ta2-65	CCAATCCCAATGTGCAACG
Ta2-66	TTATGCGGTACGTTTAGCCTCC

[0180] Das PCR-Produkt wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-GmHPPD wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für GmHPPD mit N-terminalem His6-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

(E) Klonieren der Zea-Mais-HPPD

[0181] Die Zea-Mais-HPPD (ZmHPPD; GRMZM2G088396)-Codiersequenz wird für Expression in *E. coli* Codon-optimiert und als synthetisches Gen bereitgestellt (Entelechon, Regensburg, Deutschland). Das partielle synthetische Gen wird mittels Standard-PCR-Techniken mit den Primern Ta2-45 und Ta2-46 amplifiziert (Tabelle 9).

Tabelle 9: PCR-Primer für die ZmHPPD-Amplifikation (SEQ ID NO: 28, 29)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
Ta2-45	CCACCGACTCCGACCGCCGCAGC
Ta2-46	TCAGGAACCCTGTGCAGCTGCCGCAG

[0182] Das PCR-Produkt wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-ZmHPPD wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für ZmHPPD mit N-terminalem His6-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

(F) Klonieren der Oryza-sativa-HPPD

[0183] Die Oryza-Sativa-HPPD (OsHPPD; Os02g07160)-Codiersequenz wird für Expression in *E. coli* Codon-optimiert und als synthetisches Gen bereitgestellt (Entelechon, Regensburg, Deutschland). Das partielle synthetische Gen wird mittels Standard-PCR-Techniken mit den Primern Ta2-63 und Ta2-64 amplifiziert (Tabelle 10).

Tabelle 10: PCR-Primer für die OsHPPD-Amplifikation (SEQ ID NO: 30, 31)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
Ta2-63	CCGCCGACTCCAACCCC
Ta2-64	TTAAGAACCCTGAACGGTCGG

[0184] Das PCR-Produkt wird entsprechend den Anweisungen des Herstellers in den Vektor pEXP5-NT/TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, USA) kloniert. Das erhaltene Plasmid pEXP5-NT/TOPO®-OsHPPD wird mit einer Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* TOP10 isoliert. Die Expressionskassette, die für OsHPPD mit N-terminalem His6-Tag codiert, wird durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

BEISPIEL 2: Heterologe Expression und Aufreinigung von rekombinanten HPPD-Enzymen

[0185] Es werden rekombinante HPPD-Enzyme produziert und in *E. coli* überexprimiert. Chemisch kompetente BL21 (DE3)-Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) werden mit pEXP5-NT/TOPO® (siehe BEISPIEL 1) gemäß den Anweisungen des Herstellers transformiert.

[0186] Die transformierten Zellen werden bei 37°C in LB-Bouillon (Invitrogen, Carlsbad, USA) mit einem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Proteine werden ohne Induktion durch IPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid) exprimiert.

[0187] Bei einer OD600 (optischen Dichte bei 600 nm) von 4 bis 5 werden die Zellen durch Zentrifugieren geerntet (8000 × g). Das Zellpellet wird in Bindungspuffer (50 mM-Natriumphosphatpuffer, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,0) mit einem Zusatz von komplettem EDTA-freiem Protease-Cocktail (Roche-Diagnostics) resuspendiert und mit einer Avestin-Press homogenisiert. Das Homogenisat wird mittels Zentrifugation (20.000 × g) geklärt. HPPD mit His₆-Tag oder Mutantenvarianten werden durch Affinitätschromatographie auf einer HisTrap™HP-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Aufgereinigte HPPD oder Mutantenvarianten werden gegen 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 mit einem Zusatz von 10% Glycerin dialysiert und bei -86°C aufbewahrt. Der Proteingehalt wird nach Bradford mit dem Protein-Assay von Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bestimmt. Die Reinheit des Enzympräparats wird mittels SDS-PAGE beurteilt.

BEISPIEL 3: Assay auf HPPD-Aktivität

[0188] Die HPPD produziert Homogentisinsäure und CO₂ aus 4-Hydroxyphenylpyruvat (4-HPP) und O₂. Der Aktivitäts-Assay für die HPPD beruht auf der Analyse der Homogentisinsäure mittels Umkehrphasen-HPLC.

Verfahren (A)

[0189] Die Assay-Mischung kann 150 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 50 mM L-Ascorbinsäure, 1 µM FeSO₄ und 7 µg aufgereinigtes Enzym in einem Gesamtvolumen von 1 ml enthalten. Inhibitoren werden in DMSO (Dimethylsulfoxid) auf eine Konzentration von 20 mM bzw. 0,5 mM gelöst. Aus dieser Vorratslösung werden fünffache Reihenverdünnungen in DMSO hergestellt, die in dem Assay verwendet werden. Die jeweilige Inhibitorlösung macht 1% des Assay-Volumens aus. So reichen die Inhibitorendkonzentrationen von 200 µM bis 2,5 nM bzw. von 5 µM bis 63 pM.

[0190] Nach 30minütiger Vorinkubation wird die Reaktion durch Versetzen mit 4-HPP auf eine Endkonzentration von 0,1 mM gestartet. Die Reaktion wird 120 min lang bei Raumtemperatur fortschreiten gelassen. Die Reaktion wird durch Versetzen mit 100 µl 4,5 M Phosphorsäure gestoppt.

[0191] Die Stichprobe wird auf einer mit 63 mM Phosphorsäure äquilibrierten 3cc/60mg-Oasis® HLB-Patrone (Waters) extrahiert. Die L-Ascorbinsäure wird mit 3 ml 63 mM Phosphorsäure ausgewaschen. Das Homogenisat wird mit 1 ml einer 1:1-Mischung aus 63 mM Phosphorsäure und Methanol (w/w) eluiert.

[0192] 10 µl des Eluats werden durch Umkehrphasen-HPLC an einer Symmetry® C18-Säule (Korngröße 3,5 µm, Abmessungen 4,6 × 100 mm; Waters) mit 5 mM H₃PO₄/15% Ethanol (w/w) als Elutionsmittel analysiert.

[0193] Die Homogentisinsäure wird elektrochemisch nachgewiesen und durch Messen der Peakflächen ausgewertet (Empower-Software; Waters).

[0194] Die Aktivitäten werden dadurch normalisiert, dass man die uninhibierte Enzymaktivität gleich 100% setzt. Die IC₅₀-Werte werden mittels nichtlinearer Regression berechnet.

Verfahren (B)

[0195] Die Assay-Mischung kann 150 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 50 mM L-Ascorbinsäure, 100 μM Katalase (Sigma-Aldrich), 1 μM FeSO_4 und 0,2 Einheiten aufgereinigtes HPPD-Enzym in einem Gesamtvolumen von 505 μl enthalten. 1 Einheit wird als diejenige Enzymmenge definiert, die erforderlich ist, um pro Minute bei 20°C ein 1 nMol HGA zu produzieren.

[0196] Nach einer 30minütigen Vorinkubation wird die Reaktion durch Versetzen mit 4-HPP auf eine Endkonzentration von 0,05 mM gestartet. Die Reaktion wird 45 min lang bei Raumtemperatur fortschreiten gelassen. Die Reaktion wird durch Versetzen mit 50 μl 4,5 M Phosphorsäure gestoppt. Die Stichprobe wird mit einem PVDF-Filtrationsgerät mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert.

[0197] 5 μl der geklärten Probe werden auf einer Atlantis-T3-Säule (Korngröße 3 μm , Abmessungen 3 \times 50 mm; Waters) durch isokratische Elution mit 90% 10 mM NaH_2PO_4 pH 2,2, 10% Methanol (v/v) analysiert.

[0198] Die HGA wird elektrochemisch bei 750 mV (Modus: Gleichstrom; Polarität: positiv) nachgewiesen und quantitativ durch Integrieren der Peakflächen bestimmt (Empower-Software; Waters).

[0199] Die Inhibitoren werden in DMSO (Dimethylsulfoxid) auf eine Konzentration von 0,5 mM gelöst. Von dieser Vorratslösung werden fünffache Reihenverdünnungen in DMSO hergestellt, die in dem Assay verwendet werden. Die jeweilige Inhibitorlösung macht 1% des Assay-Volumens aus. So liegen die Inhibitorendkonzentrationen jeweils im Bereich von 5 μM bis 320 pM. Die Aktivitäten werden dadurch normalisiert, dass man die uninhibierte Enzymaktivität gleich 100% setzt. Die IC_{50} -Werte werden mittels nichtlinearer Regression berechnet.

BEISPIEL 4: In-vitro-Charakterisierung von Wildtyp-HPPD-Enzymen

[0200] Unter Verwendung von Verfahren, die in den obigen Beispielen beschrieben oder in der Fachwelt gut bekannt sind, werden aufgereinigte rekombinante Wildtyp-HPPD-Enzyme in Bezug auf ihre Kinetikeigenschaften und ihre Empfindlichkeit gegen HPPD-inhibierende Herbizide charakterisiert. Die scheinbaren Michaelis-Konstanten (K_m) und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) werden mittels nichtlinearer Regression mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) unter Verwendung eines Substratinhibitionsmodells berechnet. Die scheinbaren k_{cat} -Werte werden aus dem V_{max} -Wert berechnet, wobei eine 100%ige Reinheit des Enzympräparats angenommen wird. Die (mit dem Standardfehler) gewichteten Mittel der K_m - und IC_{50} -Werte werden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Die Dissoziationskonstanten (K_i) werden mit der Cheng-Prusoff-Gleichung für kompetitive Hemmung berechnet (Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. *Biochem Pharmacol* 1973, 22, 3099–3108). Beispiele für die erhaltenen Werte sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m) für 4-HPP, der Umsatzraten (k_{cat}), die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) und die Dissoziationskonstanten (K_i) für verschiedene HPPD-						
Enzyme	K_m [μM] (4-HPP)	k_{cat} [s^{-1}]*	k_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	K_i [nM] (Inhibitor 1)**	K_i [nM] (Inhibitor 2)**	K_i [nM] (Topramezon)
Arabidopsis-HPPD	13	12,91 (2,84)	1,00	3	13	4
Chlamydomonas-HPPD1	54	4,12 (0,64)	0,08	29	139	38
Chlamydomonas-HPPD2	26	9,84 (0,71)	0,38	8	n. b..	n. b.

* Standardfehler in Klammern
 ** bei den in diesem Beispiel verwendeten „Cumarinderivatherbiziden“ handelt es sich um 3-[2,4-Dichlor-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]-1-(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxopyrido[3,2-c]thiazin-4-ol (Inhibitor 1) und 3-(2,4-Dichlorphenyl)-1-(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxopyrido[3,2-c]thiazin-4-ol (Inhibitor 2) [siehe Formel Nr. 13 von Tabelle 2]

[0201] Aus den Beispielen oben ist ersichtlich, dass ein HPPD-Enzym als eines mit Resistenz gegen „Cumarinderivatherbizide“ ausgewählt werden kann, da gefunden wurde, dass die Dissoziationskonstanten, die die Dissoziation von „Cumarinderivatherbiziden“ von Komplexen mit diesem HPPD-Enzym regeln, höher sind als diejenigen, die die Dissoziation von „Cumarinderivatherbiziden“ von Komplexen mit anderen HPPD-Enzymen regeln. Die Beispiele oben zeigen auch, dass die ausgewählten HPPD-Enzyme, wie die Chlamydomonas HPPD1, im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung besonders nützlich sind, da ihre Dissoziationskonstanten gegenüber „Cumarinderivatherbiziden“ höher sind als diejenigen von anderen HPPD-Enzymen, wie der Arabidopsis-HPPD. Es ist klar, dass jegliches HPPD-Enzym, das gegen „Cumarinderivatherbizide“ resistent ist, auch wenn dieses Protein nicht im vorliegenden Text beispielhaft angegeben ist, Bestandteil des Erfindungsgegenstands ist. Weiterhin zeigen die Beispiele, dass ein HPPD-Enzym als topramezonresistent ausgewählt werden kann, da gefunden wurde, dass die Dissoziationskonstanten, die die Dissoziation von Topramezon von Komplexen mit diesem HPPD-Enzym regeln, höher sind als diejenigen, die die Dissoziation von „Topramezon“ von Komplexen mit anderen HPPD-Enzymen regeln.

BEISPIEL 5: Rationale Mutagenese

[0202] Mittels Strukturbiologie und Sequenz-Alignment kann man eine gewisse Anzahl Aminosäuren auswählen, von denen gefunden wurde, dass sie an der Bindung von „Cumarinderivatherbiziden“ beteiligt sind, und diese dann mutagenisieren, um zu toleranteren HPPD-Enzymen zu gelangen.

(A) Ortsgerichtete Mutagenese

[0203] Die auf PCR basierende ortsgerechte Mutagenese von pEXP5-NT/TOPO®-AtHPPD erfolgt mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Santa Clara, USA) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Für diese Technik sind zwei chemisch synthetisierte DNA-Primer („Forward“- und „Reverse“-Primer) für jede Mutation erforderlich. Die für die ortsgerechte Mutagenese von AtHPPD verwendeten Primer sind in Tabelle 12 angeführt.

Tabelle 12: PCR-Primer für die ortsgerichtete Mutagenese von AtHPPD (SEQ ID NO: 32 bis 67)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5'→ 3')	Mutation AtHPPD
HuJ141	GAGGATTCTGACTTCGCGCCTTCTCCTCC	Met335 → Ala
HuJ142	GGAGGAGAAGGCGCGAAGTCGAATCCTC	Met335 → Ala
HuJ143	GAGGATTCTGACTTCTGGCCTTCTCCTCCG	Met335 → Trp
HuJ144	CGGAGGAGAAGGCCAGAAGTCGAATCCTC	Met335 → Trp
HuJ145	GGAGGATTCTGACTTCTTTCTTCTCCTCCGC	Met335 → Phe
HuJ146	GCGGAGGAGAAGGAAAGAAGTCGAATCCTCC	Met335 → Phe
HuJ147	GTGACAGGCCGACGATAGCTATAGAGATAATCCAG	Phe392 → Ala
HuJ148	CTGGATTATCTCTATAGCTATCGTCGGCCTGTCAC	Phe392 → Ala
HuJ153	GACTTCATGCCTCCTCCTCCGCCTACTTAC	Ser337 → Pro
HuJ154	GTAAGTAGGCGGAGGAGGAGGCATGAAGTC	Ser337 → Pro
HuJ155	GATTCTGACTTCATGGCTTCTCCTCCGCCTAC	Pro336 → Ala
HuJ156	GTAGGCGGAGGAGAAGCCATGAAGTCGAATC	Pro336 → Ala
HuJ157	CAGATCAAGGAGTGTGAGGAATTAGGGATTCTTG	Glu363 → Gln
HuJ158	CAAGAATCCCTAATTCCTGACACTCCTTGATCTG	Glu363 → Gln
HuJ159	CGGAACAAAGAGGAAGAGTGAGATTCAGACGTATTTGG	Gln293 → Val
HuJ160	CCAAATACGTCTGAATCTCACTCTTCTCTTTGTTCCG	Gln293 → Val
HuJ169	CGTTGCTTCAAATCTTCCCGAAACCACTAGGTGACAGGCC	Thr382 → Pro
HuJ170	GGCCTGTACCTAGTGGTTTCGGGAAGATTTGAAGCAACG	Thr382 → Pro
HuJ171	CAAATCTTCAAAAACCACTGGGTGACAGGCCGACGAT	Leu385 → Val
HuJ172	ATCGTCGGCCTGTCACCCACTGGTTTTGTGAAGATTTG	Leu385 → Val
HuJ173	TGACAGGCCGACGATATTTCTGGAGATAATCCAGAGAGTA	Ile393 → Leu
HuJ174	TACTCTCTGGATTATCTCCAGAAATATCGTCGGCCTGTCA	Ile393 → Leu
HuJ175	GACTTCATGCCTGCGCCTCCGCCTACTTAC	Ser337 → Ala
HuJ176	GTAAGTAGGCGGAGGCGCAGGCATGAAGTC	Ser337 → Ala
HuJ177	GGCAATTTCTCTGAGTTCTTCAAGTCCATTGAAG	Leu427 → Phe
HuJ178	CTTCAATGGACTTGAAGAACTCAGAGAAATTGCC	Leu427 → Phe
HuJ185	GGAACAAAGAGGAAGAGTGTGATTCAGACGTATTTGG	Gln293 → Val
HuJ186	CCAAATACGTCTGAATCACACTCTTCTCTTTGTTCC	Gln293 → Val
Ta2-55	GAGGATTCTGACTTCAACCCTTCTCCTCC	Met335 → Asn
Ta2-56	GGAGGAGAAGGGTTGAAGTCGAATCCTC	Met335 → Asn
Ta2-57	GAGGATTCTGACTTCCAGCCTTCTCCTCC	Met335 → Gln
Ta2-58	GGAGGAGAAGGCTGGAAGTCGAATCCTC	Met335 → Gln
Ta2-59	GGAACAAAGAGGAAGAGTAACATTCAGACGTATTTGG	Gln293 → Asn
Ta2-60	CCAAATACGTCTGAATGTTACTCTTCTCTTTGTTCC	Gln293 → Asn
Ta2-61	GGAACAAAGAGGAAGAGTCACATTCAGACGTATTTGG	Gln293 → His
Ta2-62	CCAAATACGTCTGAATGTGACTCTTCTCTTTGTTCC	Gln293 → His

[0204] Plasmidmutanten werden aus E. coli TOP10 durch Durchführen einer Plasmid-Minipräparation isoliert und durch DNA-Sequenzieren verifiziert. Die Kombination von einzelnen Aminosäuresubstitutionen gelingt durch einen schrittweisen Mutageneseansatz.

(B) In-vitro-Charakterisierung von Arabidopsis-HPPD-Mutanten

[0205] Aufgereinigte HPPD-Enzymmutanten werden nach dem oben beschriebenen Verfahren erhalten. Die Dosisreaktionsmessungen sowie die Kinetikmessungen erfolgen mit dem beschriebenen HPPD-Aktivitäts-Assay. Die scheinbaren Michaelis-Konstanten (K_m) und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) werden mittels nichtlinearer Regression mit der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, USA) unter Verwendung eines Substratinhibitionsmodells berechnet. Die scheinbaren k_{cat} -Werte werden aus dem V_{max} -Wert berechnet, wobei eine 100%ige Reinheit des Enzympräparats angenommen wird. Die (mit dem Standardfehler) gewichteten Mittel der K_m - und IC_{50} -Werte werden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Die Dissoziationskonstanten (K_i) werden mit der Cheng-Prusoff-Gleichung für kompetitive Hemmung berechnet (Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. Biochem Pharmacol 1973, 22, 3099–3108). Beispiele für die erhaltenen Werte sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Bestimmung der Michaelis-Konstanten (K_m) für 4-HPP, der Umsatzraten (k_{cat}), die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) und die Dissoziationskonstanten (K_i) für Varianten des Arabidopsis-HPPD-Enzyms						
Arabidopsis-HPPD-Variante	K_m [μ M] (4-HPP)	k_{cat} [s^{-1}]*	k_{cat}/K_m [μ M $^{-1}$ s $^{-1}$]	K_i [nM] (Inhibitor 1)**	K_i [nM] (Inhibitor 2)**	K_i [nM] (Topramezon)
Wildtyp	13	12,91 (2,84)	1,00	3	13	4
Q293H	104	3,34 (1,15)	0,03	23	19	14
Q293N	56	0,81 (0,20)	0,01	41	44	36
M335N	112	7,62 (1,00)	0,07	20	n. b.	n. b.
M335Q	129	6,54 (0,70)	0,05	24	n. b.	n. b.
P336A E363Q	37	12,27 (0,84)	0,33	13	n. b.	n. b.
L385V	36	7,07 (0,86)	0,20	19	n. b.	n. b.
I393L	46	9,23 (0,72)	0,20	21	n. b.	n. b.

* Standardfehler in Klammern
 ** bei den in diesem Beispiel verwendeten „Cumarinderivatherbiziden“ handelt es sich um 3-[2,4-Dichlor-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]-1-(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxopyrido[3,2-c]thiazin-4-ol (Inhibitor 1) und 3-(2,4-Dichlorphenyl)-1-(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxo-pyrido[3,2-c]thiazin-4-ol (Inhibitor 2)

[0206] Aus den Beispielen oben ist ersichtlich, dass eine HPPD-Enzymmutante als eine mit Resistenz gegen „Cumarinderivatherbizide“ ausgewählt werden kann, da gefunden wurde, dass die Dissoziationskonstanten, die die Dissoziation von „Cumarinderivatherbiziden“ von Komplexen mit HPPD-Mutanten regeln, höher sind als diejenigen, die die Dissoziation von „Cumarinderivatherbiziden“ von Komplexen mit dem Wildtyp-HPPD-Enzym regeln. Die Beispiele oben zeigen auch, dass ausgewählte HPPD-Mutanten, wie I393L, L385V oder P336A E363Q im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung besonders nützlich sind, da ihre katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) im Vergleich zu dem Wildtypenzym um nur maximal das Fünffache verringert sind.

[0207] Weiterhin zeigen die Beispiele, dass eine HPPD-Enzymmutante als topramezonresistent ausgewählt werden kann, da gefunden wurde, dass die Dissoziationskonstanten, die die Dissoziation von Topramezon von Komplexen mit HPPD-Mutanten regeln, höher sind als diejenigen, die die Dissoziation von „Topramezon“ von Komplexen mit dem Wildtyp-HPPD-Enzym regeln.

BEISPIEL 6: Zufallsmutagenese und Screening von Algenzellen zum Identifizieren von Klonen mit Toleranz gegen „Cumaronderivatherbizide“ und Identifizieren von ursächlichen Mutationen in HPPD/HST-Genen

[0208] „Bleacher“-Herbizide mit Einwirkung auf die Plastochinon- oder Tocopherolbiosynthese können das Algenwachstum hemmen (Tabelle 14 und 15). Diese Auswirkungen können durch Zwischenprodukte der Homogentisinsäurebiosynthese teilweise aufgehoben werden (Tabelle 14). Um Mutationen, die „Cumaronderivatherbizid“-Resistenz in HPPD- oder HST-Genen vermitteln, zu erzeugen, kann man sich der chemischen Mutagenese oder der UV-Mutagenese bedienen. Insbesondere einzellige Organismen wie *Chlamydomonas reinhardtii* oder *Scenedesmus obliquus* eignen sich zum Identifizieren von dominanten Mutationen bezüglich Herbizidresistenz.

Tabelle 14: Wachstumshemmung von *C. reinhardtii* durch HPPD-inhibierende Herbizide und Einfluss von Homogentisinsäure.

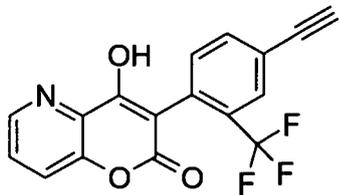
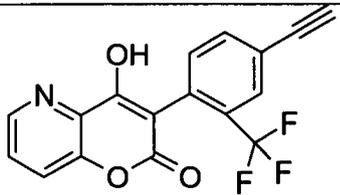
Verbindung [Nr. 1, 2 von Tabelle 2]	c [M]	Wachstumshemmung [%]	
		<i>C. reinhardtii</i> (CC-503)	
			+ Homogentisinsäure
 (3-[4-Ethynyl-2-(trifluormethyl)phenyl]-4-hydroxypyran-3-yl)pyridin-2-on)	1*10 ⁻⁴	61	43
	5*10 ⁻⁴	90	67
Topramezon	1*10 ⁻⁴	100	80
	5*10 ⁻⁴	100	100

Tabelle 15: Wachstumshemmung von *S. obliquus* durch ein „Cumaronderivatherbizid“

Verbindung [Nr 1, 2 von Tabelle 2]	c [M]	Wachstumshemmung [%]
		<i>Scenedesmus obliquus</i>
 (3-[4-Ethynyl-2-(trifluormethyl)phenyl]-4-hydroxypyran-3-yl)pyridin-2-on)	1*10 ⁻⁵	77
	1*10 ⁻⁴	100

[0209] Algenzellen der *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme CC-503 und CC-1691 (Duke University, Durham, USA) werden in TAP-Medium (Gorman und Levine (1965) PNAS 54: 1665–1669) unter ständigem Schütteln bei 100 U/min, 22°C und einer Beleuchtung von 30 $\mu\text{mol Phot}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ vermehrt. *Scenedesmus obliquus* (Universität Göttingen, Deutschland) werden in Algenmedium wie beschrieben (Böger und Sandmann, (1993) In: Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds, Lewis Publishers) unter denselben Kulturbedingungen wie für *Chlamydomonas* angegeben vermehrt. Das Screening mit den Verbindungen erfolgt bei einer Beleuchtung von 450 $\mu\text{mol Phot}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$.

[0210] Empfindliche Stämme von *Chlamydomonas reinhardtii* oder *Scenedesmus obliquus* (Tabelle 14, 15) werden 1 h wie von Loppes (1969, Mol. Gen. Genet. 104: 172–177) beschrieben mit 0,14 M Ethylmethansulfonat (EMS) mutiert. Tolerante Stämme werden durch Screening von mutagenisierten Zellen auf festen Nährlösungsplatten, die „Cumaronderivatherbizide“ oder andere HPPD-inhibierende Herbizide in Konzentrationen, die für den Wildtyp letal sind, enthalten, gescreent. Beispiele der erhaltenen Werte sind in Tabelle 16 und in [Fig. 2](#) dargestellt.

Tabelle 16: Toleranz von identifizierten *Chlamydomonas*-Stämmen gegen „Cumaronderivatherbizide“, Topramezon und Mesotrion. Es sind die IC_{50} -Werte [mol/l] der Wachstumshemmung angegeben.

Herbizid	Stamm						
	CC196 1 Wildtyp	CMr04	CMr05	CMr06	CMr10	CMr13	CMr15
„Cumaronderivatherbizid“ 1 (4-Hydroxy-3-[2-methyl-3-(5-methyl-4,5-dihydroisoxazol-3-yl)-4-methylsulfonylphenyl]pyrano[3,2-b]pyridin-2-on) [siehe Nr.: 8 von Tabelle 2]	$7,6\cdot 10^{-4}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	$9,5\cdot 10^{-4}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$
„Cumaronderivatherbizid“ 2 (3-[2,4-Dichlor-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]-1(2,2-difluorethyl)-2,2-dioxopyrido[3,2-c]thiazin-4-ol) [siehe Nr. 13 von Tabelle 2]	$6,2\cdot 10^{-4}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$	$8,1\cdot 10^{-4}$	> 1, $0\cdot 10^{-3}$
Mesotrion	$3,0\cdot 10^{-5}$	> 6, $0\cdot 10^{-4}$	> 6, $0\cdot 10^{-4}$	> $6\cdot 10^{-4}$	$4,5\cdot 10^{-4}$	> 6, $0\cdot 10^{-4}$	$5,4\cdot 10^{-4}$
Topramezon	$1,4\cdot 10^{-4}$	$3,9\cdot 10^{-4}$	$7,1\cdot 10^{-4}$	$8,6\cdot 10^{-4}$	$9,2\cdot 10^{-4}$	$2,0\cdot 10^{-4}$	$2,3\cdot 10^{-4}$

[0211] Aus den Beispielen oben ist ersichtlich, dass ein mutagenisierter *Chlamydomonas*-Stamm als einer mit Resistenz gegen „Cumaronderivatherbizide“ selektiert werden kann, da gefunden wurde, dass ein mutagenisierter Stamm, der auf Medium, das „Cumaronderivatherbizid“ enthält, selektiert worden ist, höhere IC_{50} -Werte und daher weniger Wachstumshemmung als ein Wildtypstamm aufweist. Die Beispiele zeigen weiterhin, dass ein mutagenisierter *Chlamydomonas*-Stamm als einer mit Resistenz gegen andere HPPD-inhibierende Herbizide wie Mesotrion oder Topramezon selektiert werden kann, da gefunden wurde, dass ein mutagenisierter Stamm, der auf Medium, das diese Herbizide enthält, selektiert worden ist, höhere IC_{50} -Werte und daher weniger Wachstumshemmung als ein Wildtypstamm aufweist. Die Beispiele oben zeigen auch, dass die selektierten Mutanten ein hohes Toleranzniveau oder breite Kreuzresistenz gegen alle Testverbindungen (z. B. CMr06) aufweisen.

[0212] Die Amplifikation von HPPD- und HST-Genen aus Wildtyp- und resistenten *Chlamydomonas reinhardtii* aus genomischer DNA oder copy-DNA als Matrize erfolgt durch standardmäßige PCR-Techniken mit den DNA-Oligonukleotiden gemäß Tabelle 17. Die DNA-Oligonukleotide sind von SEQ ID NO: 3, 5 und 7 abgeleitet. Die erhaltenen DNA-Moleküle werden in standardmäßige Sequenzierungsvektoren kloniert und mit standardmäßige

igen Sequenzierungstechniken sequenziert. Mutationen werden durch Vergleichen von Wildtyp- und mutierten HPPD/HST-Sequenzen mit dem Sequenz-Alignment-Algorithmus Align X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogen, Carlsbad, USA) identifiziert.

Tabelle 17: PCR-Primer für die Amplifikation von CrHPPD1, CrHPPD2 und CrHST (SEQ ID NOs: 68 bis 73)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' – 3')
Cr_HPPD1_Fw	ATGGGCGCTGGTGGCGCTTCTAC
Cr_HPPD1_Rv	CTACACATTTAGGGTGGCGCTCATAGTCC
Cr_HPPD2_Fw	ATGGGAGCGGGTGGTGCAGGCAC
Cr_HPPD2_Rv	TAAACATTTAAGGTGGCGCTCATAGTCCTC
Cr_HST_Fw	ATGGACCTTTGCAGCTCAACTGGAAG
Cr_HST_Rv	GTACGCGCTGCTGCCGTTCTGTAG

[0213] Ein Beispiel der erhaltenen Werte ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: CrHPPD2-Mutation, die in dem „Cumarinderivat“-Herbizid-toleranten Chlamydomonas-Stamm CMr15 identifiziert wurde.

Stamm	Mutation (Nukleotidaustausch)	Aminosäureaustausch
CMr15	G1252A (in SEQ ID No: 5)	A418T (in SEQ ID NO: 6)

[0214] Um orthologe HPPD- und HST-Gene aus *Scenedesmus obliquus* zu identifizieren, werden degenerierte PCR-Primer auf konservierten Regionen definiert, und zwar aufgrund von Protein-Alignments der HPPD bzw. HST (Fig. 1A bzw. B). Die „Forward“-Primer für die HPPD werden aus der Consensus-Sequenz R-K-S-Q-I-Q-T (Tabelle 19A) oder S-G-L-N-S-A/M/V-V-L-A (Tabelle 19B) erzeugt und die „Reverse“-Primer werden von der Consensus-Sequenz Q-(I/V)-F-T-K-P-(L/V) (Tabelle 19A) oder C-G-G-F-G-K-G-N-F (Tabelle 19B) abgeleitet. Die „Forward“-Primer für die HST werden aus der Consensus-Sequenz W-K-F-L-R-P-H-T-I-R-G-T erzeugt, und die „Reverse“-Primer werden von der Consensus-Sequenz F-Y-R-F/W-I-W-N-L-F-Y-A/S/V (Tabelle 19) abgeleitet. Auf Grundlage der erhaltenen HPPD/HST-Gensequenz-Tags werden Proteincodiersequenzen durch Adapter-PCR- oder Tail-PCR-Techniken wie von Liu und Whittier (1995, *Genomics* 25: 674–681) und Yuanxin et al. (2003 *Nuc Acids Research* 31: 1–7) oder Spertini et al. (1999 *Biotechniques* 27: 308–314) an copy-DNA oder genomischer DNA vervollständigt.

Tabelle 19A: PCR-Primer für die partielle Amplifikation von SoHPPD (SEQ ID NO: 74 bis 77)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' – 3')
So_Deg_HPPD_Fw	MGBAARWSYCAGATYCAGAC
So_Deg_HPPD_Rv	ASIGGYTTIGTRAAVAYCTG
So_Deg_HST_Fw	TGGMGNTTYTNGNCCNCAACNATHMG
So_Deg_HST_Rv	YTCNGCANNHRAANARRTCCADATVMANC

[0215] Wobei „I“ in So_Deg_HPPD_Rv Inosit bedeutet, jedoch auch ein beliebiges Nukleotid a, g, t, c bedeuten kann.

Tabelle 19B: PCR-Primers für partielle Amplifikation von SoHPPD (SEQ ID NOs: 78 bis 81)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' – 3')
So_Deg_HPPD_Fw2	WSNGGNYTNAAYWSNRYNGTNYTNGC
So_Deg_HPPD_Rv2	RAARTTNCCYTTNCCRAANCCNCCRC
So_Deg_HST_Fw2	TGGMGNTTYTNTMGNCNCAYACNATHMG
So_Deg_HST_Rv2	YTCNGCNNHRAANARRTCCADATVMANC

BEISPIEL 7

Screening einer mit EMS mutagenisierten *Arabidopsis thaliana*-Population zum Identifizieren von herbizidtoleranten Pflanzen und Identifizieren von ursächlichen Mutationen in HPPD/HST-Genen

[0216] Eine M2-Population von mit EMS behandelten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen wurde von Lehle Seeds (Round Rock, TX, USA) bezogen. Das Screenings erfolgten durch Ausplattieren von *Arabidopsis*-Samen auf halbkonzentrierter Murashige-Skoog-Nährlösung, die 0,5% Geliertmittel Gelrite® und, je nach der Aktivität der Verbindung, Cumaronderivatherbizid in einer Konzentration von 0,1 bis 100 µM enthielt. Die Platten werden bis zu drei Wochen lang in einer Wachstumskammer bei 22°C in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h inkubiert. Tolerante Pflanzen, die weniger stark ausgeprägte Bleichphänotypen aufweisen, werden in Erde gepflanzt und unter Gewächshausbedingungen bis zur Reife herangezogen. Im Rosettenpflanzenstadium werden Blattscheiben von cumaronderivatherbizidtoleranten Pflanzen geerntet, um genomische DNA mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) bzw. Gesamt-mRNA mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) zu isolieren. Die HPPD- oder HST-Sequenzen werden mit standardmäßigen PCR-Techniken aus genomischer DNA mit den jeweiligen Oligonukleotiden wie in Tabelle 11 beschrieben amplifiziert. Für die Amplifikation von HPPD oder HST aus mRNA wird copy-DNA mit Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) synthetisiert, und die HPPD oder HST wird mit den in Tabelle 11 angeführten DNA-Oligonukleotiden amplifiziert. Nach dem Klonieren der PCR-Produkte in ein standardmäßiges Sequenzierungsplasmid werden die DNA-Sequenzen von mutierten HPPD/HST-Genen durch standardmäßige Sequenzierungstechniken identifiziert. Die Mutationen werden durch Vergleichen der Wildtyp- und der mutierten HPPD/HST-Sequenzen mit dem Sequenz-Alignment-Algorithmus Align X (Vector NTI Advance Software Version 10.3, Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) identifiziert.

Tabelle 20: PCR-Primer für die Amplifikation von AtHPPD und AtHST (SEQ ID NO: 82 bis 85)

Primer-Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' – 3')
At_HPPD_Fw	ATGGGCCACCAAACGCCGC
At_HPPD_Rv	TCATCCCCTAACTGTTTGGCTTCAAG
At_HST_Fw	ATGGAGCTCTCGATCTCACAATC
At_HST_Rv	CTAGAGGAAGGGGAATAACAGATACTC

BEISPIEL 8

Erzeugung von Pflanzen, die heterologe HPPD- und/oder HST-Enzyme exprimieren und die gegen „Cumaronderivatherbizide“ tolerant sind.

[0217] In der Fachwelt sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von stabil transformierten Pflanzen bekannt. Cumaronderivatherbizidtolerante Sojabohnen(*Glycine max*)-Pflanzen können mit einem von Olhoff et al. (US-Patent 2009/0049567) beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Kurz umrissen werden HPPD- oder HST-Codierpolynukleotide mit standardmäßigen Klonierungstechniken, wie von Sambrook et al. (Molecular cloning (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben in einen binären Vektor kloniert. Das zum Schluss erhaltene Vektorkonstrukt enthält eine HPPD- oder HST-Codiersequenz, die von einer Promotersequenz (z. B. der Ubiquitin-Promoter(PcUbi)-Sequenz) und einer Terminatorsequenz (z. B. der Nopalinsynthaseterminator(NOS)-Sequenz) flankiert ist sowie eine Resistenzmarkergenkassette (z. B. AHAS) ([Fig. 3](#)).

Gegebenenfalls kann das HPPD- oder HST-Gen das Selektionsmittel bereitstellen. Mittels agrobakteriumvermittelter Transformation wird die DNA in Achselmeristemzellen an dem Primärknoten von Keimpflanzenexplantaten der Sojabohne eingeführt. Nach der Inokulation und Cokultivierung mit Agrobakterien werden die Explantate eine Woche lang auf Sprossinduktionsmedium ohne Selektion umgesetzt. Anschließend werden die Explantate 3 Wochen lang auf Sprossinduktionsmedium mit 1–3 μM Imazapyr (Arsenal) umgesetzt, um auf transformierte Zellen zu selektieren. Explantate mit gesunden Kallus/Sprossballen am Primärknoten werden dann auf Sprosselongationsmedium mit 1–3 μM Imazapyr umgesetzt, bis ein Längenwachstum des Sprosses eintritt oder das Explantat abstirbt. Nach der Regeneration werden die Transformanten in Erde in kleine Töpfe umgesetzt, in Wachstumskammern gestellt (16 h Tag/8 h Nacht; 25°C Tag/23°C Nacht; relative Feuchtigkeit 65%; 130–150 mE $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und anschließend mittels Taqman-Analyse auf das Vorhandensein der T-DNA getestet. Nach einigen Wochen werden gesunde transgenpositive Einzelkopie-Events in größere Töpfe umgesetzt und in der Wachstumskammer herangezogen.

[0218] Die Transformation von Maispflanzen erfolgt nach einem Verfahren wie von McElver und Singh (WO 2008/124495) beschrieben. Pflanzentransformationsvektorkonstrukte, die HPPD- oder HST-Sequenzen enthalten, werden über Agrobacterium-vermittelte Transformation in unreife Maisembryonen eingeführt. Die transformierten Zellen werden 3–4 Wochen lang in Selektionsmedien mit einem Zusatz von 0,5–1,5 μM Imazethapyr selektiert. Die transgenen Pflänzchen werden auf Pflanzenregenerationsmedien regeneriert und anschließend bewurzelt. Mit den transgenen Pflänzchen wird eine TaqMan-Analyse auf Vorhandensein des Transgens durchgeführt und anschließend werden die transgenen Pflänzchen in Topfsubstrat umgesetzt und bis zur Reife im Gewächshaus herangezogen. *Arabidopsis thaliana* wird mit den HPPD- oder HST-Sequenzen mit der „Floral Dip“-Methode wie von McElver und Singh (WO 2008/124495) beschrieben transformiert.

[0219] Die Transformation von *Oryza sativa* (Reis) erfolgt mittels Protoplastentransformation wie von Peng et al. (US 6653529) beschrieben.

[0220] Transgene T0- oder T1-Pflanzen von Sojabohne, Mais, Reis und *Arabidopsis thaliana*, die HPPD- oder HST-Sequenzen enthalten, werden in Gewächshausuntersuchungen auf verbesserte Toleranz gegen „Cumaronderivatherbizide“ getestet.

BEISPIEL 9: Gewächshausversuche

[0221] Transgene Pflanzen, die heterologe HPPD- oder HST-Enzyme exprimieren, werden in Gewächshausversuchen auf Toleranz gegen Cumaronderivatherbizide getestet. Für die Voraufbehandlung werden die Herbizide mittels fein verteilter Düsen direkt nach dem Aussäen ausgebracht. Die Behälter werden sanft beregnet, um Keimung und Wachstum zu fördern, und anschließend mit durchsichtigen Plastikhauben abgedeckt, bis die Pflanzen bewurzelt sind. Diese Abdeckung führt zu einheitlichem Keimen der Testpflanzen, falls dies nicht durch die Herbizide behindert wurde.

[0222] Für die Nachaufbehandlung werden die Testpflanzen zuerst bis zu einer Länge von 3 bis 15 cm, je nach Habitus der Pflanzen, herangezogen und erst dann mit den Herbiziden behandelt. Zu diesem Zweck werden die Testpflanzen entweder direkt in denselben Behältern ausgesät und herangezogen oder zuerst separat herangezogen und dann einige Tage vor der Behandlung in die Testbehälter umgesetzt. Für das Testen von T0-Pflanzen kann man Ableger verwenden. Bei Sojabohnenpflanzen beträgt die optimale Länge eines Sprosses für Ableger ungefähr 7,5 bis 10 cm, wobei mindestens zwei Knoten vorhanden sind. Jeder Ableger wird aus der ursprünglichen Transformante (Mutterpflanze) entnommen und in Bewurzelungshormonpulver (Indol-3-buttersäure, IBA) getaucht. Der Ableger wird dann in Oasis-Keile in einem Bio-Dom platziert. Gleichzeitig werden auch Ableger des Wildtyps entnommen, um als Kontrollen zu dienen. Die Ableger werden 5–7 Tage lang in dem Bio-Dom aufbewahrt und dann in Töpfe umgesetzt und dann zwei oder mehr Tage lang in der Wachstumskammer abgehärtet. Anschließend werden die Ableger in das Gewächshaus umgestellt, ungefähr 4 Tage lang abgehärtet und dann für die Spritzttests wie angegeben eingesetzt.

[0223] Je nach der Pflanzenart werden die Pflanzen bei 10–25°C oder bei 20–35°C gehalten. Der Testzeitraum erstreckt sich über 3 Wochen. Während dieser Zeit werden die Pflanzen gepflegt und ihre Reaktion auf die einzelnen Behandlungen wird ausgewertet. Die Herbizidschäden werden 2 und 3 Wochen nach der Behandlung ausgewertet. Die Pflanzenschäden werden anhand einer Skala von 0 bis 9 beurteilt, wobei 0 keine Schäden und 9 das vollständige Absterben bedeutet.

[0224] Beispiele für die erhaltenen Werte sind in Tabelle 21 und in [Fig. 4](#) dargestellt.

Tabelle 21: Gewächshausprüfung von transgenen Sojabohnenpflanzen (T0-Ableger). Die Schäden wurden 2 Wochen nach der Herbizidbehandlung ausgewertet.

	Transgen	keines	AtHPPD			CrHPPD1	CrHPPD2		
	Event	Wildtyp	AV3653	AV3641	AV3639	AV3646	AV3644	LG4564	LG4628
Herbizid	Dosis [g/ha]								
„Cumaron-derivatherbizid“*	50	4,5	3	2	3	3	4	3	4
	100	5,5	3	2	2	4	4	3	3
	200	6	3	3	3	4	5	4	4
Topramezon	6,25	7	2	4	4	6	6	3	5
	12,5	7	3	4	5	7	5	4	6
* 3-[2,4-Dichlor-3-(3-methyl-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)phenyl]-1-(2,2-difluorethyl-2,2-dioxopyrido[3,2-c]thiazin-4-ol									

[0225] Aus den Beispielen oben ist ersichtlich, dass ein HPPD-Codierpolynukleotid, das in Pflanzen hineintransformiert wird, als eines selektiert werden kann, das Resistenz gegen Cumaronderivatherbizide vermittelt, da gefunden wird, dass Pflanzen, die mit solch einem Polynukleotid transformiert werden, weniger stark durch Cumaronderivatherbizide geschädigt werden als die nichttransformierten Kontrollpflanzen.

[0226] Außerdem zeigen die Beispiele, dass ein HPPD-Codierpolynukleotid, das in Pflanzen hineintransformiert wird, als eines selektiert werden kann, das Resistenz gegen Topramezon vermittelt, da gefunden wird, dass Pflanzen, die mit solch einem Polynukleotid transformiert werden, weniger stark durch Topramezon geschädigt werden als die nichttransformierten Kontrollpflanzen.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

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

Zitierte Patentliteratur

- EP 418175 [0004]
- EP 470856 [0004]
- EP 487352 [0004]
- EP 527036 [0004]
- EP 560482 [0004]
- EP 682659 [0004]
- US 5424276 [0004]
- EP 496630 [0004]
- EP 496631 [0004]
- EP 625505 [0004]
- EP 625508 [0004]
- US 5506195 [0004]
- WO 2010/029311 [0005]
- WO 2009/090401 [0005]
- WO 2009/090402 [0005]
- WO 2008/071918 [0005]
- WO 2008/009908 [0005]
- EP 242236 [0006]
- EP 337899 [0006]
- EP 293356 [0006]
- WO 96/38567 [0006, 0062, 0062, 0062]
- US 2009/0172831 [0006]
- US 5366892 [0039]
- US 5747450 [0039]
- US 5737514 [0039]
- US 5723756 [0039]
- US 5593881 [0039]
- WO 02/068607 [0040]
- WO 2010/049270 [0046]
- WO 2010/049269 [0046]
- EP 09177628 [0052]
- WO 96/26202 [0057]
- WO 97/41116 [0057]
- WO 97/41117 [0057]
- WO 97/41118 [0057]
- WO 01/83459 [0057]
- WO 2008/074991 [0057]
- US 7297541 [0062]
- US 6768044 [0062]
- US 6268549 [0062]
- US 5565350 [0114, 0127]
- WO 9322443 [0114]
- EP 1198985 A1 [0118]
- WO 00/15815 [0127]
- US 5773702 [0131]
- US 5859348 [0131]
- US 5380831 [0146, 0152]
- US 5436391 [0146]
- US 5424412 [0147]
- US 5593874 [0147]
- WO 99/43838 [0150]
- US 6072050 [0150]
- US 5659026 [0150]
- US 5608149 [0150]
- US 5608144 [0150]
- US 5604121 [0150]
- US 5569597 [0150]
- US 5466785 [0150]
- US 5399680 [0150]
- US 5268463 [0150]
- US 5608142 [0150]
- US 6177611 [0150]
- EP 0424047 [0160]
- US 5322783 [0160]
- EP 0397687 [0160]
- US 5376543 [0160]
- US 5169770 [0160]
- US 5990387 [0160]
- WO 93/07256 [0160]
- EP 2009/063387 [0171]
- EP 2009/063386 [0171]
- US 2009/0049567 [0217]
- WO 2008/124495 [0218, 0218]
- US 6653529 [0219]

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- Matringe et al., 2005, Pest Manag Sci., Bd. 61: 269–276 [0002]
- Mitchell et al., 2001, Pest Manag. Sci. Bd. 57: 120–128 [0002]
- Boeger und Sandmann, 1998, Pestic. Outlook, Bd. 9: 29–35 [0002]
- Boeger und Sandmann, 1998 [0002]
- Schulz et al., 1993, FEBS Lett. Bd. 318: 162–166 [0003]
- Lee et al. 1997, Weed Sci. Bd. 45, 162–166 [0003]
- Pallett, K. E. et al. 1997 Pestic. Sci. 50 83–84 [0004]
- Padgett S. R. et al., J. Biol. Chem., 266, 33, 1991 [0006]
- Wiley, 1994 [0026]
- Geiser et al. (1986) Gene 48: 109 [0039]
- <http://www.alanwood.net/pesticides/> [0057]
- B. Hock, C. Fedtke, R. R. Schmidt, Herbicides, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1995 [0057]

- W. Krämer et al. (Hrsg.) "Modern Crop Protection Compounds", Bd. 1, Wiley VCH, 2007 [0057]
- Ruetschi et al., Eur. J. Biochem., 205, 459–466, 1992 [0062]
- Creighton (1984) Proteins. W. H. Freeman and Company (Hrsg.) [0075]
- Übersichtsartikel über Tagging-Peptide, siehe Terpe, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 523–533, 2003 [0077]
- Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857–5864 [0082]
- Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242–244 [0082]
- Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315–318 [0082]
- Sucher und Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94 [0082]
- Proceedings 2nd International Conference an Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Hrsg., S. 53–61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32: D134–D137, (2004) [0082]
- Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1) : 276–280 (2002) [0082]
- Gasteiger et al., ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, Nucleic Acids Res. 31: 3784–3788 (2003) [0082]
- Needleman und Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48: 443–453) [0083]
- Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403–10 [0083]
- Campanella et al., BMC Bioinformatics. 10. Juli 2003; 4: 29 [0083]
- Smith TF, Waterman MS (1981) J. Mol. Biol. 147(1); 195–7 [0083]
- Buchman und Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395–4405 [0116]
- Callis et al. (1987) Genes Dev 1: 1183–1200 [0116]
- The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling und Walbot, Hrsg., Springer, N. Y. (1994) [0116]
- Krens, F. A. et al., (1982) Nature 296, 72–74 [0118]
- Negrutiu I et al. (1987) Plant Mol Biol 8: 363–373 [0118]
- Shillito R. D. et al. (1985) Bio/Technol 3, 1099–1102 [0118]
- Crossway A et al., (1986) Mol. Gen Genet 202: 179–185 [0118]
- Klein TM et al., (1987) Nature 327: 70 [0118]
- Clough und Bent, Plant J. (1998) 16, 735–743 [0118]
- Planta 199: 612–617, 1996 [0118]
- Chan et al. (Plant Mol Biol 22 (3): 491–506, 1993) [0118]
- Hiei et al. (Plant J 6 (2): 271–282, 1994) [0118]
- Ishida et al. (Nat. Biotechnol 14(6): 745–50, 1996) [0118]
- Frame et al. (Plant Physiol 129(1): 13–22, 2002) [0118]
- B. Jenés et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg. S. D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128–143 [0118]
- Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205–225 [0118]
- Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711 [0118]
- Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. (1988) 16, 9877 [0118]
- F. F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsg. S. D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38 [0118]
- Feldman, KA und Marks MD (1987). Mol. Gen. Genet. 208: 274–289 [0119]
- Feldmann K (1992) [0119]
- C Koncz, N-H Chua und J Shell, Hrsg., Methods in Arabidopsis Research. World Scientific, Singapore, S. 274–289 [0119]
- Chang (1994). Plant J. 5: 551–558 [0119]
- Katavic (1994). Mol. Gen. Genet., 245: 363–370 [0119]
- Bechthold, N (1993). C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci., 316: 1194–1199 [0119]
- Clough, SJ und Bent AF (1998) The Plant J. 16, 735–743 [0119]
- Klaus et al., 2004 [Nature Biotechnology 22 (2), 225–229] [0119]
- Bock (2001) Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. J. Mol. Biol. 2001 Sep 21; 312 (3): 425–38 [0119]
- Maliga, P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 21, 20–28 [0119]
- Klaus et al., 2004, Nature Biotechnology 22 (2), 225–229 [0119]
- „Principals of Cultivar Development“ Fehr, 1993 Macmillan Publishing Company [0131]
- Guerineau et al. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141–144 [0146]
- Proudfoot (1991) Cell 64: 671–674 [0146]
- Sanfacon et al. (1991) Genes Dev. 5: 141–149 [0146]
- Mogen et al. (1990) Plant Cell 2: 1261–1272 [0146]
- Munroe et al. (1990) Gene 91: 151–158 [0146]
- Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7891–7903 [0146]

- Joshi ^ [alpha]/. (1987) Nucleic Acid Res. 15: 9627–9639 [0146]
- Campbell und Gowri (1990) Plant Physiol. 92: 1–11 [0146]
- Murray et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 477–498 [0146]
- Callis et al. Genes and Development 1: 1183–1200, 1987 [0147]
- Gallie et al. Nucleic Acid Res. 15: 8693–8711, 1987 [0147]
- Skuzeski et al. Plant Mol. Biol. 15: 65–79, 1990 [0147]
- Gallie et al. (Plant Physiol. 106: 929–939, 1994) [0147]
- Elroy-Stein et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6126–6130 [0148]
- Gallie et al. (1995) Gene 165(2): 233–238 [0148]
- Virology 154: 9–20 [0148]
- Macejak et al. (1991) Nature 353: 90–94 [0148]
- Jobling et al. (1987) Nature 325: 622–625 [0148]
- Gallie et al. (1989) in Molecular Biology of RNA, Hrsg. Cech (Liss, New York), S. 237–256 [0148]
- Lommel et al. (1991) Virology 81: 382–385 [0148]
- Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965–968 [0148]
- Odell et al. (1985) Nature 313: 810–812 [0150]
- McElroy et al. (1990) Plant Cell 2: 163–171 [0150]
- Christensen et al. (1989) Plant Mol. Biol. 12: 619–632 [0150]
- Christensen et al. (1992) Plant Mol. Biol. 18: 675–689 [0150]
- Last et al. (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 581–588 [0150]
- Velten et al. (1984) EMBO J. 3: 2723–2730 [0150]
- Yamamoto et al. (1997) Plant J. 12(2): 255–265 [0151]
- Kawamata et al. (1997) Plant Cell Physiol. 38 (7): 792–803 [0151]
- Hansen et al. (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3) : 337–343 [0151]
- Russell et al. (1997) Transgenic Res. 6(2): 157–168 [0151]
- Rinehart et al. (1996) Plant Physiol. 112(3): 1331–1341 [0151]
- Van Camp et al. (1996) Plant Physiol. 112(2): 525–535 [0151]
- Canevascini et al. (1996) Plant Physiol. 112 (2): 513–524 [0151]
- Yamamoto et al. (1994) Plant Cell Physiol. 35 (5): 773–778 [0151]
- Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181–196 [0151]
- Orozco et al. (1993) Plant Mol Biol. 23(6): 1129–1138 [0151]
- Matsuoka e/ [alpha]/. (1993) Proc Natl. Acad. Sci. USA 90(20): 9586–9590 [0151]
- Guevara-Garcia et al. (1993) Plant J. 4(3): 495–505 [0151]
- Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104–126 [0151]
- Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544–17550 [0151]
- Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965–968 [0151]
- Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414–1421 [0151]
- Shah et al. (1986) Science 233: 478–481 [0151]
- de Castro Silva Filho et al. (1996) Plant Mol. Biol. 30: 769–780 [0151]
- Schnell et al. (1991) J. Biol. Chem. 266(5): 3335–3342 [0151]
- Archer et al. (1990) J. Bioenerg. Biomemb. 22 (6): 789–810 [0151]
- Zhao et al. (1995) J. Biol. Chem. 270(11): 6081–6087 [0151]
- Lawrence et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(33) : 20357–20363 [0151]
- Schmidt et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(36): 27447–27457 [0151]
- Lampina et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 14996–14999 [0151]
- Von Heijne et al. (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9: 104–126 [0151]
- Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17544–17550 [0151]
- Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84: 965–968 [0151]
- Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1414–1421 [0151]
- Shah et al. (1986) Science 233: 478–481 [0151]
- Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8526–8530 [0152]
- Svab und Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 913–917 [0152]
- Svab und Maliga (1993) EMBO J. 12: 601–606 [0152]
- McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7301–7305 [0152]
- Yarranton (1992) Curr. Opin. Biotech. 3: 506–511 [0155]
- Christophers an et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314–6318 [0155]
- Yao et al. (1992) Cell 71: 63–72 [0155]
- Reznikoff (1992) Mol. Microbiol 6: 2419–2422 [0155]
- Barkley et al. (1980) in The Operon, S. 177–220 [0155]
- Hu et al. (1987) Cell 48: 555–566 [0155]
- Brown et al. (1987) Cell 49: 603–612 [0155]
- Figge et al. (1988) Cell 52: 713–722 [0155]

- Deuschle et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5400–5404 [0155]
- Fuerst et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2549–2553 [0155]
- Deuschle et al. (1990) Science 248: 480–483 [0155]
- Gossen (1993) Doktorarbeit, Universität Heidelberg; Reines et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1917–1921 [0155]
- Labow et al. (1990) Mol. Cell Biol 10: 3343–3356 [0155]
- Zambretti et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3952–3956 [0155]
- Bairn et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5072–5076 [0155]
- Wyborski et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4647–4653 [0155]
- Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struct. Biol. 10: 143–162 [0155]
- Degenkolb et al. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591–1595 [0155]
- Kleinschmidt et al. (1988) Biochemistry 27: 1094–1104 [0155]
- Bonin (1993) Doktorarbeit, Universität Heidelberg; Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547–5551 [0155]
- Oliva et al. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36: 913–919 [0155]
- Hlavka et al. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Bd. 78 (Springer-Verlag, Berlin) [0155]
- Gill et al. (1988) Nature 334: 721–724 [0155]
- Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1(3): 239–251 [0158]
- Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2., Ausg., Hrsg., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Laborhandbüchern wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsg.: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey [0159]
- Koncz und Schell, 1986, Mol. Gen. Genet. 204: 383–396 [0160]
- Deblaere et al., 1994, Nucl. Acids. Res. 13: 4777–4788 [0160]
- Gelvin, Stanton B. und Schilperoort, Robert A, Plant Molecular Biology Manual, 2. Ausg. – Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1995. – in Sect., Ringbuch Zentrale Signatur: BT11-P ISBN 0-7923-2731-4 [0160]
- Glick, Bernard R. und Thompson, John E., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Boca Raton: CRC Press, 1993 360 S., ISBN 0-8493-5164-2 [0160]
- Moloney et al., 1989, Plant Cell Report 8: 238–242 [0160]
- De Block et al., 1989, Plant Physiol. 91: 694–701 [0160]
- Mlynarova et al., 1994, Plant Cell Report 13: 282–285 [0160]
- Freeling und Walbot "The maize handbook" Springer Verlag: New York (1993) ISBN 3-540-97826-7 [0160]
- Cole-Strauss et al., 1999, Nucleic Acids Research 27(5): 1323–1330 [0161]
- Kmiec, 1999, Gene therapy American Scientist 87(3): 240–247 [0161]
- Thomas, K. R. und Capecchi, M. R., 1987, Cell 51: 503 [0162]
- Strepp et al., 1998, PNAS, 95(8): 4368–4373 [0162]
- Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. Biochem Pharmacol 1973, 22, 3099–3108 [0200]
- Cheng, Y. C.; Prusoff, W. H. Biochem Pharmacol 1973, 22, 3099–3108 [0205]
- Gorman und Levine (1965) PNAS 54: 1665–1669 [0209]
- Böger und Sandmann, (1993) In: Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds, Lewis Publishers [0209]
- Loppes (1969, Mol. Gen. Genet. 104: 172–177) [0210]
- Liu und Whittier (1995, Genomics 25: 674–681) [0214]
- Yuanxin et al. (2003 Nuc Acids Research 31: 1–7) [0214]
- Spertini et al. (1999 Biotechniques 27: 308–314) [0214]

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bekämpfen von unerwünschtem Pflanzenwuchs an einem Pflanzenkultivierungsort, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

a) Bereitstellen, an diesem Ort, einer Pflanze, die mindestens eine Nukleinsäure umfasst, die Folgendes umfasst:

(i) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase oder für eine mutierte Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (mut-HPPD), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, und/oder

(ii) eine Nukleotidsequenz, die für eine Wildtyp-Homogentisatsolanesyltransferase oder für eine mutierte Homogentisatsolanesyltransferase (mut-HST), die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert,

b) Ausbringen einer wirksamen Menge des Herbizids auf diesen Ort.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nukleotidsequenz von (i) die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon umfasst.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Nukleotidsequenz von (ii) die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder eine Variante oder ein Derivat davon umfasst.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Pflanze mindestens eine zusätzliche heterologe Nukleinsäure umfasst, die (iii) eine Nukleotidsequenz, die für ein Herbizidtoleranzenzym codiert, umfasst.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Cumaronderivatherbizid gemeinsam mit einem oder mehr weiteren Herbiziden, denen die HPPD und/oder HST als Angriffspunkt dient, ausgebracht wird.

6. Verfahren zum Identifizieren eines Cumaronderivatherbizids durch Verwendung einer mut-HPPD, die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 umfasst, oder einer Variante oder einem Derivat davon codiert wird, und/oder durch Verwendung einer mut-HST, die von einer Nukleinsäure, die die Nukleotidsequenz von SEQ ID NO: 7 oder 9, umfasst oder einer Variante oder einem Derivat davon codiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, umfassend die folgenden Schritte:

a) Erzeugen einer transgenen Zelle oder Pflanze, die eine Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, umfasst, wobei die mut-HPPD exprimiert wird;

b) Ausbringen eines Cumaronderivats auf die transgene Zelle oder Pflanze von a) und auf eine Kontrollzelle oder Kontrollpflanze derselben Sorte;

c) Bestimmen des Wachstums oder der Lebensfähigkeit der transgenen Zelle oder Pflanze und der Kontrollzelle oder Kontrollpflanze nach Ausbringen der Testverbindung, und

d) Selektieren von Testverbindungen, die den Kontrollzellen oder Kontrollpflanzen im Vergleich zum Wachstum der transgenen Zelle oder Pflanze ein reduziertes Wachstum verleihen.

8. Verfahren zum Identifizieren einer Nukleotidsequenz, die für eine mut-HPPD, die gegen ein Cumaronderivatherbizid resistent oder tolerant ist, codiert, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

a) Erzeugen einer Bibliothek von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren,

b) Screenen einer Population der erhaltenen mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren durch Exprimieren von jeder der Nukleinsäuren in einer Zelle oder Pflanze und Behandeln der Zelle oder Pflanze mit einem Cumaronderivat,

c) Vergleichen der von der Population von mut-HPPD-codierenden Nukleinsäuren bereitgestellten „Cumaronderivat“-Toleranzniveaus mit dem von einer HPPD-codierenden Kontrollnukleinsäure bereitgestellten „Cumaronderivat“-Toleranzniveau,

d) Selektieren von mindestens einer mut-HPPD-codierenden Nukleinsäure, die im Vergleich zu dem von der HPPD-codierenden Kontrollnukleinsäure bereitgestellten Toleranzniveau gegen ein Cumaronderivat ein signifikant erhöhtes Toleranzniveau bereitstellt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die in Schritt d) selektierte mut-HPPD-codierende Nukleinsäure mindestens zweimal so viel Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid wie diejenige, die von der Kontroll-HPPD-codierenden Nukleinsäure bereitgestellt wird, bereitstellt.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei die Resistenz oder Toleranz dadurch bestimmt wird, dass man eine transgene Pflanze erzeugt, die eine Nukleinsäuresequenz der Bibliothek von Schritt a) umfasst, und die transgene Pflanze mit einer Kontrollpflanze vergleicht.

11. Isolierte Nukleinsäure, die für eine mut-HPPD codiert, wobei die Nukleinsäure nach einem Verfahren wie in einem der Ansprüche 8 bis 10 definiert identifiziert werden kann.

12. Nukleinsäure nach Anspruch 11, wobei es sich bei der codierten mut-HPPD um eine Variante von SEQ ID NO: 2 handelt, die eines oder mehrere der folgenden Merkmale beinhaltet: die Aminosäure in Position 293 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutamin; die Aminosäure in Position 335 ist eine beliebige Aminosäure außer Methionin; die Aminosäure in Position 336 ist eine beliebige Aminosäure außer Prolin; die Aminosäure in Position 337 ist eine beliebige Aminosäure außer Serin; die Aminosäure in Position 363 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutaminsäure; die Aminosäure in Position 422 ist eine beliebige Aminosäure außer Glycin; die Aminosäure in Position 385 ist eine beliebige Aminosäure außer Leucin; die Aminosäure in Position 393 ist eine beliebige Aminosäure außer Isoleucin.

13. Transgene Pflanzenzelle, die mit einer Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäure transformiert ist, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanzenzelle zu einer im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Pflanzenzelle erhöhten Resistenz oder Toleranz gegen ein Cumaronderivatherbizid führt.

14. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 13, wobei die Wildtyp- oder mut-HPPD-Nukleinsäure eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Folgendem, umfasst: a) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon; b) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder eine Variante oder ein Derivat davon; c) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 codiert, oder eine Variante oder ein Derivat davon; d) einem Polynukleotid, umfassend mindestens 60 aufeinanderfolgende Nukleotiden von einem gemäß a) bis c); und e) einem Polynukleotid, das zu dem Polynukleotid gemäß einem von a) bis d) komplementär ist.

15. Transgene Pflanzenzelle nach Anspruch 14, wobei die Variante des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 in c) eines oder mehr der folgenden Merkmale beinhaltet: die Aminosäure in Position 293 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutamin; die Aminosäure in Position 335 ist eine beliebige Aminosäure außer Methionin; die Aminosäure in Position 336 ist eine beliebige Aminosäure außer Prolin; die Aminosäure in Position 337 ist eine beliebige Aminosäure außer Serin; die Aminosäure in Position 363 ist eine beliebige Aminosäure außer Glutaminsäure; die Aminosäure in Position 422 ist eine beliebige Aminosäure außer Glycin; die Aminosäure in Position 385 ist eine beliebige Aminosäure außer Leucin; die Aminosäure in Position 393 ist eine beliebige Aminosäure außer Isoleucin.

16. Transgene Pflanze, umfassend eine Pflanzenzelle wie in einem der Ansprüche 13 bis 15 definiert, wobei die Expression der Nukleinsäure in der Pflanze zu der erhöhten Resistenz der Pflanze gegen ein Cumaronderivatherbizid im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Pflanze führt.

17. Pflanze, die eine mutagenisierte oder rekombinante mut-HPPD, umfassend SEQ ID NO: 2, exprimiert, in der sich die Aminosäuresequenz von einer Aminosäuresequenz der HPPD einer entsprechenden Wildtyppflanze an einer oder mehr Aminosäurepositionen unterscheidet, wobei es sich bei der Aminosäure in Position 293 um eine andere Aminosäure als Glutamin handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 335 um eine andere Aminosäure als Methionin handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 336 um eine andere Aminosäure als Prolin handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 337 um eine andere Aminosäure als Serin handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 363 um eine andere Aminosäure als Glutaminsäure handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 422 um eine andere Aminosäure als Glycin handelt; es sich bei der Aminosäure in Position 385 um eine andere Aminosäure als Leucin handelt; und/oder es sich bei der Aminosäureposition 393 um eine andere Aminosäure als Isoleucin handelt, und wobei die HPPD, wenn sie in der Pflanze exprimiert wird, der Pflanze im Vergleich zu der entsprechenden Wildtypvarietät der Pflanze eine erhöhte Herbizidtoleranz verleiht.

18. Samen, erzeugt von einer transgenen Pflanze, die eine Pflanzenzelle wie in einem der Ansprüche 13 bis 15 definiert umfasst, oder von der Pflanze nach Anspruch 16 oder 17, wobei der Samen im Vergleich zu einer Wildtypvarietät des Samens für eine erhöhte Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid reinerbig ist.

19. Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanzenzelle mit einer im Vergleich zu einer Wildtypvarietät der Pflanzenzelle erhöhten Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid, bei dem man die Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, transformiert.

20. Verfahren zum Herstellen einer transgenen Pflanze, das Folgendes umfasst: (a) Transformieren einer Pflanzenzelle mit einer Expressionskassette, die eine mut-HPPD-Nukleinsäure umfasst, und (b) Erzeugen einer Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen ein Cumaronderivatherbizid aus der Pflanzenzelle.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, wobei die mut-HPPD-Nukleinsäure eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Folgendem, umfasst: a) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon; b) einem Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 7 oder 9 oder eine Variante oder ein Derivat davon; c) einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 oder 10 codiert, oder eine Variante oder ein Derivat davon; d) einem Polynukleotid, umfassend mindestens 60 aufeinanderfolgende Nukleotiden von einem gemäß a) bis c); und e) einem Polynukleotid, das zu dem Polynukleotid gemäß einem von a) bis d) komplementär ist.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei die Expressionskassette weiterhin eine Transkriptionsinitiationsregulationsregion und eine Translationsinitiationsregulationsregion, die in der Pflanze funktionell sind, umfasst.

23. Verfahren zum Identifizieren oder Selektieren einer transformierten Pflanzenzelle, eines transformierten Pflanzengewebes, einer transformierten Pflanze oder eines Teils davon, das Folgendes umfasst: i) Bereitstellen einer transformierten Pflanzenzelle, eines transformierten Pflanzengewebes, einer transformierten Pflanze oder eines Teils davon, wobei die transformierte Pflanzenzelle, das transformierte Pflanzengewebe, die transformierte Pflanze oder der Teil davon ein Polynukleotid gemäß SEQ ID NO: 1, 3 oder 5 oder eine Variante oder ein Derivat davon umfasst, wobei das Polynukleotid für ein mut-HPPD-Polypeptid codiert, das als Selektionsmarker verwendet wird, und wobei die transformierte Pflanzenzelle, das transformierte Pflanzengewebe, die transformierte Pflanze oder der Teil davon ein weiteres isoliertes Polynukleotid umfassen kann; ii) Inkontaktbringen der transformierten Pflanzenzelle, des transformierten Pflanzengewebes, der transformierten Pflanze oder des Teils davon mit mindestens einer Cumaronderivatverbindung; iii) Bestimmen, ob die Pflanzenzelle, das Pflanzengewebe, die Pflanze oder der Teil davon von der inhibierenden Verbindung beeinflusst wird; und iv) Identifizieren oder Selektieren der transformierten Pflanzenzelle, des transformierten Pflanzengewebes, der transformierten Pflanze oder des Teils davon.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Figur 1A:

```

                *           20           *           40           *           60
Cr_HPPD1 : -----MGAGGASTTVANGGIKLVGHKNEVRYNPOS DREAIKRFHSFEFWCADAT : 49
Cr_HPPD2 : -----MGAGGAGTGDREGGIKLVGYKNEVVRONELSDKETVHKFHHIDFWCGDAT : 49
Pp_HPPD1 : -----MGLDKSESEGSVVGPLHLVGCERFVRNNEKT DREGVEREHHVEFEWCGDAS : 50
Osj_HPPD1 : MPPTPTPTATTGAVSAAAAAGENAGFRLVGHRRFVRANPRS DREQALAFHHVELWCADAA : 60
TA_HPPD1 : MPPTPTTPAATGAGAAAAVTPEHARP--R---RMVRFNPRS DREHTLSFHHVEFEWCADAA : 55
Zm_HPPD1* : MPPTPT-AAAAGAAVAASAAEQAAFRLVGHRRFVRNPRS DREHTLAFHHVELWCADAA : 59
Zm_HPPD1** : MPPTPT-AAAAGAAVAASAAEQAAFRLVGHRRFVRNPRS DREHTLAFHHVELWCADAA : 59
At_HPPD : --MGHQNAAVSENQNHDDGAASSPGFKLVGFSKFEVRKNPKSDKEKVKRFHHIEFWCGDAT : 58
Gm_HPPD : -----MCNEIQAAQAQAQAPGFKLVGFKNEVRTNPKSDREOVNRFHHIEFWCTDAT : 51
Vv_HPPD : -----MGKQNTTTNNPAPGFKLVGFSNFLRTPMSDREGVKRFHHIEFWSTDAT : 49
                lvg f6R NP 3D4F FHH e Wc DA

                *           80           *           100           *           120
Cr_HPPD1 : NTKRFESYGLGMPVAKSDQSTNNQLEASYVLRNSNDLVEFTTAPYSR----KCASVSEGV : 105
Cr_HPPD2 : NTSKRFESYGLGMPVAKSDQSTNNQLEASYVLRNSNDLVEFTTAPYSR----KCASVSEGV : 105
Pp_HPPD1 : NTWRRFESWGLGMHLVAKSDQTTGNQTYCSYAIQSNELVEFTTAPYSR----TIDQNTKMK : 106
Osj_HPPD1 : SAAGRFAPALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRASVAFLFTAPYGGDH-GVGADAATTA : 119
TA_HPPD1 : SAAGRFAPALGAPLAARSDLSTGNSVHASQLLRSGNLAEFTTAPYAN-----GCDAATA : 109
Zm_HPPD1* : SAAGRFAPALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRSGSLSEFTTAPYAH-----GADAATA : 113
Zm_HPPD1** : SAAGRFAPALGAPLAARSDLSTGNSAHASLLLRSGSLSEFTTAPYAH-----GADAATA : 113
At_HPPD : NVARRFESWGLGMRFSAKSDLSTGNMVHASVYLLTSGDLREFTTAPYSPSLSAGEIKPTTA : 118
Gm_HPPD : NASRRFESWGLGMPVAKSDLSTGNQIHASYLLRSGDLSEFTTAPYSPSLSAGSS-AASSA : 110
Vv_HPPD : NLARRFESWGLGMPVAKSDLSTGNVIHASVYLRSGDLSEFTTAPYSPSIAGDLENAATA : 109
                Rfs5gLG p A4SD 3TgN as rS 6 F F3APY

                *           140           *           160           *           180
Cr_HPPD1 : PLRHYNIDHAYEFINSHGLAVRAVGLLVDDAKTAYEVSVAHGAKGVLPPEVELRDEASGTS : 165
Cr_HPPD2 : PLRHYNIDHAYEFINSHGLAVRAVGLLVDDAKTAYEVSVAHGAKGVLPPEVELRDEASGTS : 165
Pp_HPPD1 : PHPGYKSDARSFTDSHGLAVRAVGLLVDDADEAFRISVEHGAVSVLEBHVLSDDAKGGK : 166
Osj_HPPD1 : SIPSFSPGAARRFAADHGLAVRAVALRVADAADAFRASVAAGARPAFQPADLGGGF--- : 176
TA_HPPD1 : SIPSFSADAARRFSADHGLAVRSTALRVADAADAFRASVDGGARPAFSEVDLGRGF--- : 166
Zm_HPPD1* : ALPSFSAAAARRFAADHGLAVRAVALRVADAADAFRASVAAGARPAFQPEVDLGRGFR--- : 170
Zm_HPPD1** : ALPSFSAAAARRFAADHGLAVRAVALRVADAADAFRASVAAGARPAFQPEVDLGRGFR--- : 170
At_HPPD : SIPSFDHGSCRSEFSSHGLGVRVAATEVEDAESAFSISVANGATPSSPEIVLNEAVT--- : 175
Gm_HPPD : SIPSFDAATCLAFAAKHGFGVRATALEVADAEEAFAASVAKGAEPASPEVLVDDRTG--- : 167
Vv_HPPD : SIPSFDHSACHAFAAASHGLGVRATALEVDDAEAGAFHTSVAHGARPMSPPEVTMGGSVV--- : 166
                p 5 F HGl Vra6 6 V DA A5 SvA GA P 6

                *           200           *           220           *           240
Cr_HPPD1 : QVISEVIVYGDVVFYVVSQSFEGP-----FMAGYTPVTDSPVAVSIGLQVRVDH : 212
Cr_HPPD2 : QVISEVILLYGEVVLRYVVSQSFQGP-----FLAGYTPVTDSPVAVSIFGLQVRVDH : 212
Pp_HPPD1 : MVMAEVKLYGDVVLRYVSE-QGYKG-----SMLPNYEEVES----LPLSYGLVRLDH : 213
Osj_HPPD1 : --LAEVELYGDVVLRFVSHPDGAD-----APFLPGFEGVS---NPGAVDYGLRFRDH : 223
TA_HPPD1 : --FAEVELYGDVVLRFVSHPDGAD-----VPFLPGFEGVS---NPDVAVDYGLRFRDH : 213
Zm_HPPD1* : --LAEVELYGDVVLRYVSYPDGAAG-----EPFLPGFEGVA---SPGAADYGLSFRDH : 218
Zm_HPPD1** : --LAEVELYGDVVLRYVSYPDGAAG-----EPFLPGFEGVA---SPGAADYGLSFRDH : 218
At_HPPD : --IAEVKLYGDVVLRYVSYKAEDTE-----KSEFLPGFERVEDASSFP-LDYGTRRLDH : 226
Gm_HPPD : --FAEVRLYGDVVLRYVSYKDAAPQPHADPSRWFLPGFEAAAASSSFPPELDYGTRRLDH : 225
Vv_HPPD : --ISEVHLYGDAVLRVVSQYKPNPN-ATSDPSWFLPGFEAVDEGSSFP-VDFGLRVRDH : 222
                EV 6YGdvV1R5VS f6pg5e v G6 R DH
    
```

Figur 1B:

```

                *           260           *           280           *           300
Cr_HPPD1 : AVGNTHDLIKAVEYITGFCGFHEFSEFVAEDVGTVDSEGLNSMVLANNEETILMPVNEETF : 272
Cr_HPPD2 : AVGNTHDLIKAVEYITGFTGFHEFSEFVAEDVGTVDSEGLNSMVLASNNEAVLLPVNEETF : 272
Pp_HPPD1 : AVGNVHNLAEAVNYIAKFTGFHEFAEFTAGDVGTTESEGLNSMVASNNEMVLLPINEETF : 273
Osj_HPPD1 : VVGNVPELAPVAAYISGFTGFHEFAEFTAEVDVGTAESEGLNSVVLANNAETVLLPLNEEVH : 283
TA_HPPD1 : VVGNVPELAPAAAYVAGFAGFHEFAEFTTEDVGTAESEGLNSMVLANNSEGVLLPLNEEVH : 273
Zm_HPPD1* : IVGNVPELAPAAAYFAGFTGFHEFAEFTTEDVGTAESEGLNSMVLANNSENVLLPLNEEVH : 278
Zm_HPPD1** : IVGNVPELAPAAAYFAGFTGFHEFAEFTTEDVGTAESEGLNSMVLANNSENVLLPLNEEVH : 278
At_HPPD : AVGNVPELGPALTYVAGFTGFHQFAEFTADDVGTAESEGLNSAVLASNDEMVLPLINEEVH : 286
Gm_HPPD : AVGNVPELAPAVRYLKGFSGFHEFAEFTAEVDVGTSESEGLNSVVLANNSETVLLPLNEEVY : 285
Vv_HPPD : TVGNVPKLAPVVTYLLKQETGFHEFAEFTAEVDVGTSESEGLNSVVLASNEMVLLPLNEEVF : 282
          VGNv L a Y gF GFH2FaEft eDVGT eSGLNS V6A N E 6L6P6NEP
    
```

```

                *           320           *           340           *           360
Cr_HPPD1 : GTPRKSQIQTYLEQNEGPGLOHLALLSNDIEFTTLREMRARSELGGFEEMPRANAKYKDM : 332
Cr_HPPD2 : GTPRKSQIQTYLEQNEGPGLOHLALLSNDIEFTTLREMRARSELGGFEEMPRANAKYKDM : 332
Pp_HPPD1 : GTKRKSQIQTYLEHNEGPGLOHLALICDNIFSTLREMRTRTHIGGFDFMPKPPPTYKML : 333
Osj_HPPD1 : GTKRRSQIQTYLDHGGGPGVQHIALASDDVLTGLREMRARSAMGGFEFLAPPPPNYDGV : 343
TA_HPPD1 : GTKRRSQIQTFLEHGGSGVQHIAVASDDVLRLLREMRARSAMGGFDLPPRCRKYEGV : 333
Zm_HPPD1* : GTKRRSQIQTFLDHGGGPGVQHIALASDDVLRLLREMQARSAMGGFEEMAPPTSDDYDGV : 338
Zm_HPPD1** : GTKRRSQIQTFLDHGGGPGVQHIALASDDVLRLLREMQARSAMGGFEEMAPPTSDDYDGV : 338
At_HPPD : GTKRKSQIQTYLEHNEGAGLOHLALMSDIEFRTLREMRKRSITGGFDMPSPPPTYQML : 346
Gm_HPPD : GTKRKSQIETYLEHNEGAGVQHLALVTHDIEFTTLREMRKRSFLGGFEEMSPPPTYYANL : 345
Vv_HPPD : GTKRKSQIQTYLEHNEGPGVQHIALMSDDIEFRTLREMRRRSIVGGFDMPSPPPTYYRNV : 342
          GTr4Sqi2T5L h G G6QH6A6 16 TLREMr R3 6GGF F6 YY 6
    
```

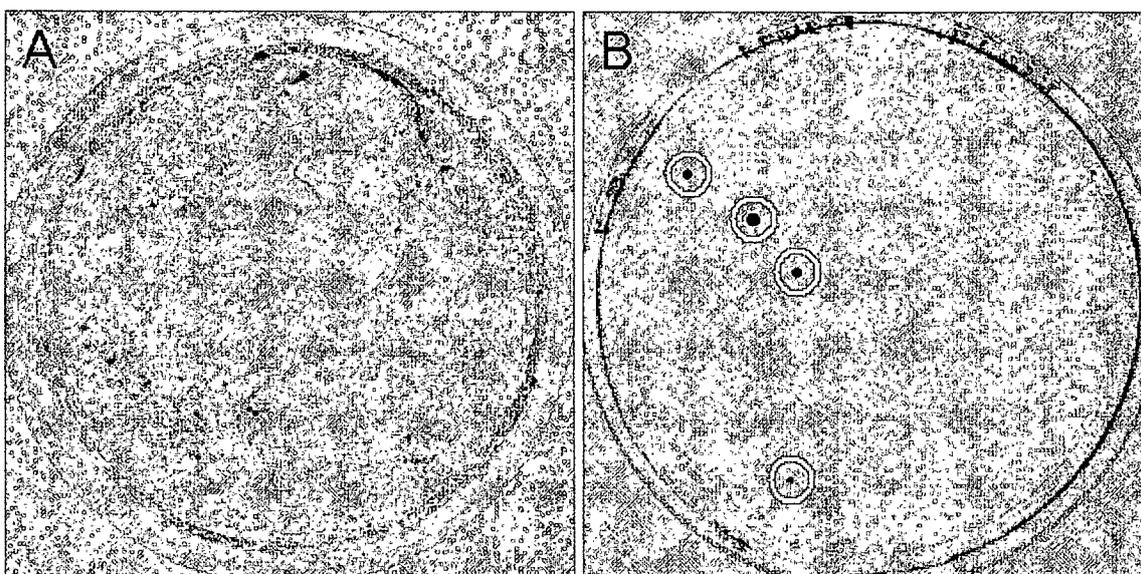
```

                *           380           *           400           *           420
Cr_HPPD1 : YARIGDSLTPQOYREVEELGILVDKDDQGVLLQIFTKPLGDRPTVFIEIIQRVGCMEVK : 392
Cr_HPPD2 : YARIGDSLTPQOYREVEELGILVDKDDQGVLLQIFTKPLGDRPTVFIEIIQRVGCMEVK : 392
Pp_HPPD1 : ANRVGDILTAEQIKCEDELGILVDKDDQGVLLQIFTKPVGDRPTVFIEIIQRIGCMKDE : 393
Osj_HPPD1 : RRRAGDVLSEEQINECQELGVLVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEMIQRIGCMKDE : 403
TA_HPPD1 : RRIAGDVLSEAQIKCEQELGVLVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEMIQRIGCMKDE : 393
Zm_HPPD1* : RRRAGDVLTEAQIKCEQELGVLVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEIIQRIGCMKDE : 398
Zm_HPPD1** : RRRAGDVLTEAQIKCEQELGVLVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFLEIIQRIGCMERDE : 398
At_HPPD : KKRVDVLSDDQIKCEELGILVDRDDQGVLLQIFTKPLGDRPTVFIEIIQRVGCMMKDE : 406
Gm_HPPD : HNRAADVLTVDQIKCEELGILVDRDDQGVLLQIFTKPVGDRPTFFIXIIQRIGCMVEDE : 405
Vv_HPPD : KKRAGDVLTDQIKCEELGILVDKDDQGVLLQIFTKPLGDRPTFFIEIIQRIGCMVKDD : 402
          r gD L3 Qi 2c ELG6LVD4DDQG LLQIFtKP6GDRP3 F6e6IQR6GCM d
    
```

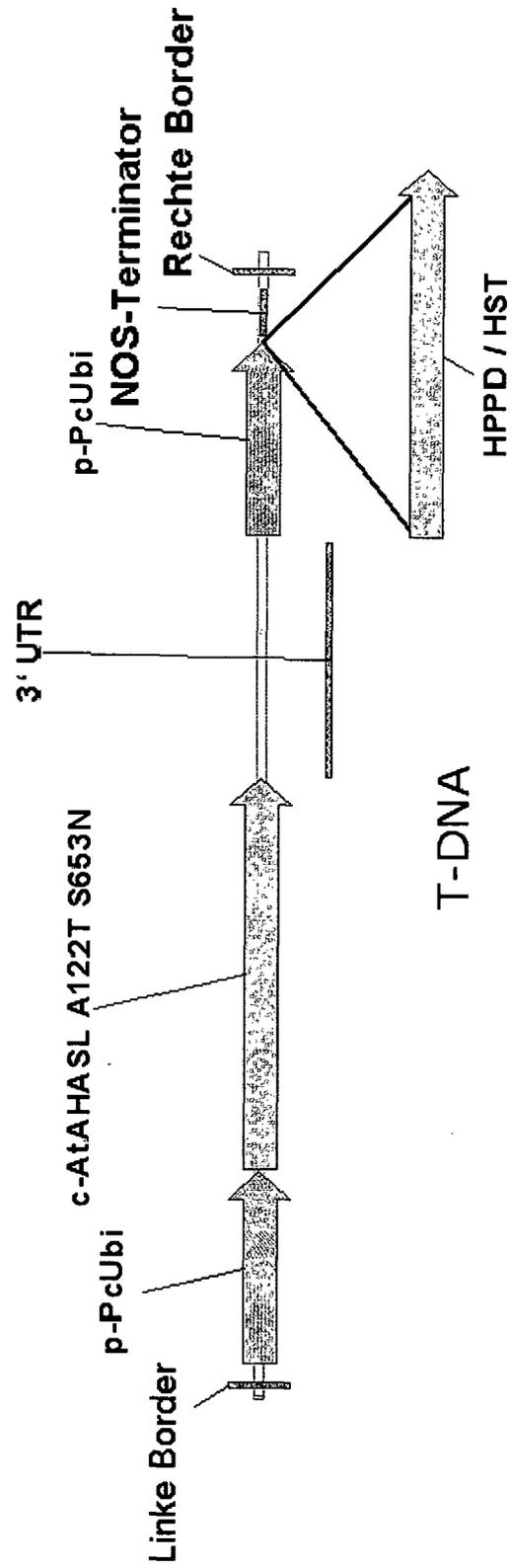
```

                *           440           *           460           *
Cr_HPPD1 : EPATGAVVGTEQAAGCGGFGKGNFSELFKSIEDYERTLNV----- : 432
Cr_HPPD2 : EPATGAVVGTEQAAGCGGFGKGNFSELFKSIEDYERTLNV----- : 432
Pp_HPPD1 : S-----TGATVQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYKTLTGTLKVH----- : 433
Osj_HPPD1 : -----SGQEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYKSLQAKPTVQGS--- : 446
TA_HPPD1 : -----RGEYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYKSLQAKQSAVQGS--- : 436
Zm_HPPD1* : -----KGQYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYKSLQAKQAAAAAAQGS : 444
Zm_HPPD1** : -----KGQYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEDYKSLQAKQAAAAATAQGS : 444
At_HPPD : -----EGKAYQSGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYKTLQAKQLVG----- : 445
Gm_HPPD : -----EGKVYQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYKTLQAKRTA----- : 443
Vv_HPPD : -----EGKVSQKGGCGGFGKGNFSELFKSIEEYKTLGAKRIVDPAPV--- : 445
          g Q ggCGGFGKGNFs LFKSIE YE43L
    
```

Figur 2:



Figur 3:



Figur 4:

