

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102906252 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 30

(21) 申请号 201080064637. 7

代理人 史文静 黄革生

(22) 申请日 2010. 12. 22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

09015984. 9 2009. 12. 23 EP

10190655. 0 2010. 11. 10 EP

61/290, 573 2009. 12. 29 US

61/412, 093 2010. 11. 10 US

C12N 9/02 (2006. 01)

C12N 15/82 (2006. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

A01H 5/10 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/070561 2010. 12. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/076877 EN 2011. 06. 30

(71) 申请人 拜尔知识产权有限公司

地址 德国蒙海姆

(72) 发明人 F·波雷 B·拉博尔

N·克尼特尔-奥特勒本 G·朗格

A·舒尔茨 R·海因

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书 2 页 说明书 61 页

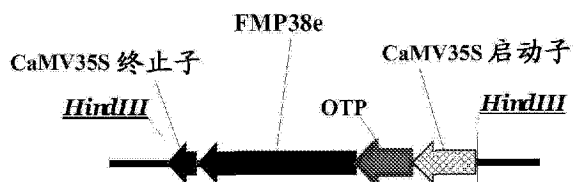
序列表 26 页 附图 2 页

(54) 发明名称

对 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物

(57) 摘要

本发明涉及编码从属于亚科聚球藻亚科的细菌获得的编码羟苯基丙酮酸双加氧酶 (EC 1. 13. 11. 27, 本文中缩写为 HPPD) 的核酸序列以及由其编码的蛋白, 还涉及包含此类核酸序列的嵌合基因, 还涉及此类核酸序列、蛋白或嵌合基因用于获得对 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物的用途。



T-DNA::FMP38e

插入烟草植物中的T-DNA的图谱

1. 包含与可在植物中表达的启动子有效连接的编码序列的嵌合基因,其特征在于,所述编码序列包含编码聚球藻亚科羟苯基丙酮酸双加氧酶(HPPD)蛋白质或与聚球藻亚科HPPD蛋白质具有至少75%序列同一性的蛋白质的核酸序列。

2. 根据权利要求1的嵌合基因,其特征在于,HPPD蛋白质是聚球藻属物种HPPD蛋白质或与聚球藻属物种HPPD蛋白质具有至少75%序列同一性的蛋白质。

3. 权利要求1或2的嵌合基因,其中编码所述蛋白质的DNA可通过使用至少20个核苷酸的引物或探针从聚球藻属DNA获得,所述引物或探针与SEQ ID No. 1的DNA杂交。

4. 根据权利要求1至3中任意一项所述的嵌合基因,其特征在于,其编码包含SEQ ID No. 4从第2位氨基酸至第350位氨基酸的氨基酸序列的HPPD蛋白质,或者与SEQ ID No. 4从第2位氨基酸至第350位氨基酸的氨基酸序列具有至少75%序列同一性的蛋白质。

5. 根据权利要求1至4中任意一项所述的嵌合基因,其特征在于,其编码HPPD蛋白质序列,并且包含SEQ ID No. 3从第400位核苷酸至第1446位核苷酸的核苷酸序列,或者是在严格杂交条件下与此类序列杂交的DNA。

6. 根据权利要求1至5中任意一项所述的嵌合基因,其特征在于,其在HPPD编码序列的下游包含编码在植物中具有活性的转运肽的核酸序列,使得转运肽/HPPD融合蛋白被所述嵌合基因编码。

7. 包含根据权利要求1至6中任意一项所述的至少一种嵌合基因的载体。

8. 植物细胞、植物部分、植物或种子,其特征在于其包含根据权利要求1至7中任意一项所述的嵌合基因。

9. 权利要求8的植物细胞、植物部分、植物或种子,其还包含编码PDH酶的嵌合基因。

10. 权利要求8或9的植物细胞、植物部分、植物或种子,其还包含赋予对生长调控因子,优选对2,4-D或麦草畏,和/或对抑制乙酰乳酸合酶(ALS)、EPSP合酶(EPSPS)和/或谷氨酰胺合酶(GS)的除草剂的耐受性的一种或多种嵌合基因。

11. 获得对HPPD抑制剂型除草剂耐受的植物的方法,其特征在于,将根据权利要求1至6之一的嵌合基因引入所述植物。

12. 用于在区域或田间控制杂草的方法,所述区域或田间含有根据权利要求8、9或10的植物或种子,或者待栽种权利要求8、9或10的植物或种子,所述方法包括向所述区域或田间应用对所述杂草来说是毒性的并且不显著影响根据权利要求8、9或10的种子或植物的剂量的HPPD抑制剂型除草剂,。

13. 根据权利要求12的用于控制杂草的方法,其特征在于,所述HPPD抑制剂选自异噁氟草、环磺酮、甲基磺草酮、磺草酮、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃苯基)丙-1,3-二酮和2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂苯基)丙-1,3-二酮、bicyclopyrone、双环磺草酮、庄无忌、二酮腈和苜草唑。

14. 用于获得油或膳食的方法,所述方法包括种植根据权利要求8、9或10的植物,任选地,用HPPD抑制剂型除草剂处理此类植物,收获种粒,以及碾磨种粒,以制造膳食,以及任选地,提取油。

15. 聚球藻亚科HPPD或者与聚球藻亚科HPPD具有至少75%序列同一性的HPPD用于使得植物对HPPD抑制剂型除草剂耐受的用途。

16. 权利要求15的用途,其中所述HPPD抑制剂型除草剂选自异噁氟草、环磺酮、甲基

磺草酮、磺草酮、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃苯基)丙-1,3-二酮和2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂苯基)丙-1,3-二酮、bicyclopyrone、双环磺草酮、庄无忌、二酮腈和茆草啞。

对 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物

[0001] 引言

[0002] 本发明涉及编码从属于亚科聚球藻亚科 (Synechococcoideae) 的细菌获得的羟苯基丙酮酸双加氧酶 (EC 1.13.11.27, 本文中缩写为 HPPD) 的核酸序列, 以及由其编码的蛋白质, 还涉及包含此类核酸序列的嵌合基因, 还涉及此类核酸序列、蛋白质或嵌合基因用于获得对 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物的用途。

[0003] 发明背景

[0004] HPPD 是催化酪氨酸降解产物对羟苯基丙酮酸 (本文中缩写为 HPP) 转化为尿黑酸 (本文中缩写为 HG) 的反应的酶, 尿黑酸是植物中生育酚和质体醌的前体 (Crouch N.P. 等人 (1997) *Tetrahedron*, 53, 20, 6993-7010, Fritze 等人, (2004), *Plant Physiology* 134: 1388-1400)。生育酚作为膜连结的抗氧化剂发挥作用。质体醌首先作为 PSII 和细胞色素 b6/f 复合体之间的电子载体发挥作用, 其次, 其是八氢番茄红素不饱和酶 (参与类胡萝卜素的生物合成) 的氧化还原辅因子。

[0005] 迄今为止, NCBI 数据库中存在的超过 700 条来自多种生物的核酸序列被注释为编码具有 HPPD 结构域的推定蛋白质, 包括 UniProtKB/TrEMBL 数据库中给出的 Q2JX04 或 Q2JPN8 检录号下以及 NCBI 蛋白质数据库中分别给出的 YP_473959 和 YP_476507 检录号下公开的序列。但对那些中的大多数 (包括对应于检录号 Q2JX04/YP_473959 或 Q2JPN8/YP476507 的序列) 而言, 尚未在体外检验或植物内手段中证明源自此类序列的蛋白质具有 HPPD 酶促活性, 也没有证明此类 HPPD 蛋白在植物中表达时可赋予针对 HPPD 抑制剂型除草剂的除草剂耐受性。在本领域范畴内已经描述了若干 HPPD 蛋白及其一级序列, 特别是细菌 (例如假单胞菌属 (Rüetschi 等人, *Eur. J. Biochem.*, 205, 459-466, 1992, WO 96/38567)、植物 (例如拟南芥属 (WO 96/38567, Genbank AF047834)、胡萝卜 (WO 96/38567, Genbank 87257)、燕麦 (*Avena sativa*) (WO 02/046387)、小麦 (WO 02/046387)、宽叶臂形草 (*Brachiaria platyphylla*) (WO 02/046387)、蒺藜草 (*Cenchrus echinatus*) (WO 02/046387)、硬直黑麦草 (*Lolium rigidum*) (WO 02/046387)、芨叶羊茅 (*Festuca arundinacea*) (WO 02/046387)、狗尾草 (*Setaria faberi*) (WO 02/046387)、牛筋草 (*Eleusine indica*) (WO 02/046387)、高粱属 (*Sorghum*) (WO 02/046387)、球孢子菌属 (*Coccicoides*) (Genbank COITRP)、日本黄连 (*Coptis japonica*) (WO 06/132270)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) (ES 2275365)) 或哺乳动物 (例如小鼠或猪) 的 HPPD 蛋白。指出的参考文献中公开的相应序列通过引用并入本文。

[0006] 大多数植物通过 *arrogenate* 合成酪氨酸 (Abou-Zeid 等人 (1995), *Applied Env Microb* 41:1298-1302; Bonner 等人, (1995), *Plant Cells Physiol.* 36, 1013-1022; Byng 等人, (1981), *Phytochemistry* 6:1289-1292; Connely and Conn (1986), *Z. Naturforsch* 41c:69-78; Gaines 等人, (1982), *Plants* 156:233-240)。在这些植物中, HPP 仅源于酪氨酸的降解。另一方面, 在例如酿酒酵母的酵母或大肠杆菌的细菌等的生物中, HPP 是酪氨酸前体, 并且通过预苯酸脱氢酶 (prephenate dehydrogenase, 下文中称为 PDH) 的作用 (将预苯酸转化为 HPP) 来合成 (Lingens 等人, (1967) *European J. Biochem* 1:363-374;

Sampathkumar and Morrisson(1982), Bioch Biophys Acta 701:204-211)。在这些生物中,HPP 的生产因此直接与芳香族氨基酸生物合成途径(莽草酸途径)相关联,而不与酪氨酸降解途径相关联。

[0007] 对 HPPD 的抑制导致光合作用的解偶联,缺乏辅助捕光色素(accessory light-harvesting pigments),以及最重要地,由于缺少正常情况下由类胡萝卜素提供的光保护导致的 UV 照射和活性氧类别对叶绿体的破坏(褪色)(Norris 等人(1995), Plant Cell 7:2139-2149)。光合活性组织的褪色导致生长抑制和植物死亡。

[0008] 已证明,抑制 HPPD 并且与该酶特异性结合以抑制 HPP 向尿黑酸的转化的一些分子是非常有效的选择性除草剂。

[0009] 目前,大多数可商业获得的 HPPD 抑制剂型除草剂属于这四个化学家族之一:

[0010] 1) 三酮类,例如,磺草酮[即 2-[2-氯-4-(甲基磺酰基)苯甲酰基]-1,3-环己二酮],甲基磺草酮[即 2-[4-(甲基磺酰基)-2-硝基苯甲酰基]-1,3-环己二酮];环磺酮(tembotrione)[即 2-[2-氯-4-(甲基磺酰基)-3-[(2,2,2-三-氟乙氧基)甲基]苯甲酰基]-1,3-环己二酮];庄无忌(tefuryltrione)[即 2-[2-氯-4-(甲基磺酰基)-3-[[[(四氢-2-咪唑基)甲氧基]甲基]苯甲酰基]-1,3-环己二酮]];bicyclopyrone[即 4-羟基-3-[[2-[(2-甲氧基乙氧基)甲基]-6-(三氟甲基)-3-吡啶基]羰基]二环[3.2.1]辛-3-烯-2-酮];双环磺草酮(Benzobicyclon)[即 3-(2-氯-4-甲磺酰基苯甲酰基)-2-苯基硫代二环[3.2.1]辛-2-烯-4-酮]

[0011] 2) 二酮腈类,例如 2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲基磺酰基-4-三氟甲基苯基)-丙-1,3-二酮和 2-氰基-1-[4-(甲基磺酰基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙-1,3-二酮;

[0012] 3) 异噁唑类,例如异噁氟草[即(5-环丙基-4-异噁唑基)[2-(甲基磺酰基)-4-(三氟甲基)苯基]甲酮]。在植物中,异噁氟草被快速代谢为 DKN(展示出 HPPD 抑制剂性质的二酮腈类化合物);和

[0013] 4) pyrazolate,例如苯吡唑草酮(topramezone)[即[3-(4,5-二氢-3-异噁唑基)-2-甲基-4-(甲基磺酰基)苯基](5-羟基-1-甲基-1H-吡唑-4-基)甲酮]和 pyrasulfotole[(5-羟基-1,3-二甲基吡唑-4-基(2-甲磺酰基-4-三氟甲基苯基(trifluaromethylphenyl))甲酮];pyrazofen[2-[4-(2,4-二氯苯甲酰基)-1,3-二甲基吡唑-5-基氧]苯乙酮]。

[0014] 这些抑制 HPPD 的除草剂可在展现出代谢耐受性的作物植物(例如玉米(Zea mays),它们在其中被迅速降解)中使用以抵挡草(grass)和/或阔叶杂草(Schulz 等人,(1993).FEBS letters,318,162-166;Mitchell 等人,(2001)Pest Management Science, Vol 57,120-128;Garcia 等人,(2000)Biochem.,39,7501-7507;Pallett 等人,(2001)Pest Management Science,Vol 57,133-142)。为拓展这些抑制 HPPD 的除草剂的范围,进行了若干努力,以向植物(特别是没有代谢耐受性或代谢耐受性运作欠佳的植物)赋予在农艺学田间条件下可接受的耐受性水平。

[0015] 除了分流 HPPD 介导的尿黑酸生产(US 6,812,010)的尝试之外,还已过表达敏感型(sensitive)酶,以在植物中以相对除草剂来说足够的量生产靶标酶(W096/38567)。HPPD 的过表达导致对异噁氟草(IFT)的二酮腈类衍生物(DKN)的更好的出苗前

(pre-emergence) 耐受性,但是就针对出苗后处理的耐受性而言,耐受性是不足的 (Matringe 等人, (2005), *Pest Management Science* 61:269-276)。

[0016] 第三种策略是突变 HPPD,以获得下述靶标酶,其保留有其催化 HPP 转化为尿黑酸的性质,同时对 HPPD 抑制剂不如突变前的天然 HPPD 敏感。

[0017] 该策略已成功应用于生产对 2- 氰基 -3- 环丙基 -1-(2- 甲基磺酰基 -4- 三氟甲基苯基) - 丙 -1,3- 二酮和 2- 氰基 -1-[4-(甲基磺酰基)-2- 三氟甲基苯基]-3-(1- 甲基环丙基) 丙 -1,3- 二酮 (属于二酮腈类家族的两种抑制 HPPD 的除草剂 (WO 99/24585)) 耐受的植物 (EP496630)。Pro215Leu、Gly336Glu、Gly336Ile 和更特别地 Gly336Trp (突变的氨基酸的位置是参照假单胞菌属 HPPD 示出的) 被鉴定为负责于针对用这些二酮腈类除草剂进行的出苗前处理的增加的耐受性的突变,并且它们不造成酶活性的变化。

[0018] 更近来地,将假单胞菌属 HPPD 基因引入烟草和大豆的质体基因组已显示出比核转化更为有效,其甚至赋予了针对异噁氟草的出苗后应用的耐受性 (DuFourmantel 等人, 2007, *Plant Biotechnol J.* 5(1):118-33)。

[0019] 在 WO 04/024928 中,发明人已寻求通过增加 HPP 前体进入这些植物的细胞的通量来增加异戊二烯基醌 (prenylquinone) 在植物细胞中的生物合成 (例如质体醌、生物酚的合成)。这已经通过 PDH 酶的过表达将所述前体的合成与“莽草酸”途径关联进行了。他们还提到,用编码 PDH 酶的基因转化植物使得增加所述植物对 HPPD 抑制剂的耐受性成为可能。

[0020] 在专利申请 WO 2009/144079 中,公开了编码在荧光假单胞菌的 HPPD 蛋白的第 336 位突变的羟苯基丙酮酸双加氧酶 (HPPD) 的核酸序列及其用于获得对 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物的用途。

[0021] 在 WO 2002/046387 中,已经鉴定:来自植物的 HPPD 蛋白的若干结构域与赋予对多种 HPPD 抑制剂型除草剂的耐受性相关,但是既没有显示植物内数据也没有显示生物化学数据来验证所描述的结构域功能的影响。

[0022] 在 WO 2008/150473 中,示例了两种不同的耐受性机制——经修饰的编码突变体 HPPD 酶的燕麦基因和 CYP450 玉蜀黍单加氧酶 (nsf1 基因) 的组合,以获得改进的针对 HPPD 抑制剂型除草剂的耐受性,但是没有公开证实基于两种蛋白质的组合的协同效果的数据。

[0023] 尽管开发显示出针对上文所述的若干 HPPD 抑制剂型除草剂耐受的植物获得了成功,但仍需要开发和 / 或改进植物对较新的或对若干不同的 HPPD 抑制剂的耐受性,特别是对属于三酮类 (例如磺草酮、甲基磺草酮、环磺酮、双环磺草酮和 bicyclopyrone) 和 pyrazolate (例如,苯吡唑草酮和 pyrasulfotole) 的类别的 HPPD 抑制剂的耐受性。

[0024] 发明描述

[0025] 本发明因此涉及转基因植物的生产,所述转基因植物含有编码可从或从属于聚球藻亚科的生物获得的 HPPD 蛋白质的基因及其变体或突变体,更尤其涉及来自属于聚球藻属 (*Synechococcus*) 的生物的编码展示出能催化对羟苯基丙酮酸到尿黑酸的转化的性质的 HPPD 酶的基因,以及其变体或突变体,并且所述植物较之含此类 HPPD 编码转基因的植物而言对 HPPD 抑制剂更不敏感。

[0026] 更具体地,本发明因此涉及对下述转基因植物的生产,所述转基因植物含有可从或从属于聚球藻亚科的生物 (尤其是聚球藻属 (*Synechococcus*),更尤其是从聚球藻属物

种,甚至更尤其从如 (i) JA-3-3Ab ;Cyanobacteria bacterium Yellowstone A-Prime 或 (ii) JA-2-3B' a(2-13), Cyanobacteria bacterium Yellowstone B-Prime 给出的任何菌株获得的) 获得的、编码展示出能催化对羟苯基丙酮酸到尿黑酸的转化的性质的 HPPD 酶的基因,其变体或突变体,并且所述植物较之不含任何此类 HPPD 转基因的植物而言对 HPPD 抑制剂更不敏感。来自聚球藻亚科的编码 HPPD 蛋白质的基因被选为优秀的 HPPD 抑制剂耐受的候选者,这是因为它们较之敏感的拟南芥属 HPPD 蛋白质(被用作为对 HPPD 抑制剂敏感的参照分子)而言在与 HPPD 抑制剂耐受性相关的位置上的氨基酸组成上具有高分歧性,这是在 HPPD 蛋白质中以实验和结构方式测定的。

[0027] 在一种实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6 或 7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质。

[0028] 在另一种实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6 或 7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质,并且其中 SEQ ID No. 4 的第 145 位至第 350 位的任何氨基酸可改为任何天然存在的氨基酸,优选地,其可以是任何保守取代。

[0029] 在另一实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6 或 7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质,并且其在括号给出的其编号(相对于 SEQ ID No. 4 的编号)所定义的位置上具有下述氨基酸中的一个或多个,即,His(143)、Ser(183)、Asn(198)、Gln(220)、His(221)、Tyr(250)、Gln(299)、Phe(312)、Glu(314)、Gly(326) 和 Asn(329)。

[0030] 在另一实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6 或 7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质,并且在表 (i) 的第二列给出的各位置上,原来出现的氨基酸可被表 (i) 第三列中列出的氨基酸中的任何取代。

[0031] 表 (i) :

[0032]

在SEQ ID NO: 4 中的氨 基酸	在SEQ ID NO: 4 中的位置	取代
Val	145	Thr, Cys, Ala, Gly Phe, Tyr, Ile, Val, Ala, Gln, Glu, Asp, Gly, Thr, Ser, Met,
Leu	169	Arg, Lys Ala, Trp, Ile, Leu, Ser, Arg, Lys, His, Asp, Glu, Pro, Gly,
Tyr	170	Asn
Tyr	172	Phe, Val, Ile, Ala, Leu, Trp, Met, Gln, His
Leu	181	Met, Val
Val	184	Ala, Leu, Met, Ile, Lys, Arg, Gln, Tyr
Val	186	Leu, Met, Ile, Ala
Gly	187	Ala, Ser, Thr, Val, Arg, Lys, Glu, Leu, Ile, Met, His
Ala	332	Glu, Gln, Ser, Val, Phe, Thr
Leu	333	Arg

[0033] 在另一实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6、7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质,并且在表 (ii) 的第二列给出的各位置上,原来出现的氨基酸可被表 (ii) 第三列中列出的氨基酸中的任何取代。

[0034] 表 (ii) :

[0035]

在SEQ ID NO: 4 中的氨 基酸	在SEQ ID NO: 4 中的位置	取代
Arg	171	Val, Ile
Val	185	Ala, Thr
Ala	196	Pro, Val, Thr, Asn, Ile,
Leu	244	Met, Ile, Asn
Leu	281	Met
Glu	327	Any except Pro
Ala	328	Gly, Pro, Val, Thr, Met

[0036] 在另一实施方式中,本发明涉及本文中命名为“本发明的 HPPD 蛋白质”或“聚球藻属 HPPD 蛋白质”的 HPPD 蛋白质,其是与 SEQ ID No. 4 在 2 至 350 位氨基酸上的氨基酸序列(特别是与 SEQ ID Nos. 4、5、6、7 中任一氨基酸序列,优选 SEQ ID No. 6)具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 的氨基酸序列同一性的 HPPD 蛋白质,并且在表 (iii) 的第二列给出的各位置上,原来出现的氨基酸可被表 (iii) 第三列中列出的氨基酸中的任何取代。

[0037] 表 (iii)

[0038]

在SEQ ID NO: 4 中的氨 基酸	在SEQ ID NO: 4 中的位置	取代
Arg	171	Glu, Thr, Ser, Tyr
Val	185	Ala
Ala	196	Pro, Val, Thr
Leu	244	Met
Leu	281	Met
Glu	327	Ile, Ala, Val, Leu, Lys
Ala	328	Gly

[0039] 这包括具有较之 SEQ ID No. 4 在第 2 位氨基酸至第 350 位氨基酸的序列具有取代、缺失或添加的氨基酸的蛋白质,例如转运肽融合蛋白,或者在 SEQ ID No. 4 的序列中具有氨基酸改变的蛋白质,所述蛋白质保留了 HPPD 蛋白的酶活性,并且当在植物中表达时仍赋予 HPPD 耐受性,优选是与 SEQ ID No. 4 的蛋白质所赋予的范围相当的 HPPD 耐受性。这包括源于 SEQ ID No. 4 的蛋白质的变体或突变体蛋白,例如 SEQ ID NOs :5、6 或 7 的蛋白质中的任何,特别是较之宿主植物内源 HPPD 而言对异噁唑类、二酮腈类、三酮类或 pyrazolate 的类别的 HPPD 抑制剂型除草剂较不敏感的突变体或变体,优选是下述突变体或变体,当向表达其的宿主植物应用异噁唑类、二酮腈类、三酮类和 / 或 pyrazolate 的类别的 HPPD 抑制剂型除草剂(特别是甲基磺草酮、环磺酮、异噁氟草或 bicyclopyrone 中的任何一种)时,更特别是当出苗后应用时,其向所述宿主植物赋予农艺学相关的除草剂耐受性。这还包括包含 SEQ ID NO :4 的序列的活性部分的蛋白质,当在植物中表达时所述部分赋予 HPPD 抑制剂耐受性。这包括与 SEQ ID NO :4 的序列具有基本相同的氨基酸序列的蛋白质,例如具有 SEQ ID NO. 4 至 7 中任一氨基酸序列的蛋白质。这包括下文定义的经分离的蛋白质,以及还有下述蛋白质,例如 SEQ ID NO :4 的蛋白质,其中某些氨基酸已经被下文定义的相似氨基酸替代,优选地,被保守氨基酸取代。本文还包括下述 HPPD 蛋白作为本发明的 HPPD 蛋白,所述蛋白质包含 SEQ ID No. 4 的从 2 至 350 位的氨基酸序列,但是其中 1-20、1-15、1-10 或 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 个氨基酸已被缺失,或者已被其它氨基酸取代,特别是保留了 HPPD 酶促活性并且当在宿主植物中表达时赋予针对 HPPD 抑制剂型除草剂的耐受性的此类蛋白质。本文包括与下文描述的本发明的 DNA 序列同源的 DNA 序列编码的 HPPD 蛋白,或与 SEQ ID NO :1 的 DNA 的至少一部分(至少 20-30 个核苷酸)杂交的 DNA 序列编码的 HPPD 蛋白或能使用基于 SEQ ID NO :1 的引物获得的 DNA 序列编码的 HPPD 蛋白,或与 SEQ ID No :4 具有至少 75% 序列同一性的 HPPD 蛋白,所述蛋白质由在微生物(例如细菌,例如亚科聚球藻属的微生物)的基因组中发现的 DNA 序列编码。本文包括下述聚球藻属 HPPD 蛋白作为本发明的 HPPD 蛋白,所述蛋白质当在植物中表达时向此类植物赋予除草剂耐受性,其中此类耐受性是针对 HPPD 抑制剂(例如甲基磺草酮、环磺酮、异噁氟草或 bicyclopyrone)的,特别地,此类 HPPD 蛋白是聚球藻属物种 HPPD 蛋白,例如包含 SEQ ID NO :4 的从 2 至 350 位氨基酸的序列的蛋白质。这包括如下文详述的突变体或变体 HPPD 蛋白。

[0040] 本发明包括并提供了能与下述基本经纯化的蛋白质特异性结合的抗体,所述蛋白

质包含选自 SEQ ID NOs :4、5、6 或 7 构成的组的氨基酸序列,或其根据上表 (i)、(ii) 或 (iii) 中的一种或多种中公开的氨基酸替代衍生的序列。

[0041] 本发明的另一方面涉及与本发明的蛋白质或肽分子中的一种或多种以及它们的同源物、融合体或片段特异性结合的抗体、单链抗原结合分子或其它蛋白质。在一种特别优选的实施方式中,抗体与具有 SEQ ID NOs :4-7 中示出的氨基酸序列的蛋白质或其片段或其根据上表 (i)、(ii) 或 (iii) 中的一种或多种中公开的氨基酸替代衍生的序列特异性结合。

[0042] 在另一实施方式中,抗体与包含选自 SEQ ID NOs :4-7 中示出的氨基酸序列或其片段或其根据上表 (i)、(ii) 或 (iii) 中的一种或多种中公开的氨基酸替代衍生的序列的氨基酸序列的融合蛋白特异性结合。

[0043] 在另一实施方式中,抗体与包含选自 SEQ ID NOs :4-7 中示出的氨基酸序列或其片段、或其根据上表 (i)、(ii) 或 (iii) 中的一种或多种中公开的氨基酸替代衍生的序列的氨基酸序列的融合蛋白特异性结合。

[0044] 本发明的抗体可用于定量或定性检测本发明的蛋白质或肽分子,或用于检测蛋白质的翻译后修饰。在本文中使用时,如果抗体或肽与本发明的蛋白质或肽分子的结合不被存在的无关分子竞争性抑制,则说该抗体或肽与本发明的蛋白质或肽分子“特异性结合”。

[0045] 在另一实施方式中,本发明涉及在本文中被命名为“本发明的 HPPD 核酸 /DNA”的 HPPD 核酸或 DNA,其是编码上文定义的本发明的 HPPD 的核酸或 DNA。这包括下述 DNA,所述 DNA 包含选自 SEQ ID No. 1 从第 4 位核苷酸至第 1050 位核苷酸的序列、SEQ ID No. 2 从第 25 位核苷酸至第 1071 位核苷酸的序列或 SEQ ID No. 3 从第 400 位核苷酸至第 1446 位核苷酸的序列构成的组的核苷酸序列,或者所述 DNA 包含编码 HPPD 的 DNA 区域,或者这包括下述 DNA,所述 DNA 与另一 DNA 足够互补,使得:当在 60 至 65°C 之间的温度在含有 0.1% SDS 的 5xSSC(1xSSC(单-强度柠檬酸钠)表示 = 0.15M NaCl、0.015M 柠檬酸三钠、50mM 磷酸钠 pH 7.6) 中孵育之后接着在相同温度下用含有 0.1% SDS 的 5xSSC 洗涤时,其仍与选自由 SEQ ID Nos. 1、2 和 3 构成的组的序列杂交。当测试序列和本发明序列是双链时,构成测试序列的核酸优选具有相对选自由 SEQ ID Nos. 1、2 和 3 构成的组的序列的 T_M 而言 10°C 之内的 T_M 。当测试序列和选自由 SEQ ID Nos. 1、2 和 3 构成的组的序列被混合到一起并被同时变性时,序列的 T_M 值优选在互相的 5°C 之内。更优选地,杂交在下文定义的相对严格的杂交条件下进行。

[0046] 在一种实施方式中,变性的测试或本发明序列优选首先与支持物结合,并在 60 至 65°C 之间的温度下在含有 0.1% SDS 的 5xSSC 中进行指定时间的杂交,之后在相同的温度下但用 0.1xSSC 来洗涤支持物。当杂交涉及选自由 SEQ ID Nos. 1、2 和 3 构成的组的序列时,杂交条件可较不严格,这将是技术人员显而易见的。

[0047] 本文还包括编码本发明 HPPD 蛋白质的下述 DNA 序列作为本发明的 HPPD DNA,所述 DNA 序列已被改造以适于在微生物或植物中表达,这例如通过用宿主细胞中更优选的密码子替代天然密码子来进行,或者其中为了易于克隆已添加或删除了某些限制性位点,或是具有一定数量的添加、替代或缺失的核苷酸的 DNA 序列。这还包括经分离的 DNA 序列和变体、突变体或合成 DNA 或核酸,如下文所进一步描述的。

[0048] 在一种特殊的实施方式中,本发明的聚球藻属 HPPD DNA 在允许外源基因在植物中表达的启动子的控制下表达于植物中。在另一特别的实施方式中,在由此表达的 HPPD 酶的

N-末端定位有信号肽,例如转运肽,优选是质体转运肽,例如大约120个氨基酸(大约30至大约120个氨基酸)的叶绿体转运肽,更优选是双转运肽,例如下述经优化的转运肽,其第一个部分来自向日葵(*Helianthus annuus*),第二个部分来自玉米(美国专利5,188,642中描述的),或者植物核酮糖二羧化酶/加氧酶小亚基(RuBisCO_{ssu})的质体转运肽,如果合适的话,包括成熟RuBisCO_{ssu}的N-末端部分的数个氨基酸(EP 189 707)。

[0049] 在另一特别的实施方式中,本发明包括编码本发明HPPD蛋白的DNA,其源于SEQ ID No. 1或可从SEQ ID No. 1获得,并且已针对在大肠杆菌中的表达对其进行了优化,例如经密码子优化的DNA,例如包含SEQ ID No. 2从第25位核苷酸至第1071位核苷酸的序列的DNA(包括作为边界的位置)。

[0050] 在另一特别的实施方式中,本发明包括编码本发明HPPD蛋白质的DNA,其源于SEQ ID No. 1,并且已针对在植物中的表达对其进行了优化,例如经密码子优化的DNA,例如包含SEQ ID No. 3从第400位核苷酸至第1446位核苷酸的序列的DNA(包括作为边界的位置)。

[0051] 在另一特别的实施方式中,本发明的HPPD,例如包含SEQ ID No. 4从第2位氨基酸至第350位氨基酸的氨基酸序列的HPPD,或包含SEQ ID Nos. 4至7中任一氨基酸序列的HPPD,较之宿主植物内源HPPD而言对异噁唑类、二酮腈类、三酮类或pyrazolate的类别的HPPD抑制剂型除草剂或选自异噁氟草、环磺酮、甲基磺草酮、磺草酮、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃苯基)丙-1,3-二酮和2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4,2,3-Cl₂苯基)丙-1,3-二酮、bicyclopyrone、双环磺草酮、庄无忌和苄草唑(pyrazoxyfen)的HPPD抑制剂型除草剂较不敏感。

[0052] 在另一特别的实施方式中,本发明包括编码本发明HPPD蛋白的DNA,其来自SEQ ID NO:1并且已针对在大肠杆菌中的表达被优化,例如经密码子优化的DNA,例如包含SEQ ID No. 2从第25位核苷酸至第1071位核苷酸的序列的DNA(包括作为边界的位置),所述DNA编码较之宿主植物内源HPPD对异噁唑类、二酮腈类、三酮类或pyrazolate的类别的至少一种HPPD抑制剂型除草剂(优选对环磺酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌、异噁氟草、二酮腈类、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、磺草酮、吡唑特(pyrazolate)和吡草酮(benzofenap))较不敏感的HPPD。

[0053] 在另一特别的实施方式中,本发明包括编码本发明HPPD蛋白的DNA,其已针对在植物中的表达被优化,例如经密码子优化的DNA,例如包含SEQ ID No. 3从第400位核苷酸至第1446位核苷酸的序列的DNA(包括作为边界的位置),所述DNA编码较之宿主植物内源HPPD对异噁唑类、二酮腈类、三酮类或pyrazolate的类别的至少一种HPPD抑制剂型除草剂(优选对环磺酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌、异噁氟草、二酮腈类、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、磺草酮、吡唑特和吡草酮)较不敏感的HPPD。

[0054] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及包含编码本发明的HPPD蛋白的DNA的植物,这些植物的植物部分、植物细胞和后代,所述DNA已针对在大肠杆菌中的表达被优化或已针对在植物中的表达被优化,例如经密码子优化的DNA,例如包含SEQ ID No. 2从第25位核苷酸至第1071位核苷酸(包括作为边界的位置)的序列或包含SEQ ID No. 3从第400位核苷酸至第1446位核苷酸(包括作为边界的位置)的序列的DNA,所述DNA编码较之宿主植物内源HPPD较不敏感的HPPD。此类植物包括但不限于田间作物、水果和蔬菜,例如卡诺拉油菜(canola)、向日葵、烟草、甜菜、棉花、玉蜀黍、小麦、大麦、稻、高粱、西红柿、芒果、

桃、苹果、梨、草莓、香蕉、甜瓜、马铃薯、胡萝卜、生菜、卷心菜、洋葱、豆类物种 (soya spp)、甘蔗、豌豆、芸豆 (field bean)、杨、葡萄、柑桔、苜蓿、黑麦、燕麦、草皮草 (turf) 和饲料牧草、亚麻和油菜籽油菜 (oilseed rape) 以及产生坚果的植物。

[0055] 在一种更特别的实施方式中,本发明涉及包含任何编码本发明的 HPPD 的 DNA 的植物,这些植物的植物部分、植物细胞或后代,所述 DNA 已针对在大肠杆菌中的表达被优化或已针对在植物中的表达被优化,例如经密码子优化的 DNA,例如包含 SEQ ID No. 2 从第 25 位核苷酸至第 1071 位核苷酸 (包括作为边界的位置) 或包含 SEQ ID No. 3 从第 400 位核苷酸至第 1446 位核苷酸 (包括作为边界的位置) 的序列的 DNA,所述 DNA 编码较之宿主植物内源 HPPD 较不敏感的 HPPD,并且其中所述植物选自卡诺拉油菜、向日葵、烟草、甜菜、棉花、玉蜀黍、小麦、大麦、稻、马铃薯、豆类物种、甘蔗、豌豆、芸豆、杨、葡萄、苜蓿、黑麦、燕麦、草皮草 (turf) 和饲料牧草、亚麻和油菜籽油菜以及产生坚果的植物构成的组,进一步更优选地,此类植物选自豆类物种、稻、甜菜、小麦、棉花、卡诺拉油菜、油菜籽油菜或玉蜀黍构成的组。

[0056] 在另一实施方式中,本发明的 HPPD 蛋白包含 SEQ ID No. 7 的序列,并且较之植物 (特别是宿主植物,其中本发明的此类 HPPD 被表达或将被表达) 内源未经突变的 HPPD 而言对三酮类 (命名为三酮类 HPPD 抑制剂,例如环磺酮、磺草酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌,特别是环磺酮) 的类别、二酮腈类的类别 (异噁氟草) 或 pyrazolate 的类别 (命名为 pyrazolate HPPD 抑制剂,例如 pyrasulfotole、吡啶特、苯吡啶草酮、吡草酮) 的 HPPD 抑制剂较不敏感。

[0057] HPPD 蛋白的酶活性可通过下述任何方法来测量,所述方法使得能测量 HPP 或 O₂ 底物的量的减少,或者测量源于酶促反应的任何产物 (即尿黑酸或 CO₂) 的积累。特别地,HPPD 活性可通过 Garcia 等人 (1997), Biochem. J. 325, 761-769 或 Garcia 等人 (1999), Plant Physiol. 119, 1507-1516 中描述的方法来测量,所述参考文献通过引用并入本文。

[0058] 根据本发明,三酮类的类别的 HPPD 抑制剂 (或三酮 HPPD 抑制剂) 表示具有三酮骨架的 HPPD 抑制剂。作为此类三酮 HPPD 抑制剂的例子,可举出下述分子,磺草酮 [即 2-[2-氯-4-(甲基磺酰基)苯甲酰基]-1,3-环己二酮],甲基磺草酮 [即 2-[4-(甲基磺酰基)-2-硝基苯甲酰基]-1,3-环己二酮] 和环磺酮 [即 2-[2-氯-4-(甲基磺酰基)-3-[(2,2,2-三-氟乙氧基)甲基]苯甲酰基]-1,3-环己二酮],庄无忌 [即 2-{2-氯-4-甲磺酰基-3-[(RS)-四氢-2-咪喃基甲氧基甲基]苯甲酰基}环己-1,3-二酮],bicyclopyrone [即 4-羟基-3-{2-[(2-甲氧基乙氧基)甲基]-6-(三氟甲基)-3-吡啶基羰基}二环 [3.2.1] 辛-3-烯-2-酮],双环磺草酮 [即 3-(2-氯-4-甲磺酰基苯甲酰基)-2-苯基硫代二环 [3.2.1] 辛-2-烯-4-酮]。

[0059] 根据本发明,pyrazolate 的类别的 HPPD (或 pyrazolate HPPD 抑制剂) 表示具有吡啶基团的 HPPD 抑制剂。作为此类 pyrazolate HPPD 抑制剂的例子,可以举出苯吡啶草酮 [即 3-(4,5-二氢-3-异噁唑基)-2-甲基-4-(甲基磺酰基)苯基](5-羟基-1-甲基-1H-吡啶-4-基)甲酮] 和 pyrasulfotole [(5-羟基-1,3-二甲基吡啶-4-基(2-甲磺酰基-4-三氟甲基苯基)甲酮]。

[0060] 本发明还涉及编码本发明的聚球藻属 HPPD 以及经改造的序列的核酸序列,特别是经分离的 DNA,优选是可在植物中表达的嵌合基因。

[0061] 本发明还涉及编码本发明的 HPPD 酶的核酸序列,所述 HPPD 酶保留了其催化对羟苯基丙酮酸到尿黑酸的转化的性质,并且较之内源未经突变的植物 HPPD 对三酮类的类别(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮),或 pyrazolate 的类别(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮、庄无忌、bicyclopyrone、双环磺草酮)的 HPPD 抑制剂较不敏感,并且其中,被编码的氨基酸序列显示出与 SEQ ID No. 4 至少 75%,80%,特别是至少 85%,优选至少 90%,更优选至少 95%,进一步更优选至少 98%,以及最优选至少 99%的序列同一性。

[0062] 在一种更特别的实施方式中,本发明的核酸编码较之宿主植物内源 HPPD 而言对三酮类的类别(例如环磺酮、磺草酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone 和庄无忌)、pyrazolate 的类别(命名为 pyrazolate HPPD 抑制剂,例如 pyrasulfotole、吡唑特、苯吡唑草酮、吡草酮)、异噁唑类的类别(例如异噁氟草)、或二酮类的类别(例如二酮腈)的 HPPD 抑制剂较不敏感的 HPPD 酶。

[0063] 根据本发明,“核酸序列”被理解为核苷酸序列,其可以是 DNA 或 RNA 类型,优选是 DNA 类型的,并且其特别是双链的,无论是天然或合成来源的,特别是下述 DNA 序列,其中编码根据本发明的 HPPD 的密码子已经根据其将表达的宿主生物经过优化(例如,通过用较之原来的或来源生物而言、在此类宿主生物或此类宿主生物属于的组的密码子使用表中更优选或最优选的那些密码子替代其密码子实现的)。

[0064] “经分离的核酸/DNA/蛋白质”在本文中使用时指并非天然存在的核酸/DNA/蛋白质(例如,具有与天然存在的 DNA 不同的核苷酸序列的人工或合成 DNA,或经修饰的蛋白质)或者不再存在于其原来存在的天然环境中的核酸/DNA/蛋白质,例如,在嵌合基因中与异源调控元件连结的 DNA 编码序列(例如与可在植物中表达的启动子有效相连的细菌编码序列)、转入另外的宿主细胞(例如转基因植物细胞)的 DNA。

[0065] 考虑到本发明的一种特别的实施方式和受欢迎的解决方案,即,对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂较不敏感的 HPPD,使用 WO 2009/14407 中详细描述的方法,按照下文所述,使用三酮、异噁唑或 pyrazolate HPPD 抑制剂,特别是选自环磺酮、甲基磺草酮、pyrasulfotole、苯吡唑草酮、磺草酮、bicyclopyrone、二酮腈、吡草酮、吡唑特、庄无忌(tefuryltrione)的 HPPD 抑制剂,来对耐受性水平测量加以分析。

[0066] “包含”某序列“X”的术语 DNA 或蛋白质在本文通篇中使用时表示至少包括或含有序列“X”的 DNA 或蛋白质,这使得:其它核苷酸或氨基酸序列可被包括于 5' (或 N-末端)和 / 或 3' (或 C-末端)端,例如,可选择标志物蛋白质(的核苷酸序列)、转运肽(的核苷酸序列)和 / 或 5' 前导序列或 3' 尾随序列。相似地,在本文通篇中以及本申请的权利要求中术语“包含”及其各种词性应当被理解为暗示了包括所指出的整数或步骤或者整数或步骤的组,但是不排除任何其它整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0067] 在本发明的一种实施方式中,编码 HPPD 的编码区域包含下述核苷酸序列,所述核苷酸序列编码具有 SEQ ID Nos 4、5、6、7 和 16 示出的氨基酸序列,例如 SEQ ID Nos 1、2、3 和 15 的核苷酸序列。

[0068] 但是,应当清楚,还可使用这些核苷酸序列的变体,包括其插入、缺失和取代,达到相同的效果。等同地,提到的核苷酸序列的来自不同于聚球藻属的物种的同源体也可使用。

[0069] 描述的核苷酸序列的变体将与鉴定出的编码 HPPD 酶的核苷酸序列(例如序列表中鉴定出的那些)具有优选至少大约 70%、80%或 85%或 90%或 95%的序列同一性。

[0070] 与本发明所述的蛋白质具有“基本相同的氨基酸序列”的蛋白质指与根据本发明的蛋白质具有至少 90%，特别至少 95%，优选至少 97% 序列同一性的蛋白质，其中百分比序列同一性是通过使用在 GCG (Madison, Wisconsin, USA) 的 Wisconsin 软件包版本 10.0 的 GAP 程序中 blosum62 计分矩阵来测定的（使用 GCG 默认参数）。在本申请中通篇使用时，当“序列同一性”与蛋白质相关时，指使用该特定的分析时相同氨基酸的百分比。在本文中使用时，当“序列同一性”与 DNA 序列相关时，是通过使用 GCG (Madison, Wisconsin, USA) 的 Wisconsin 软件包版本 10.0 的 GAP 程序中 nwsgapdna 计分矩阵来测定的（使用 GCG 默认参数）。

[0071] 就本发明的目的而言，表示为百分比的两条相关核苷酸或氨基酸序列的“序列同一性”指两条被最优比对的序列中具有相同残基的位置数 (x100) 除以被比较的位置数。缺口，即，比对中在一条序列中存在残基而在另一条中不存在残基的位置，被视为具有不相同残基的位置。通过 Needleman 和 Wunsch 算法 (Needleman and Wunsch 1970) 来进行两条序列间的比对。可使用标准软件程序，例如，是 Wisconsin 软件包版本 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA) 一部分的 GAP，使用默认计分矩阵，以及缺口制造罚分 50 和缺口延伸罚分 3，来方便地进行计算机辅助的上述序列比对。

[0072] 可通过对基因组序列数据进行计算机分析，来鉴定与编码根据本发明的 HPPD 酶的核苷酸序列同源的核苷酸序列。

[0073] 还可使用鉴定出的编码根据本发明的 HPPD 酶的核苷酸序列或其部分作为探针，通过在严格条件下杂交，来鉴定和分离同源核苷酸序列。此类部分应当优选具有下述核苷酸序列，所述序列包含来自根据本发明的 HPPD 编码基因序列编码区域的至少 40 个连续核苷酸，优选地，来自 SEQ ID No. 1、SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3 或 SEQ ID No. 15 的编码区域。但是，探针也可包含源于 HPPD 编码核酸的核苷酸序列的更长的区域，例如来自任何提到的 HPPD 基因的大约 50、60、75、100、200 或 500 个连续核苷酸。优选地，探针应当包含编码高度保守区域的核苷酸序列，所述高度保守区域可通过比对不同 HPPD 蛋白而鉴定到。

[0074] 在本文中使用时，“严格杂交条件”表示：如果在探针和靶序列之间存在至少 95%（以及优选至少 97%）的序列同一性，通常将发生的杂交。严格杂交条件的例子是在包含 5xSSC (150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠 (pH 7.6)、5x Denhardt's 溶液、10% 硫酸葡聚糖和 20 μ g/ml 变性的剪切载体 DNA (例如鲑鱼精 DNA) 的溶液中孵育过夜，接着在大约 65°C 在 0.1x SSC 中洗涤杂交支持物，优选进行两次大约 10 分钟。其它杂交和洗涤条件是公知的，并且示例于 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989), 特别是第 11 章中。

[0075] 还可使用特异于编码酶的 HPPD 基因的寡核苷酸 (例如但不限于，包含选自 SEQ ID Nos 1、2、3、15 的核苷酸序列或它们的互补序列的大约 20 至大约 50 个连续核苷酸的寡核苷酸) 作为引物，通过 DNA 扩增来获得此类变体序列。

[0076] 本发明还包括下述变体 HPPD 酶，它们是与 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 16 的 HPPD 氨基酸序列相似的氨基酸序列，其中，一个或多个氨基酸已被插入、缺失或取代。在本发明上下文中，氨基酸序列的变体指尽管对其有任何氨基酸取代、添加或缺失，但具有与本文所述的氨基酸序列相似的催化活性的那些多肽、酶或蛋白质。优选地，变体氨基酸序列与 SEQ ID No. 4 或 SEQ ID No. 16 的氨基酸序列具有至少大约 80% 或 85% 或 90% 或 95% 的序列同

一性。还优选地,包含变体氨基酸序列的多肽具有 HPPD 酶活性。用于测定 HPPD 酶活性的方法是本领域公知的,其包括 WO 2009/144079 中或 WO 2002/046387 中被详细描述地检验。

[0077] 取代包括下述氨基酸变化,其中氨基酸被不同的天然存在的或非传统的氨基酸残基替代。此类取代可被分类为“保守的”,其中,在本发明的 HPPD 蛋白中含有的氨基酸残基被具有相似特征的另一天然存在的氨基酸替代,例如 **Gly↔Ala、Val↔Ile↔Leu、Asp↔Glu、Lys↔Arg、Asn↔Gln** 或 **Phe↔Trp↔Tyr**。本发明包括的取代还可以是“非保守的”,其中在本发明的 HPPD 蛋白中存在的氨基酸残基被具有不同性质的氨基酸取代,例如,来自不同组的天然存在的氨基酸(例如,用丙氨酸取代带电荷的或疏水的氨基酸)。氨基酸取代典型地是单残基的,但是也可以是多个残基的,成串的或分散的。氨基酸缺失将通常是 1-10 个氨基酸残基数量级上的,而插入可以是任何长度的。缺失和插入可以对 N-末端、C-末端进行或者是内部缺失或插入。通常,在氨基酸序列内的插入将比氨基或羧基末端融合小,其在 1 至 4 个氨基酸残基的数量级上。“相似氨基酸”在本文中使用时指具有相似氨基酸侧链的氨基酸,即具有极性、非极性或特别是中性的侧链的氨基酸。“非相似氨基酸”在本文中使用时指具有不同氨基酸侧链的氨基酸,例如,具有极性侧链的氨基酸与具有非极性侧链的氨基酸是不相似的。极性侧链通常倾向于存在于蛋白质的表面,它们在那里可以和细胞中发现的水性环境相互作用(“亲水性”氨基酸)。另一方面,“非极性”氨基酸倾向于驻留于蛋白质的中心内,它们在那里可以与相似的非极性邻居相互作用(“疏水性”氨基酸)。具有极性侧链的氨基酸的例子是精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、组氨酸、赖氨酸、丝氨酸和苏氨酸(除了疏水性的半胱氨酸之外,全部都是亲水性的)。具有非极性侧链的氨基酸的例子是丙氨酸、甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸和色氨酸(除了中性的甘氨酸之外,全部都是疏水性的)。

[0078] 本发明还包括特异性识别根据本发明的 HPPD 酶的抗体。

[0079] 本发明还涉及编码根据本发明的 HPPD 的核酸作为标志物基因或作为编码序列在转化植物的方法中的用途,使得可向植物赋予对是 HPPD 抑制剂的除草剂的抗性,本发明还涉及 HPPD 抑制剂在包含编码根据本发明的 HPPD 的核酸序列的植物上的用途。在本发明的一种实施方式中,在此类用途中,HPPD 抑制剂是三酮类或 pyrazolate,优选是环磺酮、甲基磺草酮或磺草酮、bicyclopyrone 和庄无忌。当然应当理解,该序列还可与其它基因标志物和 / 或编码具有有用的农业性质的一种或多种蛋白质的序列组合使用。

[0080] 在作物的商业生产中,想要在可靠的杀虫剂管理下从作物植物的田间除掉不想要的植物(即,“杂草”)。理想的处理将是这样的,其可应用至整块田间,但是将仅除掉不想要的植物,同时使得作物植物未受影响。一种此类的处理系统将涉及使用对除草剂耐受的作物植物,使得当在除草剂耐受的作物植物田间喷雾除草剂时,作物植物将继续茂盛生长同时非除草剂耐受性的杂草被杀死或被严重损害。理想地,此类处理系统利用了变动的除草剂性质的优点,使得杂草控制能提供灵活度和经济性的可能的组合中最好的。例如,各除草剂在田间具有不同寿命,一些除草剂在应用到田间之后能在相对长的时间内保持下来并有效,而另一些除草剂则迅速被破坏为其它和 / 或非活性化合物。理想的处理系统将允许使用不同的除草剂,使得种植者可定制针对特定情况的除草剂选择。

[0081] 虽然目前可商业获得大量的除草剂耐受性作物植物,但针对很多商业除草剂和除

草剂 / 作物组合已提出了下述议题 : 各除草剂典型地具有针对常见杂草物种的不完全活性谱。对于已使用了一段时间的大多数各个除草剂来说, 除草剂抗性杂草物种和生物型的种群已更为普遍 (见例如 Tranel and Wright(2002)Weed Science 50 :700-712 ;Owen and Zelaya(2005)Pest Manag. Sci. 61 :301-311)。对超过一种除草剂有抗性的转基因植物已被描述过 (见例如 W02005/012515)。但是, 在作物生产、杂草控制选择、残余杂草控制的延伸以及作物产量改进的每个方面, 都持续需要改进。

[0082] 本发明的 HPPD 蛋白质或基因有利地在植物中与编码向此类植物赋予有用的农艺学性质的蛋白质或 RNA 的其它基因组合。在编码在经转化的植物上赋予有用的农艺学性质的蛋白质或 RNA 的基因中, 可提到的是编码赋予对化学结构不同于 HPPD 抑制剂型除草剂的一种或多种除草剂的耐受性的蛋白质的 DNA 序列, 赋予对某些昆虫的耐受性的蛋白质的 DNA 序列、赋予对某些疾病的耐受性的蛋白质的 DNA 序列, 编码提供线虫或昆虫控制的 RNA 的 DNA 等等。

[0083] 此类基因被特别描述于公开的 PCT 专利申请 WO 91/02071 和 W095/06128 中。

[0084] 在编码在经转化的植物细胞和植物上赋予对某些除草剂的耐受性的蛋白质的 DNA 序列中, 可以提到 bar 或 PAT 基因或 W02009/152359 中描述的天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 基因 (其赋予对草铵膦除草剂的耐受性), 编码赋予对以 EPSPS 作为靶标的除草剂 (草甘膦及其盐) 的耐受性的合适的 EPSPS 的基因 (US 4, 535, 060、US 4, 769, 061、US5, 094, 945、US 4, 940, 835、US 5, 188, 642、US 4, 971, 908、US 5, 145, 783、US5, 310, 667、US 5, 312, 910、US 5, 627, 061、US 5, 633, 435), 或编码草甘膦氧化还原酶的基因 (US 5, 463, 175)。

[0085] 在编码赋予对以 EPSPS 作为靶标的除草剂的耐受性的合适的 EPSPS 的 DNA 序列中, 将特别提到编码植物 EPSPS (特别是玉蜀黍 EPSPS) 的基因, 特别是其包含两处突变的玉米 EPSPS, 特别是在第 102 位氨基酸处和第 106 位氨基酸处的突变 (W0 2004/074443), 其被描述于专利申请 US 6566587 中, 在下文中被称为双突变体玉蜀黍 EPSPS 或 2mEPSPS ; 或者编码分离自农杆菌属的 EPSPS 的基因, 其被美国专利 5, 633, 435 的 SEQ ID No. 2 和 SEQ ID No. 3 描述, 也被命名为 CP4。

[0086] 在编码赋予对以 EPSPS 作为靶标的除草剂的耐受性的合适的 EPSPS 的 DNA 序列中, 将特别提到编码来自球形节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*) 的 EPSPS GRG23 以及突变体 GRG23 ACE1、GRG23 ACE2 或 GRG23 ACE3 (特别是 W02008/100353 中描述的 GRG23 的突变体或变体, 例如 W02008/100353 中的 SEQ ID No. 29 的 GRG23(ace3)R173K) 的基因。

[0087] 在编码 EPSPS (以及更特别地, 上述编码基因) 的 DNA 序列的情况下, 编码这些酶的序列有利地在之前存在编码转运肽的序列, 特别是美国专利 5, 510, 471 或 5, 633, 448 中描述的“经优化的转运肽”。

[0088] 在 W0 2007/024782 中, 公开了对草甘膦和至少一种 ALS (乙酰乳酸合酶) 抑制剂耐受的植物。更具体地, 公开了含有编码 GAT (草甘膦 -N- 乙酰转移酶) 多肽和赋予对 ALS 抑制剂的抗性的多肽的基因的植物。

[0089] 在 US 专利 6, 855, 533 中, 公开了转基因烟草植物, 其含有突变的拟南芥属 ALS/AHAS 基因。

[0090] 在 US 专利 6, 153, 401 中, 公开了含有编码通过代谢赋予对 2,4-D (2,4- 二氯苯氧

乙酸)的耐受性的2,4-D-单加氧酶的基因的植物。

[0091] 在US 2008/0119361和US 2008/0120739中,公开了含有编码通过代谢赋予对麦草畏(3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸)的耐受性的麦草畏单加氧酶的基因的植物。

[0092] 上述所有除草剂耐受性均可与表现出是本发明主题的HPPD耐受性的那些组合。

[0093] 在编码关于对昆虫的耐受性的性质的蛋白质的DNA序列中,将特别提到文献中广为描述并且本领域技术人员公知的Bt蛋白。还将提到从细菌(例如发光杆菌属)提取的蛋白质(WO 97/17432和WO 98/08932)。

[0094] 在编码赋予对昆虫的耐受性的新颖性质的目的蛋白质的此类DNA序列中,将特别提到在文献中被广为描述并且本领域技术人员公知的Bt Cry或VIP蛋白。它们包括:Cry1F蛋白或源于Cry1F蛋白的杂交体(例如US 6,326,169、US 6,281,016、US 6,218,188中描述的杂交体Cry1A-Cry1F蛋白或其毒性片段),Cry1A型的蛋白质或其毒性片段,优选是Cry1Ac蛋白或源于Cry1Ac蛋白的杂交体(例如,US 5,880,275中描述的杂交体Cry1Ab-Cry1Ac蛋白)或Cry1Ab或Bt2蛋白或其杀昆虫片段(如EP451878中描述的),Cry2Ae、Cry2Af或Cry2Ag蛋白(如WO02/057664中描述的)或其毒性片段,WO 2007/140256中描述的Cry1A.105蛋白(SEQ ID No. 7)或其毒性片段,NCBI检录号ABG20428的VIP3Aa19蛋白,NCBI检录号ABG20429的VIP3Aa20蛋白(WO 2007/142840中的SEQ ID No. 2),COT202或COT203棉花事件中产生的VIP3A蛋白(分别见WO 2005/054479和WO 2005/054480),WO01/47952中描述的Cry蛋白,Estruch等人(1996),Proc Natl Acad Sci U S A. 28;93(11):5389-94和US 6,291,156中描述的VIP3Aa蛋白或其毒性片段,来自致病杆菌属(Xenorhabdus)(如WO98/50427中描述的)、沙雷氏菌属(特别是来自嗜虫沙雷氏菌(S. entomophila))或发光杆菌属(Photobacterium)的物种的菌株的杀昆虫蛋白,例如WO98/08932中所述的来自发光杆菌属的Tc-蛋白(例如,Waterfield等人,2001,Appl Environ Microbiol. 67(11):5017-24;Ffrench-Constant and Bowen,2000,Cell Mol Life Sci.;57(5):828-33)。此外这些蛋白质中任何一种的下述任何变体或突变体也包括在本文中:在一些(1-10,优选1-5)个氨基酸上与上述任何序列(特别是它们的毒性片段的序列)不同的变体或突变体,或者与转运肽(例如质体转运肽)或其它蛋白质或肽融合的变体或突变体。

[0095] 本发明还涉及嵌合基因(或表达盒),其包含编码序列以及位于5'和/或3'位置(至少位于5'位置)的异源调控元件,它们能在宿主生物(特别是植物细胞或植物)中与含有编码前文定义的HPPD的至少一种核酸序列的编码序列一起发挥功能。

[0096] 在一种特别的实施方式中,本发明涉及前文描述的嵌合基因,其中宿主细胞选自细菌、酵母、毕赤酵母属、真菌、杆状病毒、体外细胞、原生质体、植物细胞、植物、植物部分及其植物种子。

[0097] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及前文描述的嵌合基因,其中所述嵌合基因含有位于编码根据本发明的HPPD的核酸序列的5'位置处编码植物转运肽的核酸序列,该序列被安排于启动子区域和编码根据本发明的HPPD的序列之间,以允许转运肽/HPPD融合蛋白的表达。

[0098] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及HPPD抑制剂型除草剂在包含根据本发明的HPPD耐受基因的植物、植物部分或植物种子上的用途,或者HPPD抑制剂型除草剂在其中

将种植或播种此类植物、植物部分或种子的土壤上的用途,所述 HPPD 抑制剂型除草剂单独使用或与一种或多种作用方式不同于 HPPD 抑制剂的其它已知除草剂组合使用。在一种更特别的实施方式中,利用的 HPPD 抑制剂型除草剂选自三酮类(被命名为三酮 HPPD 抑制剂)(例如环磺酮、磺草酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌,特别是环磺酮)、二酮类的类别(例如二酮腈)、异噁唑类的类别(例如异噁氟草)或 pyrazolate 的类别(被命名为 pyrazolate HPPD 抑制剂)(例如 pyrasulfotole、吡唑特、苯吡唑草酮、吡草酮)构成的组,进一步更具体地,本发明涉及环磺酮、甲基磺草酮、二酮腈、bicyclopyrone、庄无忌、吡草酮、pyrasulfotole、吡唑特和磺草酮对此类 HPPD 抑制剂耐受性植物、植物部分或植物种子的应用。

[0099] 作为在植物细胞和植物中作为启动子发挥功能的调控序列,可使用天然表达于植物中的基因的任何启动子序列,特别是尤其表达于植物叶中的启动子,例如细菌、病毒或植物来源的“组成型”启动子,或者“光依赖性”启动子,例如植物核酮糖-二羧化酶/加氧酶(RuBisCO)小亚基基因的启动子,或者任何合适的可表达可使用的已知启动子。在植物来源的启动子中,将提到 EP 0 507 698 A1 中描述的组蛋白启动子、稻肌动蛋白启动子(US 5,641,876)或植物泛素启动子(US 5,510,474)。在植物病毒基因的启动子中,将提到花椰菜花叶病毒(CaMV 19S 或 35S, Sanders 等人(1987), Nucleic Acids Res. 15(4): 1543-58.)、圆环病毒(AU 689 311)或木薯叶脉花叶病毒(CsVMV, US 7,053,205)的启动子。

[0100] 在本发明的一种实施方式中,可使用特异于植物的特别的区域或组织的启动子,以表达本发明的 HPPD,例如特异于种子的启动子(Datla, R. 等人,1997, Biotechnology Ann. Rev. 3,269-296),尤其是油菜籽油菜蛋白启动子(EP 255 378 A1)、菜豆蛋白启动子、麦谷蛋白启动子、向日葵蛋白启动子(WO 92/17580)、白蛋白启动子(WO 98/45460)、油质蛋白启动子(WO 98/45461)、SAT1 启动子或 SAT3 启动子(PCT/US98/06978)。

[0101] 还可使用可诱导启动子,其有利地选自苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)、HMG-CoA 还原酶(HMG)、几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶抑制剂(PI)、PR1 家族基因、胭脂氨酸合成酶(nos)和 vspB 启动子(US 5 670 349,表 3)、HMG2 启动子(US 5 670 349)、苹果 β -半乳糖苷酶(ABG1)启动子和苹果氨基环丙烷羧酸合酶(ACC 合酶)启动子(WO 98/45445)。

[0102] 根据本发明,还可与启动子组合使用其它调控序列,所述序列定位于启动子和编码序列之间,例如转录活化因子(“增强子”),例如申请 WO 87/07644 中描述的烟草花叶病毒(TMV)的或 Carrington & Freed1990, J. Virol. 64:1590-1597 描述的烟草蚀刻病毒(TEV)的转录活化因子,例如,或内含子,例如玉蜀黍的 adh1 内含子或稻肌动蛋白的内含子 1。

[0103] 在另一特别的实施方式中,本发明的基因以多个(优选两个)拷贝存在于植物中,它们每个被不同的可在植物中表达的启动子控制。

[0104] 在另一特别的实施方式中,本发明的嵌合基因可与编码 HPPD 蛋白的任何其它嵌合基因组合,优选地,这些不同基因被在植物中具有活性的不同调控元件控制。

[0105] 在另一特别的实施方式中,本发明的嵌合基因可与处于相同或不同可在植物中表达的启动子控制下的 CYP450 玉蜀黍单加氧酶(nsf1 基因)基因组合。

[0106] 作为调控终止子或聚腺苷化序列,可使用细菌来源(例如根癌农杆菌

(*Agrobacterium tumefaciens*) 的 nos 终止子)、病毒来源(例如 CaMV 35S 终止子)或植物来源(例如,公开的专利申请 EP 0 633 317 A1 中描述的组蛋白终止子)的任何相应序列。

[0107] 术语“基因”在本文中使用时指侧翼有 5' 和 / 或 3' 调控序列的允许 RNA 被转录的 DNA 编码区域,所述 RNA 可被翻译为蛋白质,典型地,至少包含启动子区域。当提到本发明的编码 HPPD 的 DNA 时,“嵌合基因”指下述 HPPD 编码 DNA 序列,其具有不同于驱动 HPPD 蛋白在其天然宿主细胞中表达的天然存在的细菌 5' 和 / 或 3' 调控序列的 5' 和 / 或 3' 调控序列(也被称为“异源启动子”或“异源调控序列”)。

[0108] 术语“包含序列 X 的 DNA/ 蛋白质”和“具有包含序列 X 的序列的 DNA/ 蛋白质”在本文中使用时指下述 DNA 或蛋白质,它们在其核苷酸或氨基酸序列中至少包括或含有序列 X,这使得在 5' (或 N- 末端) 和 / 或 3' (或 C- 末端) 末端可包括其它核苷酸或氨基酸序列,例如, N- 末端转运或信号肽。术语“包含”在本文中使用时是表示“包括”的开放式语言,其表示除了具体列举的那些之外还可存在其它元件。术语“由 构成”在本文中使用时是封闭式语言,即,仅存在具体列举的这些元件。术语“编码包含序列 X 的蛋白质的 DNA”在本文中使用时指包含下述编码序列的 DNA,所述编码序列在转录和翻译后产生至少含有氨基酸序列 X 的蛋白质。编码蛋白质的 DNA 无须是天然存在的 DNA,其可以是半合成的、完全合成的或人工 DNA,并且可包括内含子和 5' 和 / 或 3' 侧翼区域。术语“核苷酸序列”在本文中使用时指 DNA 或 RNA 分子的序列,其可以是单链或双链形式的。

[0109] 根据本发明的 HPPD 蛋白可根据本领域已知的流程被装备有信号肽,见例如公开的 PCT 专利申请 WO 96/10083,或者它们可被另外的肽,例如导致蛋白质被运送至叶绿体的叶绿体转运肽(例如, Van Den Broeck 等人,1985, Nature 313,358 或 US 专利 5,510,471 的经修饰的叶绿体转运肽)替代,或被将蛋白质靶向至其它质体、线粒体、ER 或另外的细胞器的肽或分泌性信号肽替代,或者其可被甲硫氨酸氨基酸或被甲硫氨酸 - 丙氨酸二肽替代。在天然被靶向或分泌的蛋白质中发现了用于靶向至细胞内细胞器或用于分泌出植物细胞或分泌至细胞壁的信号序列,优选地, **Klösgen** 等人 (1989, Mol. Gen. Genet. 217,155-161)、**Klösgen** and Weil (1991, Mol. Gen. Genet. 225,297-304)、Neuhaus & Rogers (1998, Plant Mol. Biol. 38,127-144)、Bih 等人 (1999, J. Biol. Chem. 274, 22884-22894)、Morris 等人 (1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255,328-333)、Hesse 等人 (1989, EMBO J. 8 2453-2461)、Tavladoraki 等人 (1998, FEBS Lett. 426,62-66)、Terashima 等人 (1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52,516-523)、Park 等人 (1997, J. Biol. Chem. 272,6876-6881)、Shcherban 等人 (1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92, 9245-9249) 描述的那些,所有这些都通过引用并入本文,特别是来自玉米、棉花、大豆或稻的被靶向或分泌的蛋白质的信号肽序列。编码此类植物信号肽的 DNA 序列可被插入编码用于在植物中表达 HPPD 蛋白的嵌合基因中。

[0110] 除非实施例中另有指明,用于制造和操纵重组 DNA 的所有流程都通过 Sambrook 等人, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989) 和 Ausubel 等人 (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA 的第 1 卷和第 2 卷中描述的标准流程来进行。用于植物分子生物学工作的标准材料和方法被描述于 R. R. D. Croy 的 Plant Molecular Biology

Labfax(1993) (由 BIOS Scientific Publications Ltd(UK) 和 Blackwell Scientific Publications(UK) 联合出版) 中。用于 PCR 技术的流程可被发现于 M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky 和 T. J. White 编辑的“PCR protocols :a guide to methods and applications” (Academic Press, Inc., 1990) 中。

[0111] 术语“耐受性”、“耐受”或“较不敏感”可互换使用,它们表示根据用包含编码各 HPPD 蛋白的基因的核酸转化的菌株或植物的可视指标表型在不同浓度的多种 HPPD 抑制剂存在时筛选的 HPPD 内在耐受性的相对水平。与这些指标表型(棕色的形成、生长抑制、褪色、除草剂效果等等)相关的剂量应答和剂量应答的相对改变被方便地以例如在除草剂的不同浓度范围内基于植物损害、分生组织褪色症状等等以正常方式的 GR50(生长降低 50% 的浓度)值或 MIC(最小抑制浓度)值来表示,其中值的增加对应于表达的 HPPD 的内在耐受性增加。这些数据可以以例如源于剂量 / 应答曲线的 GR50 值来表示,所述曲线具有绘制于 x 轴上的“剂量”和绘制于 y 轴上的“百分比杀死 (percentage kill)”、“除草剂效果”、“出苗绿色植物的数目”等等,其中增加的 GR50 值对应于表达的 HPPD 的内在耐受性水平增加。除草剂可合适地在出苗前或出苗后应用。

[0112] 类似地,编码根据本发明的 HPPD 蛋白的核酸或基因或本发明的 HPPD 蛋白的耐受性水平是通过对测试植物(例如烟草,或作物植物,例如大豆或棉花)进行转基因、再生、育种和喷雾测试来筛选的,根据这些结果,这些植物较之不含任何外源编码 HPPD 蛋白的基因的植物或较之含有包含处于与本发明 HPPD DNA 相同启动子控制下的拟南芥 HPPD 编码 DNA 的基因的植物时,对 HPPD 抑制剂(例如环磺酮、甲基磺草酮、二酮腈类和 / 或 bicyclopyrone) 至少更耐受 2-4 倍。

[0113] “宿主生物”或“宿主”被理解为其中为了产生根据本发明的 HPPD 的目的可引入根据本发明的核酸或嵌合基因的任何单细胞或多细胞异源生物。这些生物特别是细菌,例如大肠杆菌,酵母,特别是酿酒酵母属或克鲁维酵母属的,毕赤酵母,真菌,特别是曲霉属,杆状病毒,或者优选地,植物细胞和植物。

[0114] 根据本发明,“植物细胞”被理解为源于植物或在植物中发现的任何细胞,其能形成未分化组织(例如愈伤组织)、分化组织(例如胚胎)、植物的部分、植物或种子,或是它们的一部分。这包括原生质体和花粉、培养的植物细胞或体外生长的原生质体以及能再生为完整植物的植物细胞。

[0115] 根据本发明,“植物”被理解为能光合作用的任何分化的多细胞生生物,特别是单子叶或双子叶生物,更尤其是意欲或不意欲用于动物或人类营养的栽培的植物,例如玉蜀黍或玉米,小麦、芸苔属物种的植物,例如油菜 (*Brassica napus*) 或芥菜 (*Brassica juncea*), 豆类物种,稻,甘蔗,甜菜,烟草,棉花、蔬菜植物,例如黄瓜、韭、胡萝卜、西红柿、生菜、胡椒、甜瓜、西瓜等等。转基因植物在本文中使用时指包含稳定插入进其基因组的外来或异源基因的植物。

[0116] 在一种实施方式中,本发明涉及对植物的转化。在植物中天然表达的基因的任何启动子序列,或天然表达于植物中的基因的启动子元件的任何杂交体或组合,包括农杆菌属或植物病毒启动子,或适于控制除草剂耐受性基因在植物中的转录的任何启动子,可在本发明的植物中用作为启动子序列(本文中命名为“可在植物中表达的启动子”)。此类合适的可在植物中表达的启动子的例子如上文所述。在本发明的一种实施方式中,此类可在

植物中表达的启动子与编码本发明的 HPPD 蛋白的编码序列有效地相连,形成本发明的嵌合 HPPD 基因。

[0117] 根据本发明,还可与启动子调控序列组合使用位于启动子和编码序列之间的其它调控序列,例如内含子序列或转录活化因子(增强子)。此类合适的调控序列的例子如上文所述。

[0118] 细菌或病毒来源(例如来自根癌农杆菌的 nos 终止子)或植物来源(例如申请 EP 0 633 317 A1 中描述的组蛋白终止子)的任何相应的序列,可用作为转录终止(和聚腺苷化)调控序列。

[0119] 在本发明的一种特别的实施方式中,在根据本发明的外源 HPPD 的编码核酸序列的 5' (上游)利用编码转运肽的核酸序列,该转运肽序列被安排于启动子区域和编码外源 HPPD 的序列之间,以允许转运肽-HPPD 融合蛋白(例如 SEQ ID No. 6 或 SEQ ID No. 7 的蛋白质)的表达。转运肽使得可以指导 HPPD 进入质体,更尤其是进入叶绿体,当本发明的 HPPD 蛋白进入质体时融合蛋白在转运肽和本发明的 HPPD 蛋白之间被切割。转运肽可以是单条肽,例如 EPSPS 转运肽(美国专利 5,188,642 中描述的)或植物核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基(RuBisCO ssu)的转运肽,如果合适的话,包括成熟 RuBisCO ssu 的 N-末端部分的数个氨基酸(EP 189 707A1),或者可以是若干转运肽的融合体,例如下述转运肽,其包含与具有质体定位的成熟蛋白的 N-末端序列的部分融合的第一植物转运肽,所述部分又进而融合至如专利 EP 508 909 A1 中描述的第二植物转运肽,并且,更尤其是下述经优化的转运肽,其包含向日葵 RuBisCO ssu 的转运肽,该转运肽融合至玉蜀黍 RuBisCO ssu 的 N-末端的 22 个氨基酸,这 22 个氨基酸进而融合至玉蜀黍 RuBisCO ssu 的转运肽,与其编码序列一起描述于 EP 508 909 A1 中。

[0120] 本发明还涉及转运肽-HPPD 融合蛋白和编码此类融合蛋白的核酸或可在植物中表达的嵌合基因,其中该融合蛋白的两种元件如上文定义。

[0121] 本发明还涉及克隆、转化和/表达载体,所述载体含有如上文定义的至少一种嵌合基因。除了上述嵌合基因之外,该载体可含有复制起点。该载体可以是质粒或质粒的部分、粘粒或噬菌体或病毒(已通过引入根据本发明的嵌合基因而经过了转化)。转化载体可以是技术人员公知的,并且被广为描述于文献中。可以使用的转化载体(特别是用于转化植物细胞或植物的)可以是可用于转化植物细胞或植物并且额外含有其自身复制和表达元件的病毒。根据本发明,用于转化植物细胞或植物的载体优选是质粒,例如卸甲农杆菌属 Ti 质粒。

[0122] 本发明还涉及下述宿主生物,特别是植物细胞、种子或植物,其包含含有编码本发明 HPPD 蛋白(例如如上文定义的包含 SEQ ID Nos 4、5、6 或 7 的氨基酸序列的蛋白)的序列的嵌合基因,以及涉及本发明的植物或种子在田间的用途,以培养作物和收获植物产品,例如豆类物种、稻、小麦、大麦或玉米粒或棉桃,其中在一种实施方式中,所述用途涉及将 HPPD 抑制剂型除草剂应用于这些植物以控制杂草。在本发明的一种实施方式中,在此类用途中,HPPD 抑制剂是三酮类或 pyrazolate,优选为环磺酮、甲基磺草酮、苯吡唑草酮或磺草酮、bicyclopyrone、pyrasulfotole、吡唑特、吡草酮和庄无忌,特别是环磺酮(tembotrione)。

[0123] 因此,本发明涉及下述宿主生物,特别是植物细胞、种子或植物,其特征在于其含有上文所述的至少一种 HPPD 嵌合基因,或者至少含有如前文所述的 HPPD 核酸序列。

[0124] 在一种特别的实施方式中,本发明涉及植物细胞或植物,其特征在于其至少含有下述核酸序列,所述核酸序列编码本发明的 HPPD 蛋白,所述蛋白质保留有其催化对羟苯基丙酮酸到尿黑酸的转化的性质,并且使得该植物较之相同物种但是不包含本发明的此类 HPPD 蛋白的植物而言更为耐受,特别是对三酮类或 pyrazolate (优选为环磺酮、甲基磺草酮、苯吡唑草酮或磺草酮、bicyclopyrone、pyrasulfotole、吡唑特、吡草酮和庄无忌,特别是环磺酮) 耐受,并且含有本发明的 HPPD 的此类植物对 HPPD 抑制剂型除草剂 (特别是对三酮类或 pyrazolate,优选为环磺酮、甲基磺草酮、苯吡唑草酮或磺草酮、bicyclopyrone、pyrasulfotole、吡唑特、吡草酮和庄无忌,特别是环磺酮) 具有农艺学可接受的耐受性。

[0125] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及下述植物细胞或植物,其特征在于,其至少含有编码本发明的 HPPD 的核酸序列,所述 HPPD 保留有其催化对羟苯基丙酮酸到尿黑酸的转化的性质并且较之宿主植物内源 HPPD (例如来自拟南芥的 HPPD,特别是包含 SEQ ID No. 11 的氨基酸序列 (从第 126 位氨基酸至第 568 位氨基酸) 或包含 SEQ ID No. 11 或 SEQ ID No. 12 的氨基酸序列 (从第 134 位氨基酸至第 575 位氨基酸) 的 HPPD) 对 HPPD 抑制剂较不敏感。

[0126] 在一种特别的实施方式中,本发明涉及下述宿主植物细胞、种子或宿主植物,其特征在于其至少含有编码如本文定义的本发明的 HPPD 的核酸序列,其中本发明的 HPPD 较之宿主植物内源 HPPD 对异噁唑类、二酮腈类、三酮类或 pyrazolate 的类别的 HPPD 抑制剂型除草剂 (更尤其地,来自异噁氟草、环磺酮、甲基磺草酮、磺草酮、pyrasulfotole、bicyclopyrone、庄无忌、苯吡唑草酮、2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃ 苯基) 丙-1,3-二酮和 2-氰基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3 Cl₂ 苯基) 丙-1,3-二酮,甚至更特别地,环磺酮、甲基磺草酮、二酮腈类 (diketonitrile)、bicyclopyrone、苯吡唑草酮、吡唑特、吡草酮、磺草酮、庄无忌和 pyrasulfotole,最特别地,环磺酮、甲基磺草酮和 bicyclopyrone) 更不敏感。

[0127] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及下述植物细胞或植物,其特征在于其至少含有编码前文所述的本发明的 HPPD 的核酸序列,以及还含有包含上文所述的可在植物中表达的启动子的嵌合基因,所述启动子与编码 PHD (预苯酸脱氢酶) 酶的核酸序列有效连接 (US 2005/0257283)。

[0128] 本发明还涉及含有经转化的细胞的植物,特别是从经转化的细胞再生的植物,及其后代植物或种子,它们包含本发明的嵌合 HPPD 基因。再生可通过任何合适的方法来获得,所述方法取决于物种的性质,如例如在上述参考文献中描述的。可引用下述专利和专利申请,特别是在转化植物细胞和再生植物的方法方面:US 4,459,355、US 4,536,475、US 5,464,763、US 5,177,010、US 5,187,073、EP 267,159 A1、EP 604 662 A1、EP 672 752A1、US 4,945,050、US 5,036,006、US 5,100,792、US 5,371,014、US 5,478,744、US 5,179,022、US 5,565,346、US 5,484,956、US 5,508,468、US 5,538,877、US 5,554,798、US 5,489,520、US 5,510,318、US 5,204,253、US 5,405,765、EP 442 174 A1、EP 486 233 A1、EP 486 234 A1、EP 539 563 A1、EP 674 725A1、WO 91/02071 和 WO 95/06128。

[0129] 本发明还涉及通过栽培和 / 或杂交上述转基因植物获得的转基因植物或其部分,还涉及转基因植物的种子 (包含本发明的 HPPD 嵌合基因)。

[0130] 本发明还涉及最终产物,例如从本发明的植物、其部分或种子获得的膳食或油。

[0131] 可根据本发明获得的经转化的植物可以是单子叶类型的,例如小麦、大麦、甘蔗、稻、洋葱和玉米或玉蜀黍,或者可以是双子叶类型的,例如烟草、豆类物种、苜蓿、芸苔属物种的植物(例如油菜籽油菜)、棉花、甜菜、三叶草、蔬菜等等。

[0132] 本发明涉及转化宿主生物(特别是植物细胞或植物)的方法,这通过在此类生物中整合上文定义的至少一种核酸序列或一种嵌合基因来进行,其中可通过任何合适的已知方式获得转化,所述方式被详细描述于专门的文献以及特别地,本申请提到的参考文献中,例如通过使用根据本发明的载体来进行。

[0133] 根据本发明的一种转化方法包括用其上联结有 DNA 或含有 DNA 的固体或液体颗粒轰击细胞、原生质体或组织。另一转化方法包括使用嵌合基因作为转入植物的手段,所述嵌合基因被插入进根癌农杆菌 Ti 质粒或发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) Ri 质粒。还可使用其它方法,例如显微注射或电穿孔或使用 PEG 的直接基因转移。技术人员可选择用于转化选择的宿主生物(特别是植物细胞或植物)的任何合适的方法。作为例子,用于大豆转化的技术已被广泛描述于 EP 1186666A1(通过引用并入本文)中公开的实施例 1 至 3 中。对于稻,可进行农杆菌属介导的转化(Hiei 等人,1994 *Plant J* 6:271-282 和 Hiei 等人,1997 *Plant Mol Biol.* 35:205-21,通过引用并入本文)、电穿孔(US 5,641,664 和 US 5,679,558,通过引用并入本文)或轰击(Christou 等人,1991, *Biotechnology* 9:957,通过引用并入本文)。用于转化单子叶植物(特别是稻)的一种合适技术被描述于 W092/09696(通过引用并入本文)中。对于棉花,已经描述了农杆菌属介导的转化(Gould J. H. 和 Magallanes-Cedeno M.,1998 *Plant Molecular Biology reporter*,16:1-10 和 Zapata C.,1999, *Theoretical Applied Genetics*,98(2):1432-2242,通过引用并入本文)、聚凝胺和/或处理介导的转化(Sawahel W. A.,2001, *-Plant Molecular Biology reporter*,19:377a-377f,通过引用并入本文)。

[0134] 在本发明的一种特别的实施方式中,本发明的 HPPD 被靶向进叶绿体。这可通过下述方式来进行:将编码转运肽的核酸序列融合至编码本发明的 HPPD 蛋白的核酸序列,以获得编码上文所述的融合蛋白的核酸。

[0135] 或者,可使用对质体(例如叶绿体基因组)的转化,将本发明的 HPPD 直接表达于质体(例如叶绿体)中。合适的方法包括通过用涂覆有 DNA 的固体颗粒或包含 DNA 的液体颗粒轰击植物细胞或组织,以及通过同源重组整合引入的编码本发明蛋白的基因。合适的载体和选择系统是本领域技术人员已知的。可用于向烟草植物的叶绿体基因组的此类整合的方式和方法的例子被给予 WO 06/108830 中,其内容通过引用并入本文。

[0136] 本发明还涉及用于获得针对 HPPD 抑制剂的植物的方法,其特征在于用如前文所述的本发明的嵌合 HPPD 基因转化植物。

[0137] 因此,本发明还涉及获得对 HPPD 抑制剂耐受的植物的方法,其特征在于,所述植物含有本发明的嵌合 HPPD 基因,所述基因包含编码序列以及位于 5' 以及任选在 3' 位置的能在宿主生物中发挥功能的异源调控元件,其特征在于,所述编码序列至少包含定义编码如前文所述的本发明的 HPPD 的基因的核酸序列。

[0138] 在本发明的一种实施方式中,上述方法中的 HPPD 抑制剂是三酮或 pyrazolate 除草剂,优选为环磺酮、甲基磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌、pyrasulfotole、吡啶特、二酮

腈 (diketonitrile)、吡草酮或磺草酮,特别是环磺酮。

[0139] 根据本发明,还提供了用于获得如上文所述的对 HPPD 抑制剂耐受的植物的方法,其特征在于获得下述植物,所述植物包含是本发明的嵌合 HPPD 基因的第一转基因,以及是包含与编码 PDH(预苯酸脱氢酶) 酶的核酸有效连接的可在植物中表达的启动子的嵌合基因的第二转基因。包含此类两种转基因的植物可这样获得:通过用一种转基因转化植物,然后再用第二转基因重转化该转基因植物,或者通过两种转基因(在相同或两个不同的转化 DNA 或载体中)同时转化植物,或者通过将包含第一转基因的植物与包含第二转基因的植物杂交,这是本领域公知的。

[0140] 本发明还涉及在将栽种植物或将播种种子的田间、或在植物作物中选择性除去杂草或预防杂草发芽的方法,这通过向此类田间或植物作物应用 HPPD 抑制剂,特别是如上文定义的 HPPD 抑制剂型除草剂来实现,所述方法特征在于,将该 HPPD 抑制剂型除草剂应用至已经根据本发明转化过的植物,这在播种作物之前(下文中命名为栽种前应用)、作物出苗之前(下文中命名为出苗前应用)或作物出苗之后(下文中命名为出苗后应用)进行。

[0141] 本发明还涉及在含有如本发明前文所述经转化的种子的区域或田间进行控制的方法,所述方法包括向所述田间的区域应用对于所述杂草来说是毒性的剂量的 HPPD 抑制剂型除草剂,但是对如本发明前文所述含有本发明的 HPPD 核酸或嵌合 HPPD 基因的种子或植物没有显著影响。

[0142] 本发明还涉及栽培已经根据本发明的嵌合基因转化过的植物的方法,所述方法包括在适于栽种所述植物的田间区域栽种包含本发明的嵌合基因的种子,以及如果存在杂草的话,向所述田间的所述区域应用对杂草有毒的剂量的靶标为上文定义的 HPPD 的除草剂,而不显著影响所述经转化的种子或所述经转化的植物,以及然后当栽培的植物或植物部分达到想要的成熟阶段时收获它们,并且如果合适的话,从收获的植物分离种子。

[0143] 在上述方法中,其靶标是 HPPD 酶的除草剂可以根据本发明,在播种作物之前、作物出苗之后或作物出苗之后应用。

[0144] 本发明还涉及获得油(特别是豆类物种、玉米或棉花油或膳食)的工艺,所述工艺包括种植表达本发明的 HPPD 蛋白的作物,特别是豆类物种作物,任选地用 HPPD 抑制剂型除草剂处理此类作物,收获种粒 (grain) 并碾磨种粒以制造膳食和提取油。此外,包含本发明的嵌合基因的种子或种粒(整个的、破裂的或压碎的)也是本发明的一部分。

[0145] 因此,本发明涉及获得油或膳食的方法,所述方法包括种植如上文所述的经转化的植物,任选地,用 HPPD 抑制剂型除草剂处理此类植物,收获种粒,并碾磨种粒,以制造膳食和提取油。

[0146] 本发明中还提供了涉及下述 HPPD 抑制剂型除草剂的上述方法,所述除草剂选自异噁氟草、环磺酮、甲基磺草酮、pyrasulfotole、磺草酮、bicyclopyrone、庄无忌、苯吡唑草酮、2- 氰基 -3- 环丙基 -1-(2- 甲基磺酰基 -4- 三氟甲基苯基)- 丙 -1,3- 二酮和 2- 氰基 -1-[4-(甲基磺酰基)-2- 三氟甲基苯基]-3-(1- 甲基环丙基) 丙 -1,3- 二酮。

[0147] 本文还提供了涉及下述 HPPD 抑制剂型除草剂的上述方法,所述除草剂是三酮类的类别的,例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮,或 pyrazolinate 的类别的,例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮,特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮。

[0148] 在本发明的含义内，“除草剂”被理解为是自身具有除草剂活性的物质，或者与改变其效力的添加剂（例如，增加其活性的物质（协同性物质）或限制其活性的物质（安全剂））组合的物质。当然应当理解，就它们在实践中应用而言，以本身已知的方式将上述除草剂与惯常用于农业化学中的配方佐剂组合。

[0149] HPPD 抑制剂型除草剂（例如三酮类的类别的那些，例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮，或 pyrazolate 的类别的那些，例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮，特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮，更特别地，环磺酮）具有杰出的、针对广谱的经济上重要的单子叶和双子叶一年生有害植物的除草剂活性。活性物质还可高效作用于难以控制的从根茎、木料 (wood stocks) 或其它多年生器官产生枝条的多年生有害植物。

[0150] 本发明因此还涉及在包含根据本发明的 HPPD 的植物作物中控制不想要的植物或用于调控植物生长的方法，其中向植物（例如，有害植物，例如单子叶或双子叶杂草或不想要的作物植物）、向种子（例如种粒、种子或营养繁殖体，例如块茎或具有蓓蕾的枝条部分）或向种植植物的区域（例如栽培下的区域）应用三酮类的类别的（例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮）或 pyrazolate 的类别的（例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮）的一种或多种 HPPD 抑制剂型除草剂，特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮，更特别地，环磺酮。在该上下文中，三酮类的类别的（例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮）或 pyrazolate 的类别的（例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮）的 HPPD 抑制剂型除草剂，特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮，更特别地，环磺酮，可例如栽种前（如果合适的话，还通过掺入土壤中来应用）、出苗前或出苗后应用。可用三酮类的类别的（例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮）或 pyrazolate 的类别的（例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮）的 HPPD 抑制剂型除草剂（特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮，更特别地，环磺酮）控制的单子叶和双子叶杂草的各代表由此被提及，但这种提及并不表示仅限某些物种：

[0151] 下述属的单子叶有害植物：山羊草属 (Aegilops)、冰草属 (Agropyron)、剪股颖属 (Agrostis)、看麦娘属 (Alopecurus)、Apera、燕麦属 (Avena)、臂形草属 (Brachiaria)、雀麦属 (Bromus)、蒺藜草属 (Cenchrus)、鸭跖草属 (Commelina)、狗牙根属 (Cynodon)、莎草属 (Cyperus)、龙爪茅属 (Dactyloctenium)、马唐属 (Digitaria)、稗属 (Echinochloa)、荸荠属 (Eleocharis)、蟋蟀草属 (Eleusine)、画眉草属 (Eragrostis)、野粟属 (Eriochloa)、羊茅属 (Festuca)、飘拂草属 (Fimbristylis)、异蕊花属 (Heteranthera)、白茅属 (Imperata)、鸭嘴草属 (Ischaemum)、千金子属 (Leptochloa)、黑麦草属 (Lolium)、雨久花属 (Monochoria)、粟 (Panicum)、雀稗属 (Paspalum)、藨草属 (Phalaris)、牧梯草属 (Phleum)、早熟禾属 (Poa)、筒轴茅属 (Rottboellia)、慈姑属 (Sagittaria)、蔗草属 (Scirpus)、狗尾草属 (Setaria)、高粱属 (Sorghum)。

[0152] 下述属的双子叶杂草：白麻属 (Abutilon)、苋属 (Amaranthus)、豚草属 (Ambrosia)、Anoda、春黄菊属 (Anthemis)、Aphanes、蒿属 (Artemisia)、滨藜属 (Atriplex)、雏菊属 (Bellis)、鬼针草属 (Bidens)、芥属 (Capsella)、飞廉属 (Carduus)、决明属 (Cassia)、矢车菊属 (Centaurea)、藜属 (Chenopodium)、蓟属 (Cirsium)、旋花属 (Convolvulus)、曼陀罗属 (Datura)、山蚂蝗属 (Desmodium)、Emex、糖芥属 (Erysimum)、大

戟属 (Euphorbia)、鼬瓣花属 (Galeopsis)、牛膝菊属 (Galinsoga)、拉拉藤属 (Galium)、木槿属 (Hibiscus)、蕃薯属 (Ipomoea)、地肤属 (Kochia)、宝盖草属 (Lamium)、独行菜属 (Lepidium)、母草属 (Lindernia)、母菊属 (Matricaria)、薄荷属 (Mentha)、山黧属 (Mercurialis)、粟米草属 (Mullugo)、勿忘我属 (Myosotis)、罂粟属 (Papaver)、牵牛属 (Pharbitis)、车前属 (Plantago)、蓼属 (Polygonum)、马齿苋属 (Portulaca)、毛茛属 (Ranunculus)、萝卜属 (Raphanus)、焯菜属 (Rorippa)、节节菜属 (Rotala)、酸模属 (Rumex)、猪毛菜属 (Salsola)、千里光属 (Senecio)、田菁属 (Sesbania)、黄花稔属 (Sida)、白芥属 (Sinapis)、茄属 (Solanum)、苦苣菜属 (Sonchus)、尖瓣花属 (Sphenoclea)、繁缕属 (Stellaria)、蒲公英属 (Taraxacum)、遏蓝菜属 (Thlaspi)、三叶草属 (Trifolium)、荨麻属 (Urtica)、婆婆纳属 (Veronica)、堇菜属 (Viola)、苍耳属 (Xanthium)。

[0153] 在包含本发明的 HPPD 蛋白、DNA 或嵌合基因并且还可显示出针对不同于 HPPD 抑制剂型除草剂的除草剂的一种其它除草剂抗性的根据本发明的转基因作物中,在有用的植物和观赏植物的经济上重要的转基因作物(例如谷物,例如小麦、大麦、黑麦、燕麦、高粱和粟、稻和玉蜀黍或者甜菜、棉花、豆类物种、油菜籽油菜、马铃薯、西红柿、豌豆的作物和其它蔬菜)中使用三酮类的类别的(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)或 pyrazolinate 的类别的(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮)的 HPPD 抑制剂型除草剂,特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮,是优选的。

[0154] 因为其涉及与本发明所述的对 HPPD 抑制剂型除草剂的耐受性不同的植物性质,产生较之现有植物具有经修饰的性质的新颖的植物的传统途径例如是传统育种方法和产生突变体。或者,具有经修饰的性质的新颖的植物可在重组方法协助下产生(见例如 EP-A-0221044 A1、EP-A-0131624A1)。例如,下述已被描述于若干情况中:

[0155] - 针对修饰在植物中合成的淀粉的目的,对作物植物进行重组修饰(例如 WO 92/11376, WO 92/14827, WO 91/19806)

[0156] - 对某些草铵膦类型(参见例如 EP-A-0242236, EP-A-242246)或草甘膦类型(WO 92/00377)或磺酰脲类型(EP-A-0257993, US-A-5013659)的除草剂具有抗性的转基因作物植物,

[0157] - 转基因作物植物,例如玉米、棉花或豆类物种,其能产生苏云金芽孢杆菌毒素(Bt 毒素),或其杂交体或突变体,这使得植物对某些害虫具有抗性(EP-A-0193259),

[0158] - 转基因作物植物,其具有经修饰的脂肪酸组成(WO 91/13972),

[0159] - 经遗传修饰的作物植物,其具有新颖的组成成分或次级代谢物,例如新颖的植物抗毒素(phytoalexins),这带来了增加的疾病抗性(EPA309862, EPA0464461),

[0160] - 经遗传修饰的植物,其具有降低的光呼吸,其特点为更高的产量和更高的胁迫耐受性(EPA 0305398),

[0161] - 产生药学上重要或诊断上重要的蛋白的转基因作物植物(“分子制药”),

[0162] - 因更高的产量和更高的品质而与众不同的转基因作物植物,

[0163] - 因新颖的性质的组合(例如上述新颖的性质的组合)(“基因堆叠”)而与众不同的转基因作物植物。

[0164] 可用来产生具有经修饰的性质的新颖的转基因植物的大量分子生物学技术原则上是已知的,例如 I. Potrykus 和 G. Spangenberg(编著)Gene Transfer to

Plants, Springer Lab Manual(1995), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 或 Christou, " Trends in Plant Science" 1(1996)423-431)。

[0165] 为进行此类重组操作,可将核酸分子引入质粒,这允许通过对 DNA 序列加以重组来进行诱变或序列修饰。例如,可在标准方法的协助下,进行碱基取代,除去部分 - 序列,或添加天然或合成的序列。为将 DNA 片段互相连接起来,可向片段添加连接物或接头;见,例如 Sambrook 等人,1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 或 Winnacker " Gene und Klone", VCH Weinheim 2. ed., 1996。

[0166] 可例如通过下述方式来产生具有针对基因产物的降低的活性的植物细胞:通过表达至少一种相应的反义 RNA、用于获得共遏制效果的正义 RNA 或者形成双链沉默 RNA 分子 (RNAi) 的反义和正义 RNA 二者的组合,或者通过表达至少一种相应构建的核酶(其特异性切割上述基因产物的转录本)来实现。为实现此,可首先使用包含基因产物的全部编码序列(包括可能存在的任何侧翼序列)的 DNA 分子,或者仅包含编码序列中的部分的 DNA 分子,其中这些部分必须要足够长到能在细胞中带来反义效果。还可使用具有与基因产物的编码序列具有高同源性程度但是并非完全相同的 DNA 序列。

[0167] 当在植物中表达核酸分子时,获得的蛋白可被定位于植物细胞的任何区室。但是,为了实现在特别的区室中的定位,可例如将编码区域与确保在特定区室中定位的 DNA 序列连接起来。此类序列是技术人员已知的(见例如 Braun 等人, EMBO J. 11(1992), 3219-3227; Wolter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(1988), 846-850; Sonnewald 等人, Plant J. 1(1991), 95-106)。但是,核酸分子还可表达于植物细胞的细胞器中。

[0168] 可通过已知的技术来再生转基因植物细胞,以产生完整植物。原则上,转基因植物可以是任何植物物种的植物,包括单子叶或双子叶植物。

[0169] 因此,可获得下述转基因植物,除了具有本发明的嵌合 HPPD 基因之外,所述植物还具有同源(=天然)基因或基因序列的过表达、遏制或抑制或异源(=外来)基因或基因序列的表达导致的经修饰的性质。

[0170] 在本发明的植物、植物细胞或种子上,优选在还对生长调控因子(例如 2,4-D 或麦草畏)或对抑制必要的植物酶(例如乙酰乳酸合酶(ALS)、EPSP 合酶或谷氨酰胺合酶(GS))的除草剂或对来自磺酰脲、草甘膦或草铵膦和类似活性物质的组的除草剂有抗性的转基因作物中使用三酮类的类别的(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)或 pyrazolate 的类别的(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮)的 HPPD 抑制剂型除草剂,特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮。

[0171] 本发明因此还涉及应用到根据本发明的 HPPD 耐受性植物上的除草剂的用途,用于控制有害植物(即杂草),其还延伸至除了包含对三酮类的类别(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)、异噁唑类的类别(例如异噁氟草)或 pyrazolate 的类别(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮)的 HPPD 抑制剂型除草剂(特别地,选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮)的抗性之外还包含第二或更多种除草剂抗性的转基因作物植物。

[0172] 三酮类的类别的(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)或 pyrazolate 的类别的(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮)的 HPPD 抑制剂型除草剂,特别地选自环磺酮、磺草

酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮,可用于可润湿粉末、可乳化浓缩物、可喷雾溶液、粉剂(dusts)或颗粒剂形式的惯常制剂。

[0173] 取决于主要生物和/或物理化学参数,可以以多种途径来配制三酮类的类别的(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)或pyrazolinate的类别的(例如pyrasulfotole和苯吡唑草酮)的HPPD抑制剂型除草剂,特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮。可能的制剂的例子是可湿性粉(WP)、水溶性粉(SP)、水溶性浓缩物、可乳化浓缩物(EC)、乳剂(EW)(例如水包油或油包水的乳剂)、可喷雾溶液、悬浮浓缩物(SC)、基于油或水的分散液、混合油剂溶液、胶囊悬浮液(CS)、粉剂(DP)、拌种(seed dressing)产品、通过播种和在土壤上使用的颗粒剂、微颗粒形式的颗粒剂(GR)、喷雾颗粒体、包被的颗粒剂和吸附颗粒剂、水分散颗粒剂(WG)、水溶性颗粒剂(SG)、ULV制剂、微胶囊和蜡。

[0174] 上述各个制剂类型原则上是已知的,并在例如Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology],第7卷,C. Hanser Verlag Munich,第4版.1986; Wade van Valkenburg, "Pesticide Formulations", Marcel Dekker, N. Y., 1973; K. Martens, "Spray Drying" Handbook,第3版.1979, G. Goodwin Ltd. London 中描述。

[0175] 需要的制剂辅助剂,例如惰性材料、表面活性剂、溶剂和其他添加剂也是已知的并在例如Watkins, "Handbook of Insecticide Dust Diluents and Carriers",第2版, Darland Books, Caldwell N. J., H. v. Olphen, "Introduction to Clay Colloid Chemistry";第2版, J. Wiley & Sons, N. Y.; C. Marsden, "Solvents Guide";第2版, Interscience, N. Y. 1963; McCutcheon's "Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publ. Corp., Ridgewood N. J.; Sisley 和 Wood, "Encyclopedia of Surface Active Agents", Chem. Publ. Co. Inc., N. Y. 1964; **Schönfeldt, "Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte"** [Interface-active ethylene oxide adducts], Wiss. Verlagsgesell., Stuttgart 1976; Winnacker-Küchler, "Chemische Technologie" [Chemical technology],第7卷,C. Hanser Verlag Munich,第4版1986中描述。

[0176] 基于这些制剂,可与其他杀虫活性物质比如,例如杀虫剂、杀螨剂、除草剂、杀真菌剂以及与安全剂、肥料和/或生长调控因子组合制备,例如以预混(ready mix)或罐混(tank mix)的形式。

[0177] 可湿性粉是在可在水中均匀分散的制剂,并且其除了活性物质,也包含离子和/或非离子表面活性剂(湿润剂、分散剂),例如除了稀释剂或惰性物质,包含聚氧乙烯化的烷基酚、聚氧乙烯化的脂肪醇、聚氧乙烯化的脂肪胺、脂肪醇聚乙二醇醚硫酸盐、烷烃磺酸盐、烷基苯磺酸盐、木质素磺酸钠、2,2'-二萘基甲烷-6,6'-二磺酸钠、二丁基萘磺酸钠或油酰基甲基牛磺酸钠。为了制备可润性粉,除草活性物质被精细碾磨,例如在惯常仪器如锤式粉碎机、鼓风粉碎机和喷射粉碎机中,并与制剂辅助剂同时或随后混合。

[0178] 可乳化浓缩物是通过将活性物质溶解在有机溶剂(例如丁醇、环己烷、二甲基甲酰胺、二甲苯或其他高沸点芳香族或烃,或者有机溶剂的混合物)中然后添加一种或多种离子和/或非离子表面活性剂(乳化剂)来制备的。可使用的乳化剂的实例是:烷基芳基磺酸钙例如十二烷基苯磺酸钙,或非离子乳化剂例如脂肪酸聚乙二醇酯、烷基芳基聚乙二

醇醚、脂肪醇聚乙二醇醚、环氧丙烷 / 环氧乙烷缩合物、烷基聚醚、山梨聚糖酯比如, 例如山梨聚糖脂肪酸酯或聚氧乙烯山梨聚糖酯比如, 例如聚氧乙烯山梨聚糖脂肪酸酯。

[0179] 粉剂是通过用精细分割的固体材料 (比如, 例如滑石、天然粘土例如高岭土、皂土和叶蜡石或硅藻土) 碾磨活性物质获得的。

[0180] 悬浮浓缩物可以是基于水或基于油的。它们可以通过例如市售球磨机的方法湿磨制备, 如果适当, 添加例如上文已经在其他制剂类型中列出的表面活性剂。

[0181] 乳剂, 例如水包油的乳剂 (EW) 可以通过例如搅拌器、胶体磨和 / 或静态混合器的方法用水性有机溶剂制备, 如果适当, 添加例如上文已经在其他制剂类型中列出的表面活性剂。

[0182] 可以通过将活性物质喷雾到吸附性的、颗粒化的惰性材料上, 或者在粘合剂 (例如聚乙烯醇、聚丙烯酸钠或矿物油) 的帮助下将活性物质浓缩物施用于载体 (例如沙、高岭土或颗粒化的惰性材料) 表面来制备颗粒剂。适当的活性物质也能够以惯常用于生产肥料颗粒的方法颗粒化, 如果需要, 作为与肥料的混合物。

[0183] 水分散颗粒剂通常是通过惯常方法 (例如喷雾干燥、流化床造粒、圆盘造粒、用高速搅拌器混合以及在无固体惰性材料下挤压) 制备的。

[0184] 为制备圆盘颗粒、流化床颗粒、挤压颗粒和喷雾颗粒, 参见例如 " Spray-Drying Handbook " 第 3 版 1979, G. Goodwin Ltd., London ; J. E. Browning, " Agglomeration " , Chemical and Engineering 1967, 第 147 页及以下等 . ; " Perry ' s Chemical Engineer ' s Handbook " , 第 5 版, McGraw-Hill, New York 1973, 第 8-57 页中的方法。

[0185] 关于作物保护产品制剂的进一步详情, 参见例如 G. C. Klingman, " Weed Control as a Science " , John Wiley and Sons, Inc., New York, 1961, 第 81-96 页和 J. D. Freyer, S. A. Evans, " Weed Control Handbook " , 第 5 版, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1968, 第 101-103 页。

[0186] 通常, 农业化学制剂包含按重量计从 0.1% 至 99%, 特别是按重量计从 0.1% 至 95% 的根据本发明的化合物。在可湿性粉中, 活性物质浓度是, 例如按重量计约 10 至 90%, 按重量计、到 100% 的其余部分由惯常制剂组分组成。在可乳化浓缩物的情况下, 活性物质浓度按重量计可总计约 1 至 90, 优选地 5 至 80%。粉剂形式的制剂包含按重量计从 1 至 30% 的活性物质, 优选地在大多数情况下为按重量计从 5 至 20% 的活性物质, 可喷雾溶液包含按重量计约从 0.05 至 80, 优选地从 2 至 50% 的活性物质。在水分散颗粒剂的情况下, 活性物质含量部分取决于活性化合物是液体或是固体形式, 以及使用的造粒辅助剂、填充剂等。例如在水分散颗粒剂的情况下, 活性物质含量在按重量计 1 至 95% 之间, 优选地按重量计 10 至 80% 之间。

[0187] 此外, 如果适当, 所述活性物质制剂包含每种情况下常规的辅助剂, 例如粘合剂、湿润剂、分散剂、乳化剂、渗透剂、防腐剂、防冻剂、溶剂、填充剂、载体、着色剂、消泡剂、蒸发抑制剂以及 pH 和粘度调节剂。

[0188] 基于这些制剂, 还可制备三酮类的类别的 (例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮) 或 pyrazolines 的类别的 (例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮) 的 HPPD 抑制剂型除草剂 (特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮, 更特别地, 环磺酮) 与其它杀虫活性物质 (例如杀昆虫剂、杀螨剂、除草剂、杀真菌剂) 以及与安全

剂、肥料和 / 或生长调控因子的组合,例如以将应用到根据本发明的 HPPD 耐受性植物上的预混剂或罐混剂的形式。

[0189] 在混合的制剂或者在罐混剂中,可与三酮类的类别的(例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮)或 pyrazolinate 的类别的(例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮)的 HPPD 抑制剂型除草剂(特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮,更特别地,环磺酮)组合应用至根据本发明的 HPPD 耐受性植物的活性物质是,例如,基于对乙酰乳酸核酶、乙酰 -CoA 羧化酶、纤维素合酶、烯醇式丙酮莽草酸 -3- 磷酸合酶(enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)、谷氨酰胺合成酶、对羟苯基丙酮酸双加氧酶、八氢番茄红素去饱和酶、光合体系 I、光合体系 II、原卟啉原氧化酶的抑制的已知活性物质,如例如 Weed Research 26(1986)441-445 或" The Pesticide Manual", 14 版, The British Crop Protection Council and the Royal Soc. of Chemistry, 2003 和其中引用的文献中所述。可与根据本发明的化合物组合的已知除草剂或植物生长调控因子是,例如,下述活性物质(根据 International Organization for Standardization(ISO) 通过通用名命名的或通过化学名命名的化合物,如果合适的话,与编号一起),并且总是包含所有使用形式,例如酸、盐、酯和异构体,例如立体异构体和光学异构体。在本文上下文中,通过举例的方式提到了一种以及在某些情况下若干种使用形式:

[0190] 乙草胺(acetochlor)、阿拉酸式苯(acibenzolar)、阿拉酸式苯 -S- 甲基、三氟羧草醚(acifluorfen)、三氟羧草醚钠(acifluorfen-sodium)、苯草醚(aclonifen)、甲草胺(alachlor)、二丙烯草胺(allidochlor)、禾草灭(alloxydim)、禾草灭钠(alloxydim-sodium)、莠灭净(amestryne)、氨基唑草酮(amicarbazone)、先甲草胺(amidochlor)、酰胺磺隆(amidosulfuron)、aminocyclopyrachlor、aminopyralid、杀草强(amitrole)、氨基磺酸铵(ammonium sulfamate)、环丙嘧啶醇(ancymidol)、莎稗磷(anilofos)、黄草灵(asulam)、阿特拉津(atrazine)、啞啶炔草(azafenidin)、四啞啶磺隆(azimsulfuron)、叠氮津(aziprotryne)、BAH-043、BAS-140H、BAS-693H、BAS-714H、BAS-762H、BAS-776H、BAS-800H、氟丁酰草胺(beflubutamid)、草除灵(benazolin)、乙基草除灵(benazolin-ethyl)、bencarbazone、氟草胺(benfluralin)、呋草黄(benfuresate)、地散磷(bensulide)、甲基苄嘧磺隆(bensulfuron-methyl)、苯达松(bentazone)、双苯嘧草酮(benzfendizone)、双环磺草酮(benzobicyclon)、吡草酮(benzofenap)、氟磺胺草(benzofluor)、benzoylprop、甲羧除草醚(bifenox)、双丙氨酰膦(bilanafos)、双丙氨酰膦钠盐(bilanafos-sodium)、双嘧苯甲酸(bispyribac)、双嘧苯甲酸钠盐(bispyribac-sodium)、除草定(bromacil)、溴丁酰草胺(bromobutide)、溴酚肟(bromofenoxim)、溴苯腈(bromoxynil)、bromuron、buminafos、羟草酮(busoxinone)、丁草胺(butachlor)、氟丙嘧草酯(butafenacil)、抑草磷(butamifos)、丁烯草胺(butenachlor)、仲丁灵(butralin)、丁氧环酮(butroxydim)、丁草敌(butylate)、啞草胺(cafenstrole)、双酰草胺(carbetamide)、啞草酮(carfentrazone)、啞酮草乙酯(carfentrazone-ethyl)、甲氧除草醚(chlomethoxyfen)、草灭平(chloramben)、chlorazifop、chlorazifop-butyl、氯溴隆(chlorbromuron)、氯草灵(chlorbufam)、伐草克(chlorfenac)、伐草克钠(chlorfenac-sodium)、燕麦酯(chlorfenprop)、整形醇(chlorflurenol)、甲基整形醇(chlorflurenol-methyl)、氯草敏(chloridazon)、氯嘧磺

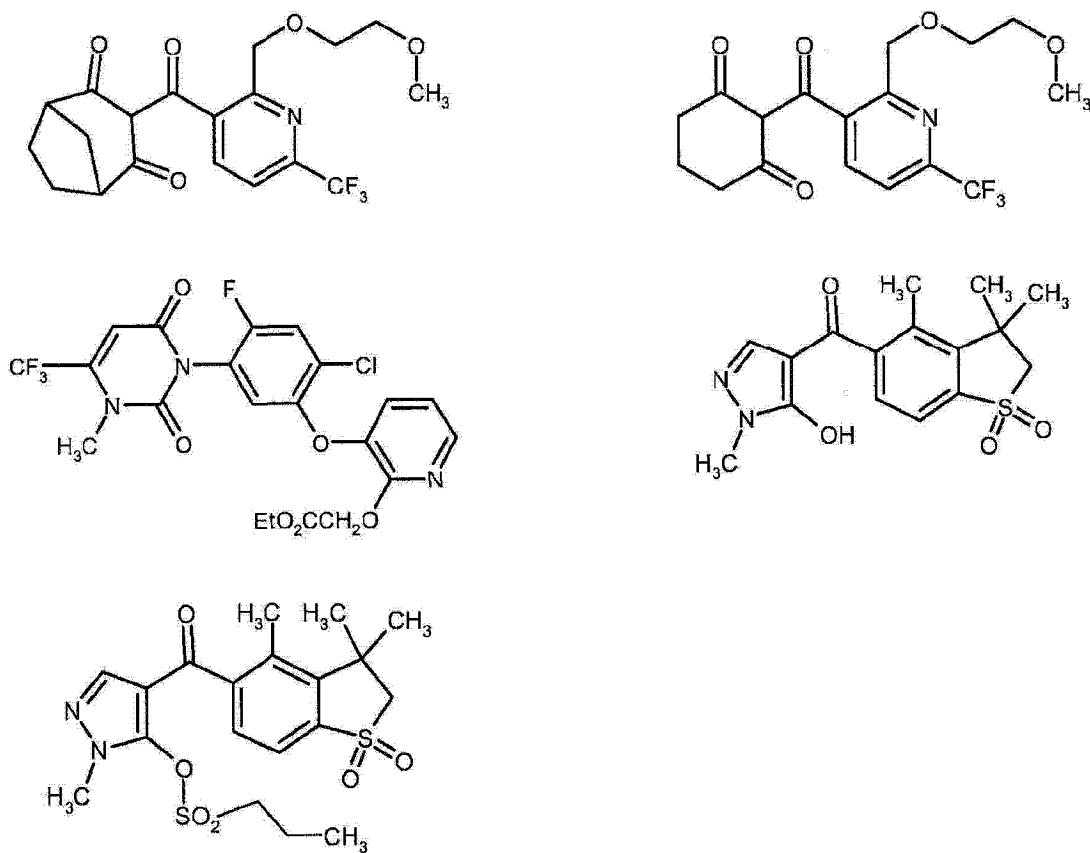
隆 (chlorimuron)、氯嘧磺隆乙酯 (chlorimuron-ethyl)、矮壮素 (chlormequat-chloride)、草枯醚 (chlornitrofen)、chlorophthalim, 敌草索二甲酯 (chlorthal-dimethyl)、绿麦隆 (chlorotoluron)、氯磺隆 (chlorsulfuron)、cinidon、吡啶酮草酯 (cinidon-ethyl)、环庚草醚 (cinmethylin)、醚磺隆 (cinosulfuron)、烯草酮 (clethodim)、炔草酸 (clodinafop)、炔草酯 (clodinafop-propargyl)、苯哒嗪 (clofencet)、广灭灵 (clomazone)、氯甲酸草胺 (clomeprop)、调果酸 (cloprop)、克草立特 (clopyralid)、cloransulam、cloransulam-methyl、苜草隆 (cumyluron)、氨基氰 (cyanamide)、氰草津 (cyanazine)、环丙酸酰胺 (cyclanilide)、草灭特 (cycloate)、环磺隆 (cyclosulfamuron)、噻草酮 (cycloxydim)、环莠隆 (cycluron)、cyhalofop、氰氟草酯 (cyhalofop-butyl)、牧草快 (cyperquat)、环丙津 (cyprazine)、三环塞草胺 (cyprazole)、2,4-D、2,4-DB、杀草隆 (daimuron/dymron)、茅草枯 (dalapon)、丁酰肼 (daminozide)、棉隆 (dazomet)、正癸醇 (n-decanol)、甜菜安 (desmedipham)、敌草净 (desmetryn)、detosyl-pyrazolate (DTP)、燕麦敌 (di-allate)、麦草畏 (dicamba)、敌草腈 (dichlobenil)、滴丙酸 (dichlorprop)、2,4-滴丙酸 (dichlorprop-P)、二氯苯氧基丙酸 (diclofop)、禾草灵 (diclofop-methyl)、二氯苯氧基丙酸-P-甲基 (diclofop-P-methyl)、双氯磺草安 (diclosulam)、diethatyl、乙酰甲草胺 (diethatyl-ethyl)、枯莠隆 (difenoxuron)、野燕枯 (difenzoquat)、吡氟草胺 (diflufenican)、二氟吡隆 (diflufenzopyr)、二氟吡隆钠 (diflufenzopyr-sodium)、恶唑隆 (dimefuron)、敌草克 (dikegulac-sodium)、恶唑隆、哌草丹 (dimepiperate)、二甲草胺 (dimethachlor)、异戊乙净 (dimethametryn)、二甲噻草胺 (dimethenamid)、二甲噻草胺-P (dimethenamid-P)、噻节因 (dimethipin)、醚磺隆 (dimetrasulfuron)、氨基氟灵 (dinitramine)、达诺杀 (dinoseb)、特乐酚 (dinoterb)、草乃敌 (diphenamid)、异丙净 (dipropetryn)、敌草快 (diquat)、敌草快二溴化物 (diquat-dibromide)、氟硫草定 (dithiopyr)、敌草隆 (diuron)、二硝酚 (DNOC)、eglinazine-ethyl、茵多酸 (endothal)、茵草敌 (EPTC)、禾草畏 (esprocarb)、乙丁烯氟灵 (ethalfluralin)、甲基胺苯磺隆 (ethametsulfuron-methyl)、乙烯利 (ethephon)、磺噻隆 (ethidimuron)、乙嗪草酮 (ethiozin)、乙氧呋草黄 (ethofumesate)、氯氟草醚 (ethoxyfen)、氯氟苯醚 (ethoxyfen-ethyl)、乙氧嘧磺隆 (ethoxysulfuron)、etobenzanid、F-5331 即 N-[2-氯-4-氟-5-[4-(3-氟-丙基)-4,5-二氢-5-氧-1H-四唑-1-基]-苯基]乙基磺酰胺、涕丙酸 (fenoprop)、恶唑禾草灵 (fenoxaprop)、恶唑禾草灵-P、恶唑禾草灵乙酯 (fenoxaprop-ethyl)、精恶唑禾草灵乙酯 (fenoxaprop-P-ethyl)、四唑酰草胺 (fentrazamide)、非草隆 (fenuron)、麦草伏 (flamprop)、高效麦草伏异丙酯 (flamprop-M-isopropyl)、高效麦草伏甲酯 (flamprop-M-methyl)、啶嘧磺隆 (flazasulfuron)、双氟磺草胺 (florasulam)、吡氟乐草灵 (fluazifop)、吡氟乐草灵-P (fluazifop-P)、吡氟禾草灵 (fluazifop-butyl)、精吡氟禾草灵 (fluazifop-P-butyl)、异丙吡草酯 (fluazolate)、氟唑磺隆 (flucarbazone)、氟唑磺隆钠 (flucarbazone-sodium)、氟吡磺隆 (flucetosulfuron)、氯乙氟灵 (fluchloralin)、氟噻草胺 (flufenacet(thiaflumamide))、氟哒嗪 (flufenpyr)、氟哒嗪乙酯 (flufenpyr-ethyl)、氟节胺 (flumetralin)、唑嘧磺草胺 (flumetsulam)、flumiclorac、flumiclorac-pentyl、丙炔氟草胺 (flumioxazin)、flumipropyn、伏草隆 (fluometuron)、

三氟硝草醚 (fluorodifen)、氟草醚 (fluoroglycofen)、乙羧氟草醚 (fluoroglycofen-ethyl)、氟胺草啞 (flupoxam)、fluproacil、四氟丙酸 (flupropanate)、氟啶嘧磺隆 (flupyrsulfuron)、氟啶嘧磺隆-甲基-钠、抑草丁 (flurenol)、丁基抑草丁 (flurenol-butyl)、氟啶草酮 (fluridone)、氟草吡酮 (flurochloridone)、氟草烟 (fluroxypyr)、氯氟吡氧乙酸 (fluroxypyr-meptyl)、咪嘧啉醇 (flurprimidol)、咪草酮 (flurtamone)、嗪草酸 (fluthiacet)、嗪草酸甲酯 (fluthiacet-methyl)、氟啞草胺 (fluthiamide)、氟磺胺草醚 (fomesafen)、甲酰胺磺隆 (foramsulfuron)、调吡脲 (forchlorfenuron)、杀木膦 (fosamine)、呋氧草醚 (furyloxyfen)、赤霉烯酸 (gibberellic acid)、草铵膦 (glufosinate)、L-草铵膦 (L-glufosinate)、L-固杀草 (L-glufosinate-ammonium)、固杀草 (glufosinate-ammonium)、草甘膦 (glyphosate)、草甘膦异丙基铵 (glyphosate-isopropylammonium)、H-9201、halosafen、吡氯黄隆 (halosulfuron)、吡氯黄隆-甲基 (halosulfuron-methyl)、吡氟氯禾灵 (haloxyfop)、吡氟氯禾灵-P (haloxyfop-P)、吡氟氯禾灵-乙氧乙基 (haloxyfop-ethoxyethyl)、吡氟氯禾灵-P-乙氧乙基 (haloxyfop-P-ethoxyethyl)、吡氟氯禾灵-甲基 (haloxyfop-methyl)、吡氟氯禾灵-P-甲基 (haloxyfop-P-methyl)、环嗪酮 (hexazinone)、HNPC-9908、HOK-201、HW-02、咪草酸 (imazamethabenz)、咪草甲酯 (imazamethabenz-methyl)、甲氧咪 (imazamox)、甲咪唑烟酸 (imazapic)、灭草烟 (imazapyr)、灭草啞 (imazaquin)、咪草烟 (imazethapyr)、啞吡嘧磺隆 (imazosulfuron)、抗倒胺 (inabenfide)、茛草酮 (indanofan)、吲哚基醋酸 (indoleacetic acid) (IAA)、4-吲哚-3-基丁酸 (IBA)、碘磺隆 (iodosulfuron)、甲基碘磺隆钠 (iodosulfuron-methyl-sodium)、碘苯腈 (ioxynil)、草特灵 (isocarbamid)、异丙乐灵 (isopropalin)、异丙隆 (isoproturon)、异恶隆 (isouron)、异恶啞草胺 (isoxaben)、异恶氯草酮 (isoxachlortole)、异恶氟草、恶草醚 (isoxapyrifop)、KUH-043、KUH-071、隆草特 (karbutilate)、ketospiradox、乳氟乐草灵 (lactofen)、环草定 (lenacil)、利谷隆 (linuron)、马来酰肼 (maleic hydrazide)、MCPA、MCPB、MCPB-甲基、MCPB-乙基和 MCPB-钠、mecoprop、mecoprop-sodium、mecoprop-butotyl、mecoprop-P-butotyl、mecoprop-P-二甲基铵、mecoprop-P-2-乙基己基、mecoprop-P-钾、苯噻草胺 (mefenacet)、氟磺啞草胺 (mefluidide)、缩节胺 (mepiquat-chloride)、磺胺磺隆 (mesosulfuron)、甲磺胺磺隆 (mesosulfuron-methyl)、甲基苯噻隆 (methabenzthiazuron)、威百亩 (metam)、恶啞啞草胺 (metamifop)、苯嗪草酮 (metamitron)、吡啞草胺 (metazachlor)、灭草定 (methazole)、去草酮 (methoxyphenone)、甲基杀草隆 (methyldymron)、1-甲基-环丙烯、甲基异硫氰酸盐 (methyl isothiocyanate)、吡喃隆 (metobenzuron)、吡喃隆、溴谷隆 (metobromuron)、异丙甲草胺 (metolachlor)、S-异丙甲草胺 (S-metolachlor)、磺草啞胺 (metosulam)、甲氧隆 (metoxuron)、嗪草酮 (metribuzin)、磺隆 (metsulfuron)、甲磺隆 (metsulfuron-methyl)、草达灭 (molinate)、庚啞草胺 (monalide)、monocarbamide、monocarbamide 二氢硫酸盐、绿谷隆 (monolinuron)、单嘧磺隆 (monosulfuron)、灭草隆 (monuron)、MT 128、MT-5950 即 N-[3-氯-4-(1-甲基乙基)-苯基]-2-甲基戊酰胺、NGGC-011、萘丙胺 (naproanilide)、敌草胺 (napropamide)、萘草胺 (naptalam)、NC-310 即 4-(2,4-二氯苯甲酰基)-1-甲基-5-苄基氧吡啞、草不隆 (neburon)、烟嘧磺隆 (nicosulfuron)、氟氯草胺 (nipyraclufen)、甲磺

乐灵 (nitralin)、除草醚 (nitrofen)、硝酚钠 (nitrophenolat-sodium) (异构混合体)、三氟甲草醚 (nitrofluorfen)、正壬酸 (nonanoic acid)、氟草敏 (norflurazon)、拦草净 (orbencarb)、噻苯胺磺隆 (orthosulfamuron)、氨磺乐灵 (oryzalin)、农思它 (oxadiargyl)、恶草灵 (oxadiazon)、环氧噻磺隆 (oxasulfuron)、恶嗪草酮 (oxaziclomefone)、乙氧氟草醚 (oxyfluorfen)、paclobutrazole、百草枯 (paraquat)、百草枯二氯化物 (paraquat dichloride)、正壬酸 (pelargonic acid(nonanoic acid))、二甲戊乐灵 (pendimethalin)、pendralin、五氟磺草胺 (penoxsulam)、甲氯酰草胺 (pentanochlor)、环戊恶草酮 (pentoxazone)、黄草伏 (perfluidone)、烯草胺 (pethoxamid)、棉胺宁 (phenisopham)、苯敌草 (phenmedipham)、苯敌草-乙酯 (phenmedipham-ethyl)、毒莠定 (picloram)、氟吡酰草胺 (picolinafen)、唑啉草酯 (pinoxaden)、哌草磷 (piperophos)、pirifenop、pirifenop-丁基、丙草胺 (pretilachlor)、氟噻磺隆 (primisulfuron)、甲基氟噻磺隆 (primisulfuron-methyl)、噻菌灵 (probenazole)、氟唑草胺 (profluazol)、环丙腈津 (procyazine)、氨氟乐灵 (prodiamine)、prifluraline、环笨草酮 (profoxydim)、调环酸 (prohexadione)、调环酸钙 (prohexadione-calcium)、prohydrojasnone、扑灭通 (prometon)、扑草净 (prometryn)、毒草胺 (propachlor)、敌稗 (propanil)、恶草酸 (propaquizafop)、扑灭津 (propazine)、苯胺灵 (propham)、异丙草胺 (propisochlor)、丙苯磺隆 (propoxycarbazone)、丙苯磺隆钠 (propoxycarbazone-sodium)、炔苯酰草胺 (propyzamide)、甲硫磺乐灵 (prosulfalin)、苜草丹 (prosulfocarb)、氟磺隆 (prosulfuron)、丙炔草胺 (prynachlor)、双唑草腈 (pyraclonil)、吡草醚 (pyraflufen)、吡草醚-乙基 (pyraflufen-ethyl)、吡唑特 (pyrazolynate, pyrazolate)、吡嘧黄隆 (pyrazosulfuron-ethyl)、苜草唑、pyribambenz、pyribambenz-异丙基、嘧啶脞草醚 (pyribenzoxim)、稗草丹 (pyributicarb)、pyridafol、吡草特 (pyridate)、环酯草醚 (pyriftalid)、噻草醚 (pyriminobac)、甲基噻草醚 (pyriminobac-methyl)、pyrimisulfan、噻草硫醚 (pyrithiobac)、噻草硫醚钠 (pyrithiobac-sodium)、pyroxasulfone、甲氧磺草胺 (pyroxsulam)、二氯喹啉酸 (quinclorac)、氯甲喹啉酸 (quinmerac)、灭藻醌 (quinoclamine)、精喹禾灵 (quizalofop)、精喹禾灵-乙基 (quizalofop-ethyl)、精喹禾灵-P (quizalofop-P)、精喹禾灵-P-乙基 (quizalofop-P-ethyl)、喹禾糠酯 (quizalofop-P-tefuryl)、砒嘧磺隆 (rimsulfuron)、苯噻磺草胺 (saflufenacil)、密草通 (secbumeton)、稀禾定 (sethoxydim)、环草隆 (siduron)、西玛津 (simazine)、西草净 (simeetryn)、SN-106279、sulf-allate(CDEC)、甲磺草胺 (sulfentrazone)、噻磺隆 (sulfometuron)、甲噻磺隆 (sulfometuron-methyl)、草硫膦 (sulfosate)(草甘膦-trimesium)、磺酰磺隆 (sulfosulfuron)、SYN-523、SYP-249、SYP-298、SYP-300、牧草胺 (tebutam)、丁噻隆 (tebuthiuron)、四氯硝基苯 (tecnazene)、吡喃草酮 (tepraloxym)、特草定 (terbacil)、特草灵 (terbucarb)、特丁草胺 (terbuchlor)、特丁通 (terbumeton)、特丁津 (terbuthylazine)、特丁净 (terbutryne)、TH-547、甲氧噻草胺 (thenylchlor)、thiafluamide、噻氟隆 (thiazafluron)、噻草啶 (thiazopyr)、噻二唑草胺 (thidiazimin)、噻苯隆 (thidiazuron)、酮脲磺草胺 (thiencarbazone)、酮脲磺草胺甲酯 (thiencarbazone-methyl)、噻磺隆 (thifensulfuron)、噻吩磺隆-甲基

(thifensulfuron-methyl)、禾草丹 (thiobencarb)、仲草丹 (tiocarbazil)、甲黄隆对 (tralkoxydim)、野麦畏 (tri-allate)、醚苯磺隆 (triasulfuron)、三嗪氟草胺 (triaziflam)、triazofenamide、苯磺隆 (tribenuron)、苯磺隆-甲基 (tribenuron-methyl)、三氯乙酸 (trichloroacetic acid) (TCA)、绿草定 (triclopyr)、灭草环 (tridiphane)、草达津 (trietazine)、三氟啶磺隆 (trifloxysulfuron)、三氟啶磺隆钠 (trifloxysulfuron-sodium)、氟乐灵 (trifluralin)、triflusulfuron、氟胺磺隆-甲基 (triflusulfuron-methyl)、三甲隆 (trimeturon)、trinexapac、抗倒酯 (trinexapac-ethyl)、三氟甲磺隆 (tritosulfuron)、tsitodef、烯效唑 (uniconazole)、烯效唑-P (uniconazole-P)、灭草敌 (vernolate)、ZJ-0166、ZJ-0270、ZJ-0543、ZJ-0862 和下述化合物

[0191]



[0192] 将要被应用到种植了根据本发明的 HPPD 耐受性植物的区域的、三酮类的类别的 (例如环磺酮、磺草酮和甲基磺草酮) 或 pyrazolines 的类别的 (例如 pyrasulfotole 和苯吡唑草酮) 的 HPPD 抑制剂型除草剂 (特别地选自环磺酮、磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和甲基磺草酮, 更特别地, 环磺酮) 所需的应用速率作为外部条件 (例如温度、湿度、使用的除草剂的性质等等) 的函数变动。其可在宽的限度内变动, 例如 0.001 至 1.0kg/公顷及更多的活性物质, 但是其优选在 0.005 至 750g/公顷之间。

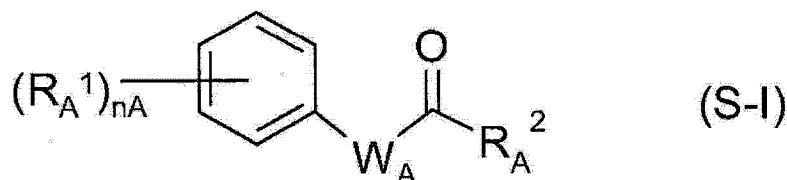
[0193] 在 HPPD 抑制剂型除草剂与不同于 HPPD 抑制剂型除草剂的除草剂组合应用到根据本发明的 HPPD 耐受性植物的情况下, 这些化合物可导致作物损伤 (基于非 HPPD 抑制剂型除草剂的存在)。为降低 / 除掉此类作物损伤, 可添加合适的安全剂。这些以解毒

(antidotically) 活性量使用的安全剂降低了例如,在经济上重要的作物中所用的除草剂/杀虫剂的植物毒性副作用,所述作物为例如谷物(小麦、大麦、黑麦、玉米、稻、粟)、苜蓿、甜菜、甘蔗、油菜籽油菜、棉花和豆类物种中,优选地,在玉米、棉花、甜菜或豆类物种中。

[0194] 安全剂优选选自下述物质构成的组:

[0195] A) 式 (S-I) 的化合物

[0196]



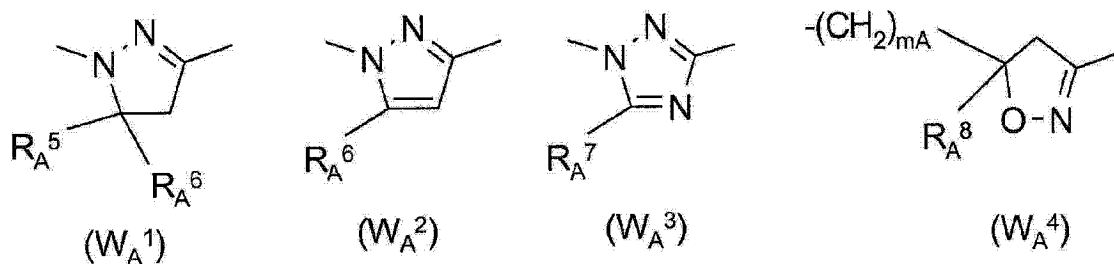
[0197] 其中符号和指数具有下述含义:

[0198] n_A 是 0 至 5 的自然数,优选地,0 至 3;

[0199] R_A^1 是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、硝基或 (C_1-C_4) -卤代烷基;

[0200] W_A 是未经取代的或经取代的二价杂环基团,其选自部分不饱和的或芳香族的、具有 1 至 3 个 N 或 O 型的杂环原子的五元杂环构成的组,其中环中存在至少一个氮原子和至多一个氧原子,优选地,是选自 (W_A^1) 至 (W_A^4) 构成的组的基团,

[0201]



[0202] m_A 是 0 或 1;

[0203] R_A^2 是 OR_A^3 、 SR_A^3 或 $NR_A^3R_A^4$ 或饱和或不饱和的 3 至 7 元的、具有至少一个氮原子和至多 3 个杂原子(优选来自 O 和 S 构成的组)的杂环,其经由氮原子与 (S-I) 中的羰基联结,未经取代或被选自 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基和任选经取代的苯基构成的组的基团(优选地,式 OR_A^3 、 NHR_A^4 或 $N(CH_3)_2$ 的基团,特别是式 OR_A^3 的基团)取代;

[0204] R_A^3 是氢或未经取代或经取代的脂肪烃基团,其具有优选总共 1 至 18 个碳原子;

[0205] R_A^4 是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_1-C_6) -烷氧基或经取代的或未经取代的苯基;

[0206] R_A^5 是 H、 (C_1-C_8) -烷基、 (C_1-C_8) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基- (C_1-C_8) -烷基、氰基或 $COOR_A^9$,其中 R_A^9 是氢、 (C_1-C_8) -烷基、 (C_1-C_8) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基- (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_6) -羟基烷基、 (C_3-C_{12}) -环烷基或三- (C_1-C_4) -烷基甲硅烷基;

[0207] R_A^6 、 R_A^7 、 R_A^8 相同或不同,并且是氢、 (C_1-C_8) -烷基、 (C_1-C_8) -卤代烷基、 (C_3-C_{12}) -环烷基或经取代的或未经取代的苯基;

[0208] 优选地:

[0209] a) 二氯苯基吡唑啉-3-羧酸的类型化合物,优选地,下述化合物,例如 1-(2,4-二氯苯基)-5-(乙氧基羰基)-5-甲基-2-吡唑啉-3-羧酸乙酯 (S1-1) (“吡咯二酸二酯”,见 Pestic. Man.) 以及相关化合物,如 WO 91/07874 中描述的;

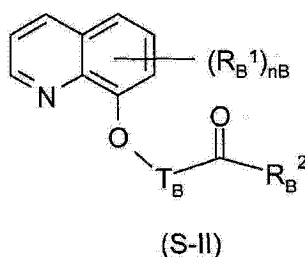
[0210] b) 二氯苯基吡唑羧酸的衍生物, 优选下述化合物, 例如, 1-(2,4-二氯苯基)-5-甲基吡唑-3-羧酸乙酯 (S1-2)、1-(2,4-二氯苯基)-5-异丙基吡唑-3-羧酸乙酯 (S1-3)、1-(2,4-二氯苯基)-5-(1,1-二甲基乙基)吡唑-3-羧酸乙酯 (S1-4)、1-(2,4-二氯苯基)-5-苯基吡唑-3-羧酸乙酯 (S1-5) 和相关化合物, 如 EP-A-333 131 和 EP-A-269 806 中描述的;

[0211] c) 三唑羧酸类型的化合物, 优选地, 下述化合物, 例如, 解草唑(-乙酯), 即 1-(2,4-二氯苯基)-5-三氯-甲基-(1H)-1,2,4-三唑-3-羧酸乙酯 (S1-6) 和相关化合物, 如 EP-A-174 562 和 EP-A-346 620 中描述的;

[0212] d) 5-苄基-或 5-苯基-2-异噁唑啉-3-羧酸或 5,5-二苯基-2-异噁唑啉-3-羧酸的类型的化合物, 优选地, 下述化合物, 例如 5-(2,4-二氯苄基)-2-异噁唑啉-3-羧酸乙酯 (S1-7) 或 5-苯基-2-异噁唑啉-3-羧酸乙酯 (S1-8) 和相关化合物, 如 WO 91/08202 中描述的, 或 5,5-二苯基-2-异噁唑啉羧酸乙酯 (S1-9) (“双苯恶唑酸”) 或 5,5-二苯基-2-异噁唑啉羧酸正丙酯 (S1-10) 或 5-(4-氟苄基)-5-苯基-2-异噁唑啉-3-羧酸乙酯 (S1-11), 如专利申请 WO-A-95/07897 中描述的。

[0213] B) 式 (S-II) 的喹啉衍生物

[0214]



[0215] 其中符号和指数具有下述含义:

[0216] R_B^1 是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、硝基或 (C_1-C_4) -卤代烷基;

[0217] n_B 是 0 至 5 的自然数, 优选地, 0 至 3;

[0218] R_B^2 是 OR_B^3 、 SR_B^3 或 $NR_B^3R_B^4$ 或饱和或不饱和的 3 至 7 元的、具有至少一个氮原子和至多 3 个杂原子 (优选来自 O 和 S 构成的组) 的杂环, 其经由氮原子与 (S-II) 中的羰基联结, 未经取代或被选自 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基和任选经取代的苯基构成的组的基团 (优选地, 式 OR_B^3 、 NHR_B^4 或 $N(CH_3)_2$ 的基团, 特别是式 OR_B^3 的基团) 取代;

[0219] R_B^3 是氢或未经取代或经取代的脂肪烃基团, 并且具有优选总共 1 至 18 个碳原子;

[0220] R_B^4 是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_1-C_6) -烷氧基或经取代的或未经取代的苯基;

[0221] T_B 是 $(C_1$ -或 $C_2)$ -烷二基 (alkanediyl) 链, 其未经取代或被一个或两个 (C_1-C_4) -烷基或 $[(C_1-C_3)$ -烷氧基] 羰基取代;

[0222] 优选地:

[0223] a) 8-喹啉氧基乙酸 (S2) 类型的化合物, 优选地是,

[0224] (5-氯-8-喹啉氧基) 乙酸 1-甲基己酯 (通用名“喹氧乙酸”(S2-1)) (见 Pestic. Man.),

[0225] 丁-1-基 (5-氯-8-喹啉氧基) 乙酸 1,3-二甲酯 (S2-2),

[0226] (5-氯-8-喹啉氧基) 乙酸 4-烯丙氧基丁酯 (S2-3),

[0227] (5-氯-8-喹啉氧基)乙酸 1-烯丙氧基丙-2-酯 (S2-4),

[0228] (5-氯-8-喹啉氧基)乙酸乙酯 (S2-5),

[0229] (5-氯-8-喹啉氧基)乙酸甲酯 (S2-6),

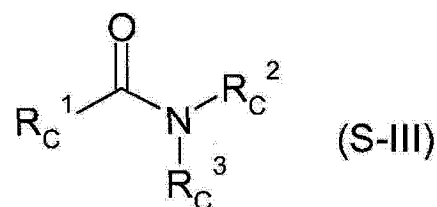
[0230] (5-氯-8-喹啉氧基)乙酸烯丙酯 (S2-7),

[0231] 2-(2-亚丙基亚胺氧基)-1-乙基(5-氯-8-喹啉氧基)乙酸酯 (S2-8), 2-氧丙-1-基(5-氯-8-喹啉氧基)乙酸酯 (S2-9) 和相关化合物, 如 EP-A-86 750、EP-A-94 349 和 EP-A-191 736 或 EP-A-0 492 366 中描述的, 以及它们的水合物和盐, 如 WO-A-2002/034048 中描述的。

[0232] b) (5-氯-8-喹啉氧基)丙二酸类型的化合物, 优选地, 下述化合物, 例如 (5-氯-8-喹啉氧基)丙二酸二乙酯、(5-氯-8-喹啉氧基)丙二酸二烯丙酯、(5-氯-8-喹啉氧基)丙二酸甲基乙酯和相关化合物, 如 EP-A-0 582 198 中描述的。

[0233] C) 式 (S-III) 的化合物

[0234]



[0235] 其中符号和指数具有下述含义:

[0236] R_C^1 是 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_2-C_4) -烯基、 (C_2-C_4) -卤代烯基、 (C_3-C_7) -环烷基, 优选地, 二氯甲基;

[0237] R_C^2 、 R_C^3 相同或不同, 并且是氢、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_2-C_4) -烯基、 (C_2-C_4) -炔基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_2-C_4) -卤代烯基、 (C_1-C_4) -烷基氨基甲酰基- (C_1-C_4) -烷基、 (C_2-C_4) -烯基氨基甲酰基- (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基- (C_1-C_4) -烷基、二氧杂环戊基- (C_1-C_4) -烷基 (dioxolanyl- (C_1-C_4) -alkyl)、噻唑基、咪唑基、咪唑基烷基、噻吩基、哌啶基、经取代的或未经取代的苯基, 或者 R_C^2 和 R_C^3 一起形成经取代的或未经取代的杂环, 优选地, 噁唑烷、噻唑烷、哌啶、吗啉、四氢嘧啶或苯并噁嗪环;

[0238] 优选地:

[0239] 二氯乙酰胺类型的活性化合物, 其经常用作出苗前安全剂 (土壤作用安全剂), 例如,

[0240] “二氯丙烯胺 (dichlormid)” (见 Pestic. Man.) (= N,N-二烯丙基-2,2-二氯乙酰胺),

[0241] “R-29148” (= 3-二氯乙酰基-2,2,5-三甲基-1,3-噁唑烷, 来自 Stauffer),

[0242] “R-28725” (= 3-二氯乙酰基-2,2-二甲基-1,3-噁唑烷, 来自 Stauffer),

[0243] “解草酮 (benoxacor)” (见 Pestic. Man.) (= 4-二氯乙酰基-3,4-二氢-3-甲基-2H-1,4-苯并噁嗪),

[0244] “PPG-1292” (= N-烯丙基-N-[(1,3-二氧杂环戊-2-基)甲基]二氯乙酰胺, 来自 PPG Industries),

[0245] “DKA-24” (= N-烯丙基-N-[(烯丙基氨基羰基)甲基]二氯乙酰胺, 来自

Sagro-Chem),

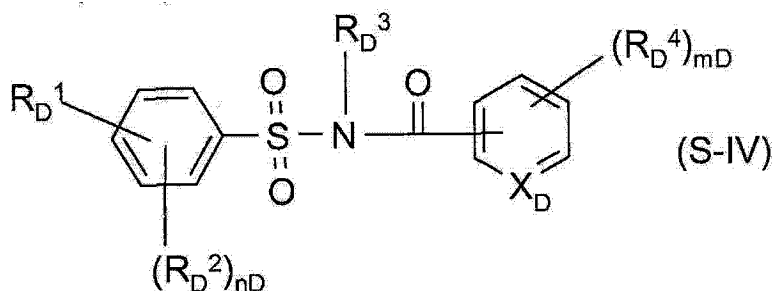
[0246] “AD-67”或“MON 4660”(= 3-二氯乙酰基-1-氧杂-3-氮杂-螺[4,5]癸烷,来自 Nitrokemia 或 Monsanto),

[0247] “TI-35”(= 1-二氯乙酰基氮杂环庚烷,来自 TRI-Chemical RT)

[0248] “diclonon”(dicyclonone)或“BAS145138”或“LAB145138”(= 3-二氯乙酰基-2,5,5-三甲基-1,3-二氮杂二环[4.3.0]壬烷,来自 BASF),以及“解草唑”或“MON 13900”(见 Pestic. Man.)(= (RS)-3-二氯乙酰基-5-(2-咪喃基)-2,2-二甲基咪唑烷)。

[0249] D) 式 (S-IV) 的 N-酰基磺酰胺及它们的盐

[0250]



[0251] 其中

[0252] X_D 是 CH 或 N;

[0253] R_D^1 是 $CO-NR_D^5R_D^6$ 或 $NHCO-R_D^7$;

[0254] R_D^2 是卤素、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷氧基、硝基、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 (C_1-C_4) -烷基磺酰基、 (C_1-C_4) -烷氧基羰基或 (C_1-C_4) -烷基羰基;

[0255] R_D^3 是氢、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_2-C_4) -烯基或 (C_2-C_4) -炔基;

[0256] R_D^4 是卤、硝基、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷氧基、 (C_3-C_6) -环烷基、苯基、 (C_1-C_4) -烷氧基、氰基、 (C_1-C_4) -烷硫基、 (C_1-C_4) -烷基亚磺酰基、 (C_1-C_4) -烷基磺酰基、 (C_1-C_4) -烷氧基羰基或 (C_1-C_4) -烷基羰基;

[0257] R_D^5 是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_3-C_6) -环烷基、 (C_2-C_6) -烯基、 (C_2-C_6) -炔基、 (C_5-C_6) -环烯基、苯基或 3 至 6 元的含有选自氮、氧和硫构成的组的 v_D 杂原子的杂环基,其中最后七个提到的基团被选自卤素、 (C_1-C_6) -烷氧基、 (C_1-C_6) -卤代烷氧基、 (C_1-C_2) -烷基亚磺酰基、 (C_1-C_2) -烷基磺酰基、 (C_3-C_6) -环烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基羰基、 (C_1-C_4) -烷基羰基和苯基以及在环状基团的情况下还有 (C_1-C_4) -烷基和 (C_1-C_4) -卤代烷基构成的组的 v_D 个取代基取代;

[0258] R_D^6 是氢、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_2-C_6) -烯基或 (C_2-C_6) -炔基,其中最后三个提到的基团被选自卤素、羟基、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基和 (C_1-C_4) -烷硫基构成的组的 v_D 个基团取代,或

[0259] R_D^5 或 R_D^6 与携带它们的氮原子一起形成吡咯烷基或哌啶基基团;

[0260] R_D^7 是氢、 (C_1-C_4) -烷基氨基、二- (C_1-C_4) -烷基氨基、 (C_1-C_6) -烷基、 (C_3-C_6) -环烷基,,其中后两个提到的基团被选自卤素、 (C_1-C_4) -烷氧基、卤素- (C_1-C_6) -烷氧基和 (C_1-C_4) -烷硫基以及在环状基团的情况下还有 (C_1-C_4) -烷基和 (C_1-C_4) -卤代烷基构成的组的 v_D 个取代基取代;

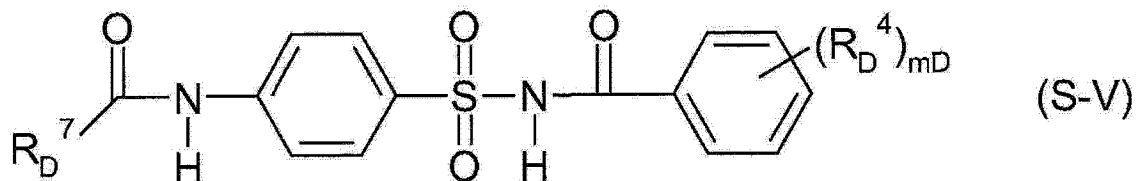
[0261] n_D 是 0、1 或 2;

[0262] m_D 是 1 或 2;

[0263] v_D 是 0、1、2 或 3；

[0264] 从这些中间, 优选是 N- 酰基磺酰胺类型的化合物, 例如下式 (S-V) 的, 其是例如从 WO 97/45016 已知的

[0265]



[0266] 其中,

[0267] R_D^7 是 (C_1-C_6) -烷基、 (C_3-C_6) -环烷基, 其中后两个提到的基团被选自卤素、 (C_1-C_4) -烷氧基、卤素- (C_1-C_6) -烷氧基和 (C_1-C_4) -烷硫基以及在环状基团的情况下还有 (C_1-C_4) -烷基和 (C_1-C_4) -卤代烷基构成的组的 v_D 个取代基取代;

[0268] R_D^4 是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 CF_3 ;

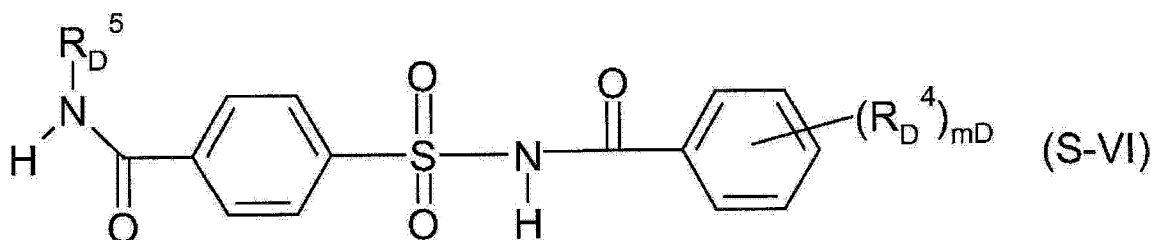
[0269] m_D 是 1 或 2;

[0270] v_D 是 0、1、2 或 3;

[0271] 以及还有

[0272] 酰基氨磺酰基苯甲酰胺, 例如下式 (S-VI) 的, 其是例如从 WO 99/16744 已知的,

[0273]



[0274] 例如下述这些, 其中,

[0275] R_D^5 = 环丙基, 且 $(R_D^4) = 2-OMe$ (“环丙磺酰胺”, S3-1)

[0276] R_D^5 = 环丙基, 且 $(R_D^4) = 5-Cl-2-OMe$ (S3-2)

[0277] R_D^5 = 乙基, 且 $(R_D^4) = 2-OMe$ (S3-3)

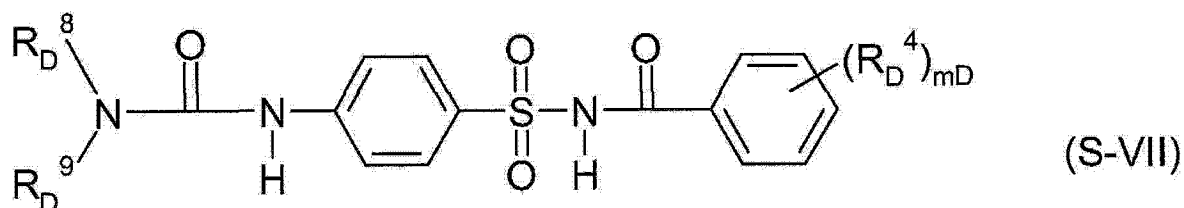
[0278] R_D^5 = 异丙基, 且 $(R_D^4) = 5-Cl-2-OMe$ (S3-4), 和

[0279] R_D^5 = 异丙基, 且 $(R_D^4) = 2-OMe$ (S3-5);

[0280] 以及, 还有

[0281] 式 (S-VII) 的 N- 酰基氨磺酰基苯基脲的类型的化合物, 其是例如从 EP-A-365484 已知的

[0282]



[0283] 其中

[0284] R_D^8 和 R_D^9 互相独立地是氢、 (C_1-C_8) -烷基、 (C_3-C_8) -环烷基、 (C_3-C_6) -烯基、 (C_3-C_6) -炔基，

[0285] R_D^4 是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 CF_3 ；

[0286] m_D 是 1 或 2；

[0287] 这些中特别是

[0288] 1-[4-(N-2-甲氧基苯甲酰基氨基磺酰基)苯基]-3-甲基脲，

[0289] 1-[4-(N-2-甲氧基苯甲酰基氨基磺酰基)苯基]-3,3-二甲基脲，

[0290] 1-[4-(N-4,5-二甲基苯甲酰基氨基磺酰基)苯基]-3-甲基脲，

[0291] 1-[4-(N-萘酰基氨基磺酰基)苯基]-3,3-二甲基脲，

[0292] G) 来自羟基芳香族和芳香族-脂肪族羧酸衍生物的种类的活性化合物，例如

[0293] 3,4,5-三乙酰氧基苯甲酸乙酯、3,5-二甲氧基-4-羟基苯甲酸、3,5-二羟基苯甲酸、4-羟基水杨酸、4-氟水杨酸、1,2-二氢-2-氧代-6-三氟甲基吡啶-3-甲酰胺、2-羟基肉桂酸、2,4-二氯肉桂酸，如 WO 2004084631、WO 2005015994、WO 2006007981、WO 2005016001 中所述；

[0294] H) 来自 1,2-二氢喹啉-2-酮的种类的活性化合物，例如

[0295] 1-甲基-3-(2-噻吩基)-1,2-二氢喹啉-2-酮、1-甲基-3-(2-噻吩基)-1,2-二氢喹啉-2-硫酮、1-(2-氨基乙基)-3-(2-噻吩基)-1,2-二氢喹啉-2-酮盐酸盐、1-(2-甲基磺酰基氨基乙基)-3-(2-噻吩基)-1,2-二氢-喹啉-2-酮，如 WO 2005112630 中所述的，

[0296] I) 除了针对有害植物的除草剂作用之外，还对作物植物（例如稻）具有安全剂作用的活性化合物，例如，“哌草丹”或“MY-93”（见 Pestic. Man.）（= S-1-甲基-1-苯基乙基哌啶-1-硫代羧酸酯），其已知为用于稻以抵挡除草剂草达灭的损害的安全剂，

[0297] “杀草隆”或“SK 23”（见 Pestic. Man.）（= 1-(1-甲基-1-苯基乙基)-3-对-甲苯基-脲），其已知为用于稻以抵挡除草剂啞吡啶磺隆的损害的安全剂，

[0298] “苄草隆”=“JC-940”（= 3-(2-氯苯基甲基)-1-(1-甲基-1-苯基-乙基)脲，见 JP-A-60087254），其已知为用于稻以抵挡多种除草剂的损害的安全剂，

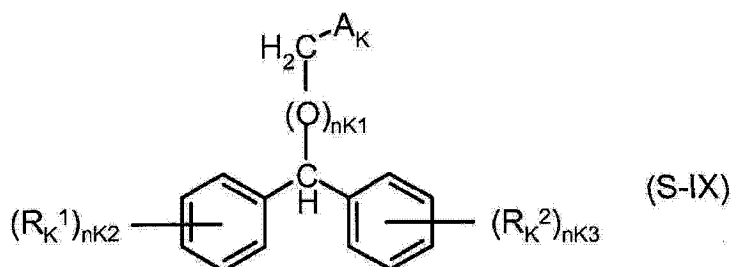
[0299] “去草酮”或“NK 049”（= 3,3'-二甲基-4-甲氧基二苯甲酮），其已知为用于稻以抵挡多种除草剂的损害的安全剂，

[0300] “CSB”（= 1-溴-4-(氯甲基磺酰基)苯）（CAS 登记 No. 54091-06-4，来自 Kumiai），其已知为在稻中针对多种除草剂的损害的安全剂，

[0301] K) 式 (S-IX) 的化合物，

[0302] 如 WO-A-1998/38856 中描述的

[0303]



[0304] 其中符号和指数具有下述含义：

[0305] R_K^1 、 R_K^2 互相独立地是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -烷基氨基、二- (C_1-C_4) -烷基氨基、硝基；

[0306] A_K 是 $COOR_K^3$ 或 $COOR_K^4$ ；

[0307] R_K^3 、 R_K^4 互相独立地是氢、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_2-C_6) -烯基、 (C_2-C_4) -炔基、氰基烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、苯基、硝基苯基、苄基、卤代苄基、吡啶基烷基或烷基铵，

[0308] n_K^1 是 0 或 1，

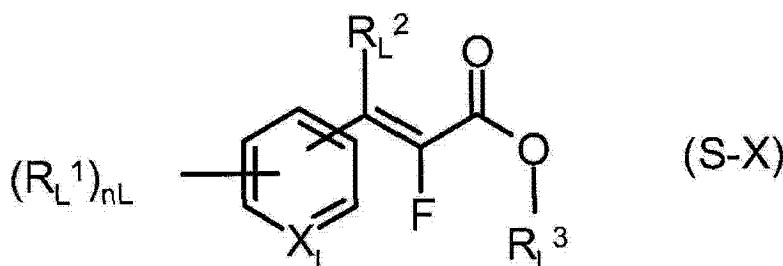
[0309] n_K^2 、 n_K^3 互相独立地是 0、1 或 2；

[0310] 优选地：(二苯基甲氧基)乙酸甲酯 (CAS 登记 No. :41858-19-9)，

[0311] L) 式 (S-X) 的化合物

[0312] 如 WO A-98/27049 所述

[0313]



[0314] 其中符号和指数具有下述含义：

[0315] X_L 是 CH 或 N，

[0316] n_L 在 $X = N$ 的情况下是 0 至 4 的整数，

[0317] 在 $X = CH$ 的情况下是 0 至 5 的整数，

[0318] R_L^1 是卤素、 (C_1-C_4) -烷基、 (C_1-C_4) -卤代烷基、 (C_1-C_4) -烷氧基、 (C_1-C_4) -卤代烷氧基、硝基、 (C_1-C_4) -烷硫基、 (C_1-C_4) -烷基磺酰基、 (C_1-C_4) -烷氧基羰基、任选经取代的苯基、任选经取代的苯氧基，

[0319] R_L^2 是氢或 (C_1-C_4) -烷基，

[0320] R_L^3 是氢、 (C_1-C_8) -烷基、 (C_2-C_4) -烯基、 (C_2-C_4) -炔基或芳基，其中上文提到的每个含碳基团是未经取代的或被一个或多个（优选可多至三个）相同或不同的选自卤素和烷氧基构成的组的基团取代；

[0321] 或其盐，

[0322] M) 3-(5-四唑基羰基)-2-喹诺酮的类别的活性化合物，例如

[0323] 1,2-二氢-4-羟基-1-乙基-3-(5-四唑基羰基)-2-喹诺酮 (CAS 登记 No. : 219479-18-2)、1,2-二氢-4-羟基-1-甲基-3-(5-四唑基羰基)-2-喹诺酮 (CAS 登记 No. : 95855-00-8)，如 WO-A-1999000020 所述

内,优选在 100 : 1 至 1 : 100 的范围内,特别是 20 : 1 至 1 : 20 的范围内。安全剂可被类似地配制进式 (I) 化合物或它们与其它除草剂 / 杀虫剂的混合物,并且作为完成的制剂或作为与除草剂的罐混剂提供并使用。

[0350] 式 (I) 化合物所需要的应用速根据外部条件 (例如温度、湿度和使用的除草剂的类型) 等等而变动。其可在宽的限度内变动,例如 0.001 至 10000g/公顷及更多的活性物质;但是其优选在 0.5 至 5000g/公顷之间,特别优选为 0.5 至 1000g/公顷,并且非常特别优选为 0.5 至 500g/公顷。

[0351] 当本发明的转基因植物含有一种或多用于针对其它除草剂的耐受性的基因 (例如,编码经突变的或未经突变的 EPSPS 的基因,其对植物赋予对草甘膦除草剂的耐受性,或者 pat 或 bar 基因,其赋予对草铵膦除草剂的耐受性) 时,或者当转基因植物天然对其它除草剂具有抗性 (例如磺酰脲耐受性) 时,根据本发明的方法可包含同时或依时序交错组合应用 HPPD 抑制剂与所述除草剂或除草剂组合 (例如草甘膦和 / 或草铵膦和 / 或磺酰脲除草剂)。

[0352] 本发明还涉及编码本发明的 HPPD 的嵌合基因作为标志物基因在转化植物物种期间的用途,所述用途基于在上述 HPPD 抑制剂型除草剂上进行选择。

[0353] 本发明还涉及获得对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂有抗性的植物的方法,其特征在于,用在植物中表达本文定义的本发明的 HPPD 的嵌合基因转化植物。

[0354] 在一种特别的实施方式中,本发明涉及用于获得对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂有抗性的植物的所述方法,其特征在于,本发明的 HPPD 包含 SEQ ID No. 4 (从第 2 位氨基酸至第 350 位氨基酸) 或经改造适于玉米、稻、小麦、豆类物种、甘蔗、洋葱、芸苔属物种的植物或棉花的密码子选择的编码本发明的 HPPD 的合成 DNA。

[0355] 在另一特别的实施方式中,本发明还涉及用于获得对选自环磺酮、甲基磺草酮、二酮腈、异噁氟草、磺草酮、庄无忌和 bicyclopyrone 的三酮 HPPD 抑制剂有抗性的植物的所述方法。

[0356] 在另一特别的实施方式中,本发明涉及用于获得对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂有抗性的植物的所述方法,其特征在于,所述植物还包含可在植物中表达的嵌合基因,所述基因编码 PDH (预苯酸脱氢酶) 酶或者至少具有 PDH 的酶。

[0357] 本发明还涉及用于在区域或田间控制杂草的方法,所述方法包括在该区域或田间栽种对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂有抗性的、根据上文所述的方法获得的经转化的植物,或者来自它们的种子,以及应用对杂草有毒性的剂量的所述三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂,但不会显著影响到所述经转化的种子或所述经转化的植物。

[0358] 本发明还涉及获得油或膳食的方法,所述方法包括种植对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂有抗性的、根据上文所述的方法获得的经转化的植物,或者来自此类植物的经转化的种子,任选地,用三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂处理此类植物或种子,收获谷粒,以及碾磨谷粒以制造膳食和提取油。

[0359] 本发明还涉及如上文所述的本发明的 HPPD 的用途,其特征在于,所述 HPPD 抑制剂是选自环磺酮、甲基磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌和磺草酮的三酮 HPPD 抑制剂。

[0360] 本发明还涉及宿主生物,特别是植物细胞或植物,其含有包含编码根据本发明的

HPPD 的序列的嵌合基因,并且其还含有在该宿主生物中具有功能的基因,允许预苯酸脱氢酶(本文缩写为 PDH)的过量表达。

[0361] 术语“PDH 酶”在本文中使用时指展示出预苯酸到 HPP 的转化的 PDH 活性的任何天然或经突变的 PDH 酶。特别地,所述 PDH 酶可来自任何类型的生物。可通过使得能测量预苯酸底物的量的减少或者能测量源于酶促反应的产物(即 HPP 或者辅因子 NADH 或 NADPH 之一)的积累的任何方法,来鉴定具有 PDH 活性的酶。

[0362] 文献中描述了编码 PDH 酶的很多基因,它们的序列可在网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/> 中找到。特别已知的是编码酿酒酵母的 PDH 酶的基因(检索号 S46037)(如 Mannhaupt 等人(1989)Gene 85,303-311 所述),编码芽孢杆菌属的细菌(特别是枯草芽孢杆菌物种)的 PDH 酶的基因(检索号 P20692)(如 Henner 等人(1986)Gene 49(1)147-152 中所述),编码埃希氏菌属的细菌(特别是大肠杆菌物种)的 PDH 酶的基因(检索号 KMECTD)(如 Hudson 等人(1984)J. Mol. Biol. 180(4),1023-1051 中所述),编码欧文氏菌属的细菌(特别是草生欧文氏菌物种)的 PDH 酶的基因(检索号 S29934)(如 Xia 等人(1992)J. Gen. Microbiol. 138(7),1309-1316 中所述)。

[0363] 本发明还涉及获得对 HPPD 抑制剂有抗性的宿主生物(特别是植物细胞或植物)的方法,这通过将如上文定义的至少一种核酸序列或一种嵌合基因整合进此类生物,以及还同时或依序用在该宿主生物中具有功能以允许 PDH(预苯酸脱氢酶)酶表达的基因转化它来实现。

[0364] 在一种特别的实施方式中,本发明涉及获得对三酮或 pyrazolate HPPD 抑制剂(特别是环磺酮、甲基磺草酮、苯吡唑草酮、bicyclopyrone、庄无忌或磺草酮)有抗性的宿主生物(特别是植物细胞或植物)的方法。

[0365] 可用于获得用允许 HPPD 酶过表达的基因以及用允许 PDH 酶过表达的基因二者转化过的宿主生物(特别是植物细胞或植物)的方式和方法被广泛描述于 WO 04/024928 中,其内容通过引用并入本文。

[0366] 本说明书中提到任何在先公开文本(或源于其的信息)或者提到任何已知的内容,并不被、也不应当被认为是认可或承认任何形式的下述暗示:此类在先的公开文本(或信息)或已知内容形成本发明的领域中公知常识的一部分。

[0367] 图

[0368] 图 1,质粒 pSE420::FMP38e 的图谱

[0369] 图 2,插入进烟草植物中的 T-DNA 的图谱

[0370] 图 3,根据实施例 5 至 13 插入不同植物的 T-DNA 的图谱;缩写具有下述含义

[0371] A、B、C 和 G,烟草植物,D、E 和 F,玉米植物,H,大豆植物,I,稻植物,以及 J,棉花植物。35S:CaMV35S 启动子,KanR:赋予对抗生素卡那霉素的抗性的基因,nos:胭脂氨合酶启动子,Ter:终止子,H6:编码 His 标签的序列,OTP:经优化的转运肽,BAR(双丙氨酰磷抗性,WO 8705629)和 PAT(膦丝菌素 N-乙酰转移酶,EP 257542):赋予对双丙氨酰磷、膦丝菌素或草铵膦的耐受性的基因,2mEPSPS:编码来自玉米的双突变体(Thr102Ile 和 Pro106Ser)EPSPS(5-烯醇丙酮基莽草酸合酶)的基因(US 20030027312),2mAHAS:编码来自拟南芥属的双突变体 ALS(乙酰乳酸合酶)(Pro197Ala 和 Trp574Leu;US 5378824),HA:来自拟南芥属基因的组蛋白启动子,TEV:烟草蚀刻病毒,FMP38e:针对在大肠杆菌中的表

达而优化的编码 FMP38 的基因, 在其最 5' 端具有编码 His 标签的序列, FMP38t : 针对在双子叶植物中的表达而优化的编码 FMP38 的基因, 在其最 5' 端具有编码 His 标签的序列, FMP38t-h, 针对在双子叶植物中的表达而优化的编码 FMP38 的基因, FMP38m, 针对在玉米植物中的表达而优化的编码 FMP38 的基因, LB, 左边界, RB, 右边界。

[0372] 序列表

[0373] SEQ ID No. 1 : 编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0374] SEQ ID No. 2 : 针对大肠杆菌而优化的编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列, 其在 5' 端含有编码丙氨酸和 6 个组氨酸氨基酸的核酸。

[0375] SEQ ID No. 3 : 针对烟草 (*Nicotiana tabaccum*) 而优化的编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列, 其在 5' 端含有编码经优化的转运肽和 HIS 标签的核酸序列。

[0376] SEQ ID No. 4 : 聚球藻属物种 HPPD 氨基酸序列, 源于 SEQ ID No. 1。

[0377] SEQ ID No. 5 : SEQ ID No. 2 编码的蛋白。

[0378] SEQ ID No. 6 : 与 OTP (经优化的转运肽 (WO 2009/144079)) 融合的聚球藻属物种 HPPD 氨基酸序列 (SEQ ID No. 4)。

[0379] SEQ ID No. 7 : SEQ ID No. 3 编码的蛋白。

[0380] SEQ ID No. 8 : 编码拟南芥 HPPD 的核酸序列。

[0381] SEQ ID No. 9 : 拟南芥 HPPD 氨基酸序列。

[0382] SEQ ID No. 10 : SEQ ID No. 8 编码的蛋白加上在起头的氨基酸甲硫氨酸直接下游的额外的丙氨酸, 之后是 6 个组氨酸的氨基酸。

[0383] SEQ ID No. 11 : SEQ ID No. 9 的蛋白, 加上位于所述蛋白最 N-末端的 OTP 序列。

[0384] SEQ ID No. 12 : SEQ ID No. 10 的蛋白, 加上直接位于所述蛋白最 N-末端的 OTP 序列。

[0385] SEQ ID No. 13 : 引物序列 Xho-OTP-for。

[0386] SEQ ID No. 14 : 引物序列 NcoI-OTP-rev。

[0387] SEQ ID No. 15 : 编码从菌株 JA-2-3B' a 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0388] SEQ ID No. 16 : SEQ ID NO : 15 编码的蛋白质。

[0389] SEQ ID No. 17 : 针对双子叶植物优化的编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0390] SEQ ID No. 18 : 针对玉米植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0391] SEQ ID No. 18 : 针对玉米植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0392] SEQ ID No. 19 : 针对欧洲油菜植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0393] SEQ ID No. 20 : 针对甜菜 (*Beta vulgaris*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0394] SEQ ID No. 21 : 针对陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0395] SEQ ID No. 22 :针对大豆 (*Glycine max*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0396] SEQ ID No. 23 :针对大麦 (*Hordeum vulgare*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0397] SEQ ID No. 24 :针对稻 (*Oryza sativa*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

[0398] SEQ ID No. 25 :针对小麦 (*Triticum aestivum*) 植物优化的、编码从菌株 JA-3-3Ab 获得的聚球藻属物种 HPPD 的核酸序列。

实施例

[0399] 在下文实验实施例的协助下,本发明的多个方面将被更好地理解。下文这些实施例中描述的所有方法或操作都是以举例的方式提供的,并且对应于从达到相同或相似结果可获得的不同方法中做出的选择。该选择对于结果的品质没有影响,并且,由此,技术人员可使用任何合适的方法来达到相同或相似的结果。用于操作 DNA 片段的大多数方法被描述于“*Current Protocols in Molecular Biology*” Volumes 1 and 2, Ausubel F.M. 等人, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience (1989) 出版的,或 *Molecular cloning*, T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, 1982, 或 Sambrook J. and Russell D., 2001, *Molecular Cloning: a laboratory manual* (第三版) 中。

[0400] 实施例 1

[0401] 制备 SEQ ID No. 5 的聚球藻属物种 HPPD (命名为 FMP38e) 和由 SEQ ID No. 10 确定的拟南芥 HPPD

[0402] 最初,将拟南芥 AtHPPD 编码序列 (1335bp ;Genebank AF047834 ;WO 96/38567) 克隆进表达载体 pQE-30 (QIAGEN, Hilden, 德国) 的 BamHI 和 HindIII 限制性位点之间。获得的载体被称为“pQE30-AtHPPD”。

[0403] 使用大肠杆菌 K12 优化的密码子选择 (Eurofins MWG operon (Ebersberg, 德国), GENEius 软件), 修饰和合成编码 UniProtKB/TrEMBL 中以检索号 Q2JX04 列出的蛋白的原始聚球藻属物种 Ss HPPD 序列 (1053bp), 并将其克隆进经修饰的 pBluescript 载体 (Eurofins MWG operon, Ebersberg, 德国)。在该载体中,对应于 MCS (多克隆位点) 的序列被部分除去,仅对应于限制性酶 HindIII 的识别的序列保留在插入序列的两端。

[0404] 在 5' 端,直接在 ATG 下游,插入编码丙氨酸的核酸序列和编码 N- 末端 HIS6- 标签 (6x HIS, 是 cac cat cac cat cat cac 编码的) 的核酸序列。在 ATG 上游,添加了两个额外的半胱氨酸碱基对,以获得对应于限制性酶 NcoI 的识别位点的序列,以及在终止密码子的下游,添加了对应于限制性酶 XbaI 的识别位点的序列。用限制性酶 NcoI 和 XbaI 消化得到的载体“pBluescript-FMP38e”,通过电泳在琼脂糖凝胶上分离没有移动到大约 3000bp (对应于 DNA) 的载体尺寸的长度的条带。然后使用 MinElute™ 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国) 纯化编码 HPPD 的 DNA, 并将其克隆进之前用相同限制性酶切割过的 pSE420 (RI) NX 载体 (见下文)。

[0405] 克隆和表达载体 pSE420 (RI) NX (5261bp) 基于 Invitrogen (Karlsruhe, 德国) 的质粒 pSE420。对该载体的修饰包括添加 nptII 基因 (新霉素磷酸转移酶 ;Sambrook and

Russell, 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual (第三版), 该基因赋予对抗生素卡那霉素的抗性, 并且缺少超级连接子区域 (多克隆位点) 的大部分。

[0406] 质粒具有 *trp-lac(trc)* 启动子和 *lacI^q* 基因 (在每种大肠杆菌宿主菌株中提供 *lac* 遏制子)。 *lac* 遏制子与 *lac* 操纵基因 (*lacO*) 结合, 并且限制靶基因的表达; 这种抑制可通过用异丙基 β -D- 硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 诱导来减轻。

[0407] 得到的载体被称为 “pSE420(RI)NX-FMP38e” (见图 1), 其被用于转化大肠杆菌 BL21 细胞 (Merck, Darmstadt, 德国)。

[0408] 关于被用作为参照的 *AtHPPD* (拟南芥 *HPPD*), 见 WO 2009/144079。

[0409] 在含有 pQE30-*AtHPPD* 或 pSE420(RI)NX-FMP38e 的大肠杆菌 K-12BL21 中进行 *HPPD* 的表达。令细胞生长直到 OD 达到 0.5, 然后通过用 1mM IPTG (与 *lac* 遏制子结合并导致其从 *lac* 操纵子解离) 诱导, 从 *trp-lac(trc)* 启动子启动表达。表达在 28°C 进行 15 小时。

[0410] 为制备预起始培养物, 用 50 μ L 大肠杆菌 K-12BL21 甘油贮液接种 2mL TB 培养基 (100 μ g * mL⁻¹ 羧苄青霉素)。于 37°C 在 140rpm 的振荡下对预起始培养物培育 15 小时。用 200 μ l 预起始培养物启动起始培养物 (补充有 100 μ g * L⁻¹ 的 5mL TB), 起始培养物在 37°C 被培育 3 小时。

[0411] 为制备主培养物, 用 4mL 起始培养物接种 400mL TB 培养基 (100 μ g * mL⁻¹ 羧苄青霉素)。于 37°C 在 140rpm 振荡下对该起始培养物加以培育, 直到达到 OD₆₀₀0.5。然后用 400 μ l 1M IPTG 溶液诱导重组蛋白表达。令细胞再在这些条件下生长一小时, 然后将温度降低至 28°C, 在 140rpm 振荡培养物 15 小时。通过在 4°C 以 6000xg 离心 15 分钟, 收获细胞。细胞沉淀物被贮藏于 -80°C。

[0412] 天然形式的 His₆-*AtHPPD* 和 His₆-FMP38e 的分离和纯化

[0413] 细胞裂解

[0414] 使用裂解酶 (切割形成细菌细胞壁的肽聚糖中 N-乙酰基胞壁酸和 N-乙酰基-D-葡萄糖胺残基之间的 1,4- β -键的酶)。然后通过细菌细胞的内部压力破坏细胞膜。此外, 裂解缓冲液含有 **Benzonase**[®] 核酸酶, 这是水解所有形式的 DNA 和 RNA 但是不损害蛋白由此能大大降低细胞裂解液的粘度的内切核酸酶。自然条件下的裂解在冰上进行。

[0415] 为纯化 His₆- 标签化的蛋白, 按照用户操作说明书使用 **QIAexpress**[®] Ni-NTA Fast Start 试剂盒。

[0416] 通过固定的金属离子亲和层析 (IMAC) 来纯化 His₆- 标签化的蛋白

[0417] 将对裂解反应进行离心之后获得的澄清的细胞裂解液 (10mL) 上样到 Ni-NTA Fast Start 柱 (来自 **QIAexpress**[®] Ni-NTA Fast Start 试剂盒 (Qiagen, Hilden, 德国)) 上, 按照操作说明书进行纯化。用 2.5mL 洗脱缓冲液来洗脱 His₆- 标签化的蛋白。

[0418] 通过凝胶过滤对 *HPPD* 溶液脱盐

[0419] 按照用户操作说明书, 将用 2.5mL 洗脱缓冲液从 Ni-NTA Fast Start 柱上洗脱的 *HPPD* 溶液应用到 Sephadex G-25 PD-10 柱 (GE Healthcare, Freiburg, 德国) 上。全部样品都进入凝胶床之后, 用 3.5mL 贮藏缓冲液进行洗脱。

[0420] 将从脱盐柱上洗脱的 *HPPD* 溶液于 -80°C 以 1mL 等分试样冷冻。

[0421] 使用 Bradford 蛋白检验测定 *HPPD* 蛋白浓度

[0422] 使用标准 Bradford 检验 (Bradford, (1976), Anal Biochem 72 :248-254) 来测定蛋白浓度。

[0423] 使用 SDS-PAGE 测定 HPPD 溶液的纯度

[0424] 使用凝胶 **NuPAGE**[®] Novex 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Karlsruhe, 德国), 通过 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳来检查洗脱的蛋白的完整性, 大约 10 μ g 蛋白被上样。向 1-10 μ L 蛋白溶液中加入 10 μ L Laemmli 样品缓冲液, 在 90°C 对混合物温育 10 分钟。短的离心步骤之后, 将全部混合物上样进之前固定于 XCell SureLock[™] Novex Mini-Cell 凝胶腔 (填充有 **NuPAGE**[®] MOPS SDS 运行缓冲液 (用 ddH₂O 从 20x 溶液稀释的)) 中的 SDS 凝胶槽中。然后向凝胶腔应用 150V, 进行 1 小时。为染色蛋白条带, 将凝胶浸入考马斯亮蓝 R-250 染色溶液中。为对聚丙烯酰胺凝胶脱色, 将其浸入考马斯亮蓝 R-250 脱色溶液中, 直到蛋白条带在白色凝胶上呈现为蓝色。

[0425] 实施例 2

[0426] HPPD 酶“SEQ ID No. 5”和“SEQ ID No. 10”对 HPPD 抑制剂的耐受性的动力学表征和评估。

[0427] 通过标准分光光度检验 (广泛描述于 WO 2009/144079 中的方法) 来检查 HPPD 活性

[0428] HPPD 体外动力学性质的测定

[0429] 使用 HPLC 检验, 测定针对不同 HPPD 酶制备物的 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 值以及针对不同 HPPD 抑制剂的 K_i 、 $K_i = K_{on}$ 和 $K_i = K_{off}$, 以测量 HPPD 活性。检验混合物在 1ml 的体积中含有 150mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8)、10mM 抗坏血酸钠、650 个单位的牛过氧化氢酶 (Sigma C30 (Sigma-Aldrich, Munich, 德国), 34mg 蛋白 /ml, 23,000 单位 /mg) 以及适量 HPP、经纯化的 HPPD 和 HPPD 抑制剂。对于 K_m 、 V_{max} 和 k_{cat} 值测定, 检验混合物中的 HPP 浓度在 10 至 400 μ M 之间变动。对于 K_i 、 $K_i = K_{on}$ 和 $K_i = K_{off}$ 值测定, 使用 2mM HPP。所有检验都通过向检验混合物中添加 HPPD 酶来开始, 并在 0 至 240 秒的一系列时间后通过向含有 20 μ l 10% 高氯酸的反应检验管中添加 200 μ l 反应混合物来停止。通过在 10,000g 离心 5 分钟来沉降沉淀的蛋白。将 100 μ l 上清液上样到用 10% 甲醇、0.1% 三氟乙酸 (缓冲液 A) 平衡过的 250x 4mm Knauer (Berlin, 德国) Eurospher100-5 C18- 柱上。用缓冲液 A 也以 1.5ml/ 分钟的流速进行 4 分钟洗涤, 接着用 95% 的甲醇进行 3 分钟洗涤, 再用缓冲液 A 进行 2 分钟洗涤, 来洗脱柱。在 292nm 处监测 HGA (尿黑酸) 和 HPP (羟苯基丙酮酸) 的洗脱。大约 5 分钟时洗脱 HGA, 之后洗脱 HPP。用 HGA 的标准浓度组提供标准曲线, 以校正 HGA 峰对 HGA 浓度的 292nm 吸光度。

[0430] 为进行 K_m 和 V_{max} 值测定, 从形成的 HGA 对时间的图来测定不同底物浓度处 HPPD 反应的最初速率, 使用 ID Business Solutions Ltd. (www.idbs.com) XLfit 软件套装, 将其拟合至针对单反应酶 (unireactant enzymes) 的 Michaelis-Menten 等式。为测定 K_i 、 $K_i = K_{on}$ 和 $K_i = K_{off}$ 值, 使用 ID Business Solutions Ltd. XLfit 软件套装, 将不同抑制剂浓度下 HPPD 反应的时间过程拟合至针对机制 A, 竞争性抑制, 针对紧密结合抑制剂的等式 (Cha, S. (1975) Tight-binding inhibitors-I. Kinetic behaviour. Biochemical Pharmacology 24, 2177-2185)。

[0431] 表 1 :对 HPPD 酶 (拟南芥“SEQ ID No. 10”和聚球藻属物种“SEQ ID No. 5”) 的动

力学表征和它们对 HPPD 抑制剂环磺酮和二酮腈的分别的耐受性

[0432] 在下面给出的表 1 中,“Km” (Michaelis-Menten 常数) 表示用于表征酶的动力学参数,其被定义为允许达到反应最大速率的一半的底物浓度。Km 进一步被定义为反应速率达到其最大值的一半 ($V_{max}/2$) 时的底物浓度,其中 V_{max} 的含义是反应的最大速度。

[0433] $K_{on} = K_1$ 等于酶 - 底物结合的结合速率常数,而 $K_{off} = K_{-1}$ 等于酶 - 抑制剂复合体解离的速率常数。 K_i 定义了抑制剂常数。

[0434]

	HPP		环磺酮			二酮腈		
	K_m (μM)	V_{max} (μM)	k_1 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	K_i (μM)	k_1 ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{-1} (s^{-1})	K_i (μM)
SEQ ID No. 10	6.3	1.2	2.3E+05	3.5E-03	0.015	6.1E+05	1.1E-02	0.018
SEQ ID No. 5	5.1	1.2	4.1E+04	5.0E-02	1.2	4.9E+03	5.9E-02	12

[0435] 在上表 1 中,可以清楚看出,尽管细菌 HPPD “SEQ ID No. 5”和植物 HPPD “SEQ ID No. 10”的动力学参数 K_m 和 V_{max} 没有显示出任何显著的差异,细菌 HPPD “SEQ ID No. 5”远比植物 HPPD “SEQ ID No. 10”对测试的 HPPD 抑制剂更耐受。

[0436] 在存在若干 HPPD 抑制剂时测定 HPPD 活性

[0437] 在该内容中, pI_{50} 值表示以摩尔浓度表示的抑制 50% 酶活性所需的抑制剂浓度的对数值。

[0438] 使用 WO 2009/144079 中广泛描述的检验,以 2mM 固定的 HPP 浓度和 3 分钟的固定的温育时间,使用 ID Business Solutions Ltd. XLfit 软件套装,从 HPPD 活性对抑制剂浓度的剂量应答图来测定针对 HPPD 抑制剂的 pI_{50} 值。

[0439] 表 2:测定 pI_{50} HPPD 酶 (拟南芥 (SEQ ID No. 10) 和聚球藻属物种 (SEQ ID No. 5)) 和它们对下面列出的若干 HPPD 抑制剂环磺酮、二酮腈、甲基磺草酮、bicyclopyrone、pyrasulfotole、磺草酮、吡唑特、庄无忌和吡草酮的分别的耐受性。符号 “>>” 表示值远比指出值的要高,但是在测试的抑制剂浓度范围 (2.5×10^{-6} 、 5.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-5} 、 2.5×10^{-5} 、 6.3×10^{-5} 、 $2.5 \times 10^{-4} \text{M}$) 内无法精确计算。

[0440]

	环磺酮	二酮腈	甲基磺草酮	Bicyclopyrone
SEQ ID No. 10	>>5.6	>>5.6	>>5.6	5.2
SEQ ID No. 5	5.6	5.5	5.4	5.0

[0441]

	Pyrasulfotole	磺草酮	吡啶特	庄无忌	吡草酮
SEQ ID No. 10	5.4	>>5.6	5.4	>>5.6	>>5.6
SEQ ID No. 5	4.7	4.8	4.7	5.6	5.1

[0442] 表 3 :针对来自拟南芥 (SEQ ID No. 10) 和聚球藻属物种 (SEQ ID No. 5) 的 HPPD, 测定在存在 $5.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 抑制剂时较之在不存在抑制剂时测量的活性的抑制百分比。

[0443]

	环磺酮	二酮腈	甲基磺草酮	Bicyclopyrone
SEQ ID No. 10	92	87	86	29
SEQ ID No. 5	79	62	47	19

[0444]

	Pyrasulfotole	磺草酮	吡啶特	庄无忌	吡草酮
SEQ ID No. 10	69	74	61	100.	90
SEQ ID No. 5	16	19	5	72	31

[0445] 在上表 2 和 3 中,可以清楚看出,在所有测试的 HPPD 抑制剂浓度下,细菌 HPPD“SEQ ID No. 5”较之通过用 HPPD “SEQ ID No. 10”在相同实验条件下观察到的较之植物都显示出针对所有测试的 HPPD 抑制剂更高的耐受性水平。

[0446] 实施例 3 :构建嵌合基因,用于在烟草植物中评估 HPPD 抑制剂型除草剂耐受性

[0447] A) 构建嵌合基因

[0448] 含有编码 OTP 的序列的载体 pRP-RD224(被广泛描述于 W02009/144079 中)被用于对应于限制性酶 XhoI 的识别位点的核酸序列上游和对应于限制性酶 NcoI 的识别位点的核酸序列下游的 PCR 介导的连接。按照用户操作说明书,将获得的 PCR 产物克隆进载体 **pCR®-BluntII-TOPO®** (Invitrogen, Karlsruhe, 德国)。得到的载体被称为“pCR-TOPO-OTP”。按照标准 DNA 测序来验证正确序列的插入。用限制性酶 NcoI 和 XhoI 消化对应于 OTP 的 DNA,通过合适的凝胶电泳分离,并克隆进之前已相应地用 NcoI 和 XhoI 限制性酶消化的质粒 pRT100(Toepfer, (1987), Nucleic Acids Res 15:5890) 中。质粒 pRT100 含有 CaMV35S 启动子和 CaMV35S 终止子。随后用限制性酶 NcoI 和 XbaI 消化得到载体。用限制性酶 NcoI 和 XbaI 处理载体 pSE420(RI)NX-FMP38e(见图 1),以获得对应于“SEQ ID No. 2”的 DNA 片段。通过用限制性酶 HindIII 消化得到的载体,将 CaMV35S::OT P::FMP38e::CaMV35-term 盒(见图 2)亚克隆进之前用相同的酶消化过并去磷酸化的二元载体 pBin19(Bevan(1984), Nucleic Acids Res. 12:8711-8721.) 中。得到的载体被称为“FMP38ebv”。

[0449] 用载体 pQE-30-AtHPPD 进行 NcoI 限制性位点和编码加到 5' 端的 N-末端 His₆-标签的序列和加到 AtHPPD 的 3' 端的 XbaI 限制性位点的 PCR 介导的连接。

[0450] 从琼脂糖凝胶分离 AtHPPD 基因的 PCR 产物,用限制性酶 NcoI 和 XbaI 切割,用 MinElute™ PCR 纯化试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)纯化,并克隆进用相同限制性酶切割过

的 pSE420 (RI)NX 载体。

[0451] 产生的载体被称为“pSE420 (RI)NX-AtHPPD”，用限制性酶 NcoI 和 XbaI 消化其，并将其克隆进之前开口的载体 pRT100 (Toepfer 等人, (1987), *Nucleic Acids Res* 15 :5890)，该载体含有 CaMV35S 启动子和 CaMV35S 终止子。产生的载体被称为“pRT100-AtHPPD”。

[0452] 用限制性酶 NcoI 和 XhoI 消化载体 pCR-TOPO-OTP，将对应于 OTP 的 DNA 条带克隆进之前用上述限制性酶开口的载体 pRT100-AtHPPD。随后用限制性酶 HindIII 消化得到的载体，将感兴趣的表达盒克隆进之前开口并去磷酸化的二元载体 pBin19。得到的载体被称为“AtHPPDbv”。

[0453] 用二元载体 FMP38ebv 和 AtHPPDbv 转化根癌农杆菌 (ATHV, 源于 EHA101) 感受态细胞，在补充有抗生素卡那霉素和利福平的 YEB 培养基上进行选择（之前在专利申请 US005925808A 中被广泛描述过）

[0454] 用含有感兴趣的二元载体 (FMP38ebv 或 AtHPPDbv) 的这些农杆菌属的菌株转化来自烟草 *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN 植物的叶盘（其具有大约 $5 \times 5 \text{mm}^2$ 的尺寸）（如 Horsch 等人, (1985), *Science* 227 ;1229-1231 中广泛描述的）。

[0455] 将叶盘与含有二元载体 FMP38ebv 或 AtHPPDbv 的根癌农杆菌细胞一起共培养两天。然后将叶盘转至培养基，以允许枝条在 MS (Musharige and Skoog, (1962), *Physiol Plant* 15 (3) :473-497) 培养基上再生 6 周，所述培养基补充有 BAP (1mg/mL；苄基氨基嘌呤)、羧苄青霉素 (250mg/mL)、头孢噻肟 (250mg/mL)、卡那霉素 (75mg/mL) 和环磺酮 (10^{-6}M)。

[0456] 将再生的愈伤组织转移到培养基上，以诱导根发育 6 至 12 周 :MS (1/2)，其中补充有羧苄青霉素 (250mg/mL)、头孢噻肟 (250mg/mL)、卡那霉素 (75mg/mL) 和环磺酮 (10^{-6}M)。

[0457] 在该培养基上 6 周后，将用含有二元载体 AtHPPDbv 的根癌农杆菌转化的枝条转移到耗尽了 HPPD 抑制剂环磺酮的相同培养基上。

[0458] 结果概括于下表 3。

[0459] 在整个实验期间，含有叶盘的平板被放置于受控条件下的生长腔中（光 16 小时，黑暗 8 小时， 25°C ）

[0460] 愈伤组织的生根

[0461] 将来自用编码包含 SEQ ID No. 11 (拟南芥) 或 SEQ ID No. 7 (聚球藻属物种) 的 HPPD 的核酸序列转化的细胞的再生枝条愈伤组织转移到诱导根生长的培养基上，培养 6 至 12 周，所述培养基还补充有 HPPD 抑制剂环磺酮。在含有 SEQ ID No. 11 (拟南芥) 定义的 HPPD 的事件上，或在经转化的愈伤组织上，在上述给定的条件下均没有观察到根的生长。与之相反，在相同条件下，含有 SEQ ID No. 7 定义的 HPPD 的愈伤组织清楚地发育出大量健康的根（见下表 4）。

[0462] 表 4

[0463]

含有如下的愈伤组织:	被选择用于分子学分析的事件	在 10^{-6} M 环磺酮上的 % 延长和生根	在没有环磺酮的培养基上生根的事件数目
SEQ ID No. 11	21	0	5
SEQ ID No. 7	27	80	14

[0464] 叶盘再生

[0465] 从含有 HPPD SEQ ID No. 11 (拟南芥) 或 SEQ ID No. 7 (聚球藻属物种) 的植物切下叶盘, 再在标准培养条件下, 在补充有 BAP (1mg/mL; 苄基氨基嘌呤)、羧苄青霉素 (250mg/mL)、头孢噻肟 (250mg/mL) 的 MS 培养基上再生 6 周, 所述培养基还以提到的浓度包含下述列出的 HPPD 抑制剂之一 (环磺酮 (10^{-6} M)、二酮腈 ($5 \cdot 10^{-6}$ M)、甲基磺草酮 (10^{-6} M) 和 bicyclopyrone (10^{-6} M)), 使用不含 HPPD 抑制剂的培养基作为阳性对照。在实验结束时, 按照下文所述评估再生水平:

[0466] “-”表示叶盘看起来和补充有上文所述的抑制剂的培养基上的来自野生型烟草植物的叶盘相同。

[0467] “++++”表示叶盘看起来像在没有抑制剂的培养基上的来自野生型烟草植物的叶盘。

[0468] “+”、“++”和“+++”指再生的叶盘被抑制剂的存在严重 (+)、中度 (++) 和较少 (+++) 影响。

[0469] 实验结果概括于表 5 中。

[0470] 表 5: 多种 HPPD 抑制剂对来自包含编码从拟南芥属 (SEQ ID No. 11) 或从聚球藻属物种 (SEQ ID No. 7) 获得的 HPPD 的基因的转基因植物的叶盘的再生的影响。

[0471]

含有以下的叶盘	对照	环磺酮	二酮腈	甲基磺草酮	bicyclopyrone
SEQ ID NO. 11	++++	-	-	-	-
SEQ ID NO. 7	++++	++++	++	++++	+++

[0472] 虽然在含有 SEQ ID No. 7 (聚球藻属物种) 定义的 HPPD 的植物的情况下, 显示出较之该未经处理的对照而言相同或仅轻微降低的再生, 但含有 SEQ ID No. 11 (拟南芥) 定义的 HPPD 的相应植物却没有显示出任何再生, 但是在所有测试的 HPPD 抑制剂存在时, 较之未经处理的对照均清楚发育出可见的褪色表型。

[0473] 实施例 4:温室试验,以评估表达编码耐受性 HPPD 蛋白的转基因烟草植物对 HPPD 抑制剂型除草剂的耐受性

[0474] 制备表达拟南芥属或 FMP38 HPPD 酶的转基因植物品系。温室测试除草剂耐受性

[0475] 对环磺酮、异噁氟草和 bicyclopyrone 的应答

[0476] 将上文提到的(实施例 3)含有来自拟南芥属的编码 HPPD 的基因或来自聚球藻属物种的编码 FMP38HPPD 的基因 FMP38e 的 T0 烟草植物转移到温室(28/20°C),以进一步发育和产生种子。收获这些种子,将其放到土壤(ED73,混合有沙子和奥绿肥(osmocote)Pro),以在温室中发芽(28/20°C)。三至四周后,将小植物转移到含有上文提到的土壤的单个罐中。两周后,用下述物质喷雾尺寸为 4-6cm 直径的植物

[0477] - 环磺酮,100gAI/公顷,其是从 WP20(可润湿粉末 20%)制剂制备的,所述制剂补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油,或

[0478] - 异噁氟草,100gAI/公顷,其是从 WP20 制剂制备的,所述制剂补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油,或

[0479] - “盲制剂”,其是从没有活性成分(AI)的 WP20 制剂制备的,所述制剂补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油,然后转移到具有充足光条件(20000Lux)的生长腔中。

[0480] 应用(DAT)不同除草剂后七天,较之在以与含有转基因的烟草植物相同时间和相同条件被喷雾的野生型烟草植物上观察到的应答,评估转化的植物的症状(100%表示植物显示出与野生型植物相同的褪色表型,0%表示植物看起来像用“盲制剂”处理的野生型植物,中间的百分比代表观察到的症状的程度)。

[0481] 表 6:野生型烟草植物(A),和含有作为备选的上文描述的具有启动子 CaMV 35S、编码 OTP 的序列和编码拟南芥属 HPPD 的序列(B)或启动子 CaMV35S、编码 OTP 的序列和编码 HPPD FMP38 的序列 FMP38e(C)的表达盒的 T1 种群。通过喷雾应用 100g AI/公顷的环磺酮或异噁氟草(补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油)后 7 天,评估除草剂损害。清楚地,含有 FMP38e 基因的植物对环磺酮和异噁氟草远更耐受。属于组别(B)和(C)的植物在除草剂应用之前没有经过针对各转基因的存在的选择。

[0482]

A

%损伤 , 7DAT, 100gAl/ha

野生型	品系	环磺酮	异噁氟草	
	WT	1	100	100
	WT	2	100	100
	WT	3	100	100
	WT	4	100	98
	WT	5	100	99
	WT	6	100	99
	WT	7	100	100
	WT	8	100	n.d.
	WT	9	100	n.d.
	WT	10	100	n.d.
	WT	11	100	n.d.
	WT	12	100	n.d.
	WT	13	100	n.d.
	WT	14	100	n.d.

[0483]

B

%损伤 , 7DAT, 100gAl/ha

拟南芥 HPPD	品系	环磺酮	异噁氟草	
	258	1	100	100
	258	2	100	100
	258	3	100	100
	258	4	100	100
	258	5	100	100
	258	6	30	100
	252	1	30	30

[0484]

B % 损伤, 7DAT, 100gAI/ha

拟南芥 HPPD	品系	环磺酮	异噁氟草	
	252	2	40	70
	252	3	40	95
	252	4	40	98
	252	5	50	98
	252	6	60	99
	252	7	60	99
	252	8	70	99
	252	9	70	99
	252	12	75	100
	252	13	75	100
	252	14	75	100
	252	15	80	100
	327	1	10	10
	327	2	20	20
	327	3	20	60
	327	4	40	60
	327	5	50	70
	327	6	50	80
	327	7	70	95
	327	8	70	98
	327	9	70	99
	327	10	70	100
	327	11	70	100
	327	12	80	100
	327	13	80	100

[0485]

B % 损伤, 7DAT, 100gAl/ha

拟南芥 HPPD	品系	环磺酮	异噁氟草
	327 14	80	100
	327 15	80	100

[0486]

C % 损伤, 7DAT, 100gAl/ha

FMP38e	品系	环磺酮	异噁氟草
	34 1	30	15
	34 2	30	15
	34 3	n.d.	20
	34 4	n.d.	30
	34 5	n.d.	40
	34 6	n.d.	50
	34 7	n.d.	50
	39 1	0	0
	39 2	0	2
	39 3	0	5
	39 4	0	5
	39 5	0	5
	39 6	0	10
	39 7	0	15
	39 8	0	25
	39 9	0	25
	39 10	0	30
	39 11	0	30
	39 12	0	35

[0487]

C

% 损伤, 7DAT, 100gAI/ha

FMP38e

品系	环磺酮	异噁氟草
39	13	0
39	14	5
39	15	5
197	1	5
197	2	20
197	3	30
197	4	30
197	5	30
197	6	40
197	7	50
197	8	50
197	9	n.d.
197	10	n.d.
197	11	n.d.
197	12	n.d.

[0488] 对 bicyclopyrone 的应答

[0489] 野生型烟草植物和携带来自聚球藻属物种的编码 HPPD 的基因 FMP38e 的 T1 烟草植物的种子被播种于补充有 50g/L 卡那霉素的 MS 培养基 (Murashige and Skoog 1964) 上。四周后, 将绿色小植物转移至土壤, 如上文所述在温室培养三周, 然后用含有 bicyclopyrone (100g AI/公顷)、硫酸铵和甲基酯 raps 油的混合物对其喷雾。基于处理后七天应答于除草剂发展出的表型将植物分类到两个组别中。类别 I 被定义为应答于除草剂处理展示出没有损伤至轻微损伤的植物 (损伤: 0-30%), 类别 II 被定为展示出强烈损伤至与在进行相同处理的野生型植物上看到的损伤相似的损伤的植物 (损伤: 31-100%)。在这种情况下, 仅含有至少一种 T-DNA 的植物被暴露给除草剂处理。

[0490] 表 7

[0491]

Bicyclopyrone, 100g AI /ha

7 DAT

转基因	品系	耐受性植物的%		
		类别 I	类别 II	
-	WT	0	12	0
FMP38e	34	59	6	17
FMP38e	39	100	48	46
FMP38e	197	89	15	15

[0492] 含有HPPD FMP38的植物展示出对HPPD抑制剂型除草剂bicyclopyrone的耐受性。

[0493] 可从上面给出的数据概括出,从若干独立的转基因事件获得的表达来自聚球藻属物种的编码FMP38 HPPD的基因FMP38e的植物对在标准农艺学条件下应用的剂量的若干HPPD抑制剂型除草剂高度耐受。

[0494] 实施例5:构建二元载体,以在植物中表达若干经双子叶植物优化的变体,以及温室测试,以评估含有此类变体的烟草植物的耐受性

[0495] FMP38t (SEQ ID No. 3)、FMP38t-h (SEQ ID No. 17) 克隆进 pBin19

[0496] 设计具有针对在双子叶植物中的表达而优化过的密码子选择的、编码HPPD蛋白FMP38的基因,将其命名为FMP38t-h (SEQ ID No. 17),具有在其最5'端处的编码OTP和HIS TAG的额外序列的相同基因被称为FMP38t (SEQ ID No. 3)。使用限制性酶NcoI和XbaI,将对应于FMP38t-h基因的序列克隆进之前描述的载体pRT100-OTP(含有CaMV35S启动子和终止子)。得到的载体被称为pRT100-OTP-FMP38t-h。使用限制性酶XhoI和XbaI,将对应于FMP38t的序列克隆进之前描述的载体pRT100,得到的载体被称为pRT100-OTP-FMP38t。使用限制性酶SbfI,将对应于PromCaMV35S-OTP-FMP38t-h-TerCaMV35S和PromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP38t-TerCaMV35S的片段亚克隆进pBIN19载体(如上文所述)。得到的二元载体被分别称为pBin19-FMP38t-h(图3C)和pBin19-FMP38t(图3B),它们可用于例如转化双子叶植物,例如烟草植物(如上文所述)。然后针对其对HPPD抑制剂型除草剂(例如环磺酮)的耐受性,对经过足够生长的转化子植物加以测试。观察到的应答于除草剂处理的症状的发展被评估,并与相同条件下的野生型植物的应答相比较。

[0497] 植物转化和用100g AI/TBT来选择T0

[0498] 作为例子,将含有T-DNAPromCaMV35S-OTP-HIS6-FMP38t-TerCaMV35S的生根植物转移到标准生长条件下的温室中。两周的适应期后,用含有100g环磺酮/公顷的混合物(从WP(可润湿粉末20%)制剂制备的,补充有硫酸铵和甲基酯raps油)处理T0植物。处理后两周,将评估由于应用除草剂的症状。植物被分类为四个组别。被评估为“0”的经处理植物看起来像未经处理的烟草植物。被评估为“1”的植物展示出由于应用除草剂导致的短暂的轻微褪色表型。被评估为“2”的植物展示出轻微至强烈的褪色症状。最后,被评估

为“3”的植物看起来像经过了相同处理的野生型烟草植物。结果被概括于下表 8 中。

[0499] 表 8 :表达 FMP38 HPPD 的 T0 烟草植物的应答

[0500]

基因	在含有卡那霉素的培养基上获得的转化子的数目	对应于由于以 100 g AI/公顷的比例在被处理的植物上应用环磺酮导致的症状强度的组别
----	-----------------------	--

[0501]

		0	1	2	3
FMP38t	28	1	1	6	14

[0502] 总而言之,表达 FMP38HPPD 的若干烟草植物对环磺酮耐受。

[0503] 实施例 6 :在载体中克隆编码 FMP38HPPD 的基因 FMP38e、FMP38t 和 FMP38m,以转化玉米植物

[0504] FMP38e (SEQ ID No. 2)、FMP38t (SEQ ID No. 3)、FMP38m-h (SEQ ID No. 18)

[0505] a-FMP38e, 于 pHoe6/Ac 中 :具有针对大肠杆菌优化的密码子使用的基因,加上在其最 5' 端处的编码 OTP 的序列和编码 His 标签的序列

[0506] 用限制性酶 HindIII 消化含有编码 HPPD FMP38 的基因 (针对在大肠杆菌中的表达优化过,并处于 CaMV35S 启动子的控制下) 的载体 pRT100-FMP38e。

[0507] 将 CaMV35S::OTP::FMP38e::CaMV35S-term 盒进一步克隆进之前用相同的限制性酶消化过并去磷酸的二元载体 pHoe6/Ac (US 6, 316, 694)。得到的载体被称为 pHoe6/Ac/FMP38e。

[0508] b-FMP38t, 于 pHoe6/Ac 中 (SEQ ID No. 3) :具有针对双子叶植物优化的密码子使用的基因,加上在其最 5' 端处的编码 OTP 的序列和编码 His 标签的序列

[0509] FMP38t, 于 pRT100 中。定制了编码蛋白 FMP38 (针对在烟草中的表达优化过) 的基因加上在 5' 端含有编码经优化的转运肽和 HIS 标签的序列的基因版本,将其称为 FMP38t。向该序列上游添加针对限制性酶 XhoI 的识别序列,下游添加针对限制性酶 XbaI 的识别序列。用限制性酶 XhoI 和 XbaI 消化对应于 OTP 和 FMP38t 的 DNA,按照合适的凝胶电泳来分离,并克隆进之前用 XhoI 和 NcoI 限制性酶消化过的 pRT100 (Toepfer, (1987), Nucleic Acid Res 15 :5890) 中。质粒 pRT100 含有 CaMV35S 启动子和 CaMV35S 终止子。得到的载体被称为 pRT100-FMP38t,并用限制性酶 HindIII 对其进行消化,以将对应于 CaMV35S::OTP::FMP38t::CaMV35S-term 盒的 DNA 与载体剩余部分分离开,以将其克隆进之前限制性消化过的载体 pHoe6/Ac (US 6. 316. 694) 中。得到的载体被称为 pHoe6/Ac/FMP38t (图 3)。

[0510] c-FMP38m, 于 pHoe6/Ac 中 (SEQ ID No. 18) :具有针对单子叶植物优化的密码子使用的基因,加上在其最 5' 端处的编码 OTP 的序列。

[0511] FMP38m, 于 pRT100-OTP (NcoI-XbaI) 中,然后 HindIII

[0512] 订购经针对在单子叶植物中的表达而优化的编码 FMP38 的基因的变体（被称为 FMP38m），在起始密码子的上游添加 NcoI 识别位点，而在终止密码子的下游添加限制性酶 XbaI 的识别序列。用限制性酶 NcoI 和 XbaI 消化对应于 FMP38m 的 DNA 序列，然后通过凝胶电泳分离，最后从凝胶分离。将分离的 DNA 片段与之前也用相同的限制性酶消化过的载体 pRT100-OTP（上文提到的）混合。得到的载体被称为 pRT100-OTP-FMP38m，其含有表达盒 CaMV35S::OTP::FMP38m::CaMV35Sterm，使用限制性酶 HindIII 分离所述表达盒，然后再克隆进之前开口并去磷酸化的载体 pHOE6/Ac 中，该载体含有编码 PAT（膦丝菌素乙酰转移酶）酶的基因，这赋予对除草剂草铵膦的抗性（US 6,316,694）。得到的质粒被称为 pHoe/Ac/FMP38m（图 3F）。

[0513] 玉米转化：

[0514] 质粒 pHoe6/Ac（US 6,316,694）、pHoe6/Ac/FMP38e、pHoe6/Ac/FMP38t 和 pHoe6/Ac/FMP38m 被用于转化玉米培养物。

[0515] 玉米培养、原生质体分离、转化和可育转基因玉米植物的再生按照美国专利 6284945 “*Zea mays*(L.)with capability of long term, highly efficient plant regeneration including fertile transgenic maize having a heterologous gene, and their preparation” 来进行。

[0516] 在含有膦丝菌素的培养基上选择经转化的愈伤组织。然后再将再生的生根植物转移至土壤，并令其在标准条件下（28/20℃）在温室生长并且产生种子。成年植物生长，直到产生种子，收集种子用于后续播种，用各 HPPD 抑制剂型除草剂处理经过了足够发育的植物。

[0517] 实施例 7：构建含有 FMP38e 基因的载体，以表达进稻植物

[0518] 例如用驱动基因 FMP38e 表达的 CaMV35 启动子来构建用于稻植物转化的二元载体，所述基因具有针对在大肠杆菌细菌中表达优化的密码子选择，并且在其最 5' 端添加了编码 His 标签的序列以及再上游编码 OTP 的序列，之后是 CaMV35S 终止子。此外，转化载体还含有 PAT 基因盒（其中，基因被 CaMV35S 启动子驱动，之后是 CaMV35S 终止子），用于转化过程中基于草铵膦的选择（见图 3I）。二元载体被称为 pTMV369。以相似的方式构建相似二元载体，但其中包含表达编码 HPPD 酶的拟南芥属基因的表达盒。

[0519] 实施例 8：转化稻植物

[0520] 使用本领域公知的方法实现稻转化。简言之，使用未成熟的胚（来自恢复系 6G4317）进行对稻的根癌农杆菌介导的转化。简言之，在授粉后 8-12 天收获来自供体植物的穗。除去未成熟种子的外稃。之后使用基于 NaOCl 的溶液和 Tween 对种子灭菌。用乙酰水杨酸预诱导这些种子。然后在存在乙酰丁香酮时，于 24℃ 在黑暗中将根癌农杆菌细菌与预诱导的种子共培养 4 天。之后，从胚移出胚芽鞘，并洗涤，然后放到补充有膦丝菌素的培养基上，在 16 小时的光周期节律下于 28℃ 放置三周。然后从胚切下生长中的愈伤组织，将其转移至含有 triacillin、膦丝菌素、L-脯氨酸和硫酸铜（II）的新鲜培养基。

[0521] 对于每种愈伤组织品系和每种环磺酮浓度，将从不同愈伤组织块随机分离的 3 个枝条转移到具有环磺酮的 MS/2。一般而言，在愈伤组织已被放到再生培养基上 9 周之后将枝条从再生培养基转移到 MS/2。

[0522] 在 26.5℃（16 小时光周期）培养培养物，2 周后评估症状。

[0523] 已经基于褪色,对转移的枝条的新发育的叶进行了评分,并将其归为三组:

[0524] a) 无褪色

[0525] b) 中等褪色

[0526] c) 完全褪色

[0527] 在“中等褪色”的组别中,具有下述区别:具有显示出仅非常少的褪色症状并且由此趋向为绿叶的新叶的枝条,和具有几乎完全褪色的新叶的枝条。

[0528] 表 9

[0529]

环磺酮浓度		AtHPPD	FMP38e
1 μ M	没有褪色的枝条数目	27	38
	具有中等褪色的枝条数目	19	4
	完全褪色的枝条数目	12	0
5 μ M	没有褪色的枝条数目	0	3
	具有中等褪色的枝条数目	2	35
	完全褪色的枝条数目	58	21

[0530] 在温室试验中对环磺酮的应答

[0531] 将 T0 生根小植物(在仅膦丝菌素或补充有环磺酮的膦丝菌素上选择)转移至温室中的土壤。在适应期后,用不同的 HPPD 抑制剂型除草剂处理经过足够生长的植物。作为例子,用制剂类型 WP20 的环磺酮以 100g AI/ 公顷(补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油)喷雾 T0 植物。在喷雾应用之后七天,评估由于应用除草剂导致的症状,并与经过相同处理的野生型植物上观察到的症状加以比较。

[0532] 在处理后七天,基于应答于除草剂发展出的表型,将植物分类进三个组别。类别 I 被定义为没有展示出损伤的植物,类别 II 被定义为展示出应答于除草剂处理的短暂轻微的损伤的植物(损伤:10-40%),类别 III 被定义为展示出强烈损伤至与在经历相同处理的野生型植物中观察到的损伤相似的损伤的植物(损伤:41-100%)。

[0533] 通常,可以看出,甚至仅含一种 T-DNA 插入片段的植物也显示出对 HPPD 抑制剂型除草剂环磺酮的暴露田间剂量的显著且足够的耐受性水平。

[0534] 表 10:

[0535]

环磺酮, 100g AI/公顷

7 DAT

转基因	受处理的植物数目	类别 I	类别 II	类别 III
-	20	0	0	20
AtHPPD	23	1	13	9
FMP38e	25	9	8	8

[0536] 总之,可以看出,表达蛋白 FMP38 的稻植物要比野生型稻植物或表达敏感型拟南芥 HPPD 的植物对 HPPD 抑制剂型除草剂环磺酮的应用更为耐受。

[0537] 实施例 9 :构建二元大豆转化载体

[0538] 例如用驱动基因 FMP38t-h (SEQ ID No. 17) 表达的 CaMV35 启动子来构建用于大豆转化的二元载体,所述基因具有针对在双子叶植物中表达优化的密码子选择,并且在最 5' 端添加了编码 OTP 的序列以及再上游的序列 TEV (烟草蚀刻病毒) 以改进 mRNA 在植物中的稳定性,之后是 CaMV35S 终止子。基因 FMP38t-h 的核苷酸序列被提供于 SEQ ID No. 17 中。此外,转化载体还含有 PAT 基因盒 (其中,基因被 CaMV35S 启动子驱动,之后是 CaMV35S 终止子),用于转化过程中基于草铵膦的选择,以及含有 2mEPSPS 基因盒 (其中基因被来自拟南芥属的组蛋白启动子驱动),以向经转化的植物赋予对除草剂草甘膦的耐受性 (见图 3H)。该二元载体被称为 pFC0111。

[0539] 实施例 10 :大豆 T0 植物的建立和选择

[0540] 使用本领域公知的方法来实现大豆转化,例如使用根癌农杆菌介导的转化大豆半种子外植体,如 Paz 等人 (2006, Plant cell Rep. 25 :206) 描述的。使用异噁氟草作为选择标记来鉴定转化子。观察到绿色枝条的出现,将其记录为对除草剂异噁氟草的耐受性的指标。总共 0.6% 的转基因测试的枝条显示出相当于未经异噁氟草处理的野生型大豆枝条的正常的发绿,而用相同量的异噁氟草处理过的野生型大豆枝条则完全褪色。这表明, FMP38 蛋白的存在使得能对 HPPD 抑制剂型除草剂像异噁氟草具有耐受性。

[0541] 将耐受性的绿色枝条转移到生根培养基中或接枝。适应期后,将生根的小植物转移到温室。

[0542] 然后用 HPPD 抑制剂型除草剂,例如用环磺酮以 100g AI/ 公顷的比率对含有转基因的植物进行喷雾。应用后十天,评估由于应用除草剂导致的症状,并将其与在相同条件下于野生型植物上观察到的症状相比。

[0543] 实施例 11 :构建二元棉花转化载体

[0544] 例如用驱动基因 FMP38t-h (SEQ ID No. 15) 表达的 CaMV35 启动子来构建用于棉花转化的二元载体,所述基因具有针对在双子叶植物中表达优化的密码子选择,并且在最 5' 端添加了编码 OTP 的序列以及再上游的序列 TEV (烟草蚀刻病毒) 以改进 mRNA 在植物中的稳定性,之后是 CaMV35S 终止子。基因 FMP38t-h 的核苷酸序列被提供于 SEQ ID No. 17 中。此外,转化载体还含有 PAT 基因盒 (其中,基因被 CaMV35S 启动子驱动,之后是 CaMV35S

终止子),用于转化过程中基于草铵膦的选择,以及 2mEPSPS 基因盒(其中基因被来自拟南芥属的组蛋白启动子驱动),以向经转化的植物赋予对除草剂草甘膦的耐受性(见图 3J)。

[0545] 实施例 12:棉花 T0 植物的建立和选择

[0546] 使用本领域公知的方法来实现棉花转化,尤其是 PCT 专利公开文本 WO 00/71733 中描述的那种是尤其优选的方法。

[0547] 将再生的植物转移到温室。适应期后,用补充有硫酸铵和甲基酯 raps 油的 HPPD 抑制剂型除草剂(例如环磺酮)以 100g AI/公顷对经过足够生长的植物进行喷雾。喷雾应用后 7 天,评估用除草剂处理导致的症状,并将其与在相同条件下经受相同处理的野生型棉花植物上观察到的症状相比。

[0548] 实施例 13:构建二元转化载体,用于产生对具有不同作用模式的四种除草剂耐受的植物

[0549] 例如用驱动基因 FMP38t-h (SEQ ID No. 17) 表达的 CaMV35 启动子来构建用于双子叶植物转化的二元载体,所述基因具有针对在双子叶植物中表达优化的密码子选择,并且在最 5' 端添加了编码 OTP 的序列,之后是 CaMV35S 终止子。基因 FMP38t-h 的核苷酸序列被提供于 SEQ ID No. 17 中。此外,转化载体还含有 PAT 基因盒(其中,基因被 CaMV35S 启动子驱动,之后是 CaMV35S 终止子),用于对表达该基因的植物赋予草甘膦耐受性,以及含有编码双突变体 (Thr102Ile 和 Pro106Ser)EPSPS 的 2mEPSPS 基因盒(其中基因被来自拟南芥属的组蛋白启动子驱动),以向经转化的植物赋予对除草剂草甘膦的耐受性,以及含有拟南芥 2mAHAS 基因盒,其编码被 CaMV35S 启动子驱动的耐受性的 ALS 酶(乙酰乳酸合酶, Pro197Ala, Trp574Leu),向表达该基因的植物赋予对来自磺酰脲或咪唑啉酮的类别的除草剂的抗性(见图 3G)。

[0550] 最后将基因盒克隆进载体 pHoe6/Ac (US 6, 316, 694),最后的载体被称为 pHoe6/FMP38t-h/PAT/EPSPS/AHAS,其被用于通过根癌农杆菌介导的本领域的方法来转化双子叶植物。将 T0 植物转移至土壤,并且在适应期后,用来自 HPPD 抑制剂类别的除草剂,然后用草甘膦,然后用草铵膦以及最后用来自例如磺酰脲类别的除草剂连续对经足够生长的植物进行喷雾。

[0551] 实施例 14:产生显示出对三种不同作用模式的除草剂的耐受性的转基因植物

[0552] 例如用驱动基因 FMP38t-h (SEQ ID No. 17) 表达的 CaMV35 启动子来构建用于烟草转化的二元载体,所述基因具有针对在双子叶植物中表达优化的密码子选择,并且在最 5' 端添加了编码 OTP 的序列,以及再上游的序列 TEV(烟草蚀刻病毒)以改进 mRNA 在植物中的稳定性,之后是 CaMV35S 终止子。基因 FMP38t-h 的核苷酸序列被提供于 SEQ ID No. 17 中。此外,转化载体还含有 PAT 基因盒(其中,基因被 CaMV35S 启动子驱动,之后是 CaMV35S 终止子),用于转化过程中基于草铵膦的选择,以及 2mEPSPS 基因盒(其中基因被来自拟南芥属的组蛋白启动子驱动),以向经转化的植物赋予对除草剂草甘膦的耐受性(见图 3H)。二元载体被称为 pFC0111。上述载体被用于转化从烟草植物获得的叶盘,这按照实施例 3 来进行。

[0553] 将转基因烟草植物转移至温室,并用草甘膦以 1121g AI/公顷的比率处理。从此类耐受性的烟草植物产生并收获种子。将这些种子放到土壤上,以在温室发芽。三至四小时后,每个事件 50 个小植物被转移至单个的盆中。两周后,用下述物质对尺寸 4-6cm 的植

物进行喷雾：

- [0554] - 草铵膦 (glufosinate-ammonium) 1000gAI/ 公顷
- [0555] - 草甘膦 1121gAI/ 公顷
- [0556] - 环磺酮 100g AI/ 公顷
- [0557] - 环磺酮 + 草甘膦 100g AI/ 公顷 + 1121gAI/ 公顷
- [0558] 九天后, 评估各除草剂应用导致的症状。

[0001]

序列表

<110> Bayer CropScience AG

<120> 对HPPD抑制剂型除草剂耐受的植物

<130> BCS 09-1039-PCT

<160> 25

<170> PatentIn版本3.3

<210> 1

<211> 1053

<212> DNA

<213> 聚球藻属物种

<400> 1

```

atgaaccegt ccatttegaat tgtccaaggg atccaaccacc tgcactteta cctttgggat    60
ctgececggt ggcgggaaca cttttgtcgg gtttgggget tecgggtgge aagcgacgee    120
ggcaacaccc tggagctgga gcagggatec ctgcgcttgc gectgtctca gccggcacgg    180
gcgggggaeg aggtggaecg ccatttgcag cgccatgggc cgggggtggt ggatgtggcc    240
ttgcggttgg gagagcagga gctaccggcc ttggcggagc tgitgcgggg ccgagcgccc    300
caactggcgt ggatcccggc agcagcggcg ctctgcctcc acacccccta cgggatccgg    360
catttetgta tccctgccc cttggatgce gccctgcgg aagcgggect gttttccac    420
tgggatcacg tggigtgaa cgtggagcag ggatcccctc aggcggcage cgactggtat    480
gggcgggtgc tggcctggcg gcgctgtac cgtacagca tgggcacgc cacctccggc    540
ctgaaaagcg tgggtgtggg ggatccggaa gggggatec aatgggcat caacgagccc    600
acctgtgccg ctcccagat tcaggagttt ttgatgccc atggcgccc gggcattcag    660
cacgcggcgc tgcacagetc agacattgtt gccagcctgc gccggttgcg gcagggggga    720
gtggactttt tgcaagtgge gccgcagtac tacaccagcc tggaaaagga getggggttg    780
gcctccggtt ctccccttgg gcagggcacc tcttggcaag acctggttga gcagcagatc    840
cttctggatg ctaccctgcc cgttctgat gcccaggatc gcccccctct gctgcagacc    900
tttaccagc ccctcttggg tggcccacc tttttcttg aagtcattca acgcttaggc    960
ggggccacgg gctttggcga ggccaattt caggctttgt tcaggccct ggaacggcaa    1020
cagcgacagc gacaccagc gctgaccct tag                                1053

```

<210> 2

<211> 1074

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 针对大肠杆菌而优化的编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列, 其在5' 端含有编码丙氨酸和6个组氨酸氨基酸的核酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> 编码Ala的序列

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(24)

<223> 编码包含6个His的His标签的序列

[0002]

<400> 2
 atggeccacc atcaccatca tcacaatccc agcatccgca tagttcaggg cattaacccat 60
 ctccatttct acctctggga tctgcccgct tggcgcgagc acttctgccg tgtgtggggc 120
 ttctgcgitt ctagcgatgc aggcaacacc ctggaactgg aacagggcag tctgcggctg 180
 cgectcagtc agccagctcg cgcaggatgat gaagtggacc gccatctgca gcggcatggg 240
 ccagggtgctg tagacgttgc gctggccgtg ggcgaacagg aacttccggc gttagcggaa 300
 ctgcttccgc gaactggggc tcagttagcc tggaitccgg ctgcagcggc cctctgccct 360
 cacacgccat atggatccg tcacagcttg attccgggac cgttagatgc agcccctgcg 420
 gaagccgggt tattttccca ctgggatcat gtggtgctga atgtcgaaca aggcctcttg 480
 caagcagctg ccgactggta tggctgctgt ttaggatggc gtcgccttta tctctatcc 540
 attggtaacc cgacatcagg gctggagagt gtcgtggctg gtagctctga agcgggcatt 600
 caatgggcga tcaacgaacc gacctgtgcc gcgagccaga tccaggagtt tctgcacgca 660
 catggaggac cggggattca geatgcgget ctgcattcgt cggacatcgt tgcacccctg 720
 cgtcttttgc gccaaaggcg tctagacttc ctgcaagttg cgcctcagta ctacaagctc 780
 ttggagcgtg aacttggttt ggcttggctg tctgcactgg gtcaggcaat tctgtggeaa 840
 gacctggtag agcaacagat tctgtggat gcgacctcc cggcatcaga tggccaggat 900
 eggccaactg tactgcagac cttaactcag ccgctgtttg gccgtccacc gttctctctc 960
 gaggtcatcc aacgcctggg tggcgcgaca ggctttggtg aagccaactt tcaggccctg 1020
 ttgaagcgc tggaaagcca gcaacgcca cgcctcagg cgtgactcc gtaa 1074

<210> 3
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 针对烟草 (*Nicotiana tabacum*) 而优化的编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列, 其在5' 端含有编码经优化的转运肽和HIS标签的核酸序列

<220>
 <221> transit_peptide
 <222> (1)..(375)
 <223> 优化的至叶绿体的转运肽

<220>
 <221> misc feature
 <222> (376)..(378)
 <223> 编码Met的序列

<220>
 <221> misc feature
 <222> (379)..(381)
 <223> 编码Ala的序列

<220>
 <221> misc feature
 <222> (382)..(399)
 <223> 编码由6个His组成的His标签的序列

<400> 3
 atggctteta ttctctcttc tgtggetaet gttcttagga ctgctccagc tcaagctaat 60
 atggtggctc cattcacagg cttagaatcc aatgctgctt tcccaactac taagaaggct 120
 aacgatttct ctactctccc atctaatggt ggaagggttc agtgtatgca agtttggcca 180

[0003]

gcttacggaa ataagaagtt cgagactctt tcttaccttc caccactttc tatggcteca 240
 actgtgatga tggcttcttc tgetactget gttgetecat tccaaggatt gaagtetact 300
 gcttctttgc cagttgctag aaggctcatc egttctcttg gaaaegtllc taacggtgga 360
 aggattagat gtgctatggc tcatcatcat caccateaca acccatecat taggategtt 420
 cagggaaatc atcaecttca ettetacctt tgggatcttc caaggtggag agagcatttc 480
 ttagagatgt ggggattcag agttgcttct gatgetggaa acactcttga acttgagcaa 540
 ggatctctta ggcttagget ttctcaacca gctagagctg gtgatgaagt tgatagggat 600
 ctcaaaagac atggaccagg tgttgttgat gttgetcttg ctgttggaga acaagaactt 660
 ccagctcttg ctgaacttct tagaggaagg ggtgctcaac ttgettggat tccagctgct 720
 gctgctcttt gccttcatac tccatacga attaggeact cccttattec aggaccactt 780
 gatgctcttc cagctgagge tggacttttt tctcattggg atcacgttgt tcttaatgtg 840
 gagcagggat ctcttcaagc tgetgctgat tggatggaa gatttcttgg atggcgtaga 900
 ctctaccggt acctcaccgg aactgetact tccaggactg agtctgttgt tgttggagat 960
 ccagagctg gaatteaatg ggetatcaac gaacctactt gcgetgcttc tcagattcaa 1020
 gatttcttc atgetcatgg tggaccaggt attcaacatg ctgetctcca ctcttcagat 1080
 attgtggett ctcttagaag gcttaggcaa ggtggagttg atttcttca agtggcteca 1140
 cagtactata ctctcttga gagagagctt ggacttgetc ttagatctgc tcttggacag 1200
 getatttctt ggcaggatct tgttggacag cagattcttc ttgatctac tcttcagct 1260
 tetgatggac aagatagccc acttttgetc caaactttca ctcaaccact tttcggaagg 1320
 ccaacattct tcttcgaagt gattcaaaga cttggaggtg ctactggatt tggagagctt 1380
 aatttccaag ctcttttga ggctcttgaa aggcaacaaa ggcaaaggca teaagetctt 1440
 actccatga 1449

<210> 4
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> 聚球藻属物种

<400> 4

Met Asn Pro Ser Ile Arg Ile Val Gln Gly Ile His His Leu His Phe
 1 5 10 15

Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu His Phe Cys Arg Val Trp
 20 25 30

Gly Phe Arg Val Ala Ser Asp Ala Gly Asn Thr Leu Glu Leu Glu Gln
 35 40 45

Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala Arg Ala Gly Asp Glu
 50 55 60

Val Asp Arg His Leu Gln Arg His Gly Pro Gly Val Val Asp Val Ala
 65 70 75 80

Leu Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Pro Ala Leu Ala Glu Leu Leu Arg
 85 90 95

[0004]

Gly Arg Gly Ala Gln Leu Ala Trp Ile Pro Ala Ala Ala Ala Leu Cys
 100 105 110

Leu His Thr Pro Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu Ile Pro Gly Pro Leu
 115 120 125

Asp Ala Ala Pro Ala Glu Ala Gly Leu Phe Ser His Trp Asp His Val
 130 135 140

Val Leu Asn Val Glu Gln Gly Ser Leu Gln Ala Ala Ala Asp Trp Tyr
 145 150 155 160

Gly Arg Val Leu Gly Trp Arg Arg Leu Tyr Arg Tyr Ser Ile Gly Thr
 165 170 175

Ala Thr Ser Gly Leu Glu Ser Val Val Val Gly Asp Pro Glu Ala Gly
 180 185 190

Ile Gln Trp Ala Ile Asn Glu Pro Thr Cys Ala Ala Ser Gln Ile Gln
 195 200 205

Glu Phe Leu His Ala His Gly Gly Pro Gly Ile Gln His Ala Ala Leu
 210 215 220

His Ser Ser Asp Ile Val Ala Ser Leu Arg Arg Leu Arg Gln Gly Gly
 225 230 235 240

Val Asp Phe Leu Gln Val Ala Pro Gln Tyr Tyr Thr Ser Leu Glu Arg
 245 250 255

Glu Leu Gly Leu Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Gln Ala Ile Ser Trp
 260 265 270

Gln Asp Leu Val Glu Gln Gln Ile Leu Leu Asp Ala Thr Leu Pro Ala
 275 280 285

Ser Asp Gly Gln Asp Arg Pro Leu Leu Leu Gln Thr Phe Thr Gln Pro
 290 295 300

Leu Phe Gly Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Leu Gly
 305 310 315 320

Gly Ala Thr Gly Phe Gly Glu Ala Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ala
 325 330 335

Leu Glu Arg Gln Gln Arg Gln Arg His Gln Ala Leu Thr Pro
 340 345 350

<210> 5
 <211> 357
 <212> PRI
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ ID No. 2编码的蛋白

<220>

[0005]

<221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Ala

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(8)
 <223> 6个His构成的His标签

 <400> 5

 Met Ala His His His His His Asn Pro Ser Ile Arg Ile Val Gln
 1 5 10 15

 Gly Ile His His Leu His Phe Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Arg
 20 25 30

 Glu His Phe Cys Arg Val Trp Gly Phe Arg Val Ala Ser Asp Ala Gly
 35 40 45

 Asn Thr Leu Glu Leu Glu Gln Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln
 50 55 60

 Pro Ala Arg Ala Gly Asp Glu Val Asp Arg His Leu Gln Arg His Gly
 65 70 75 80

 Pro Gly Val Val Asp Val Ala Leu Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Pro
 85 90 95

 Ala Leu Ala Glu Leu Leu Arg Gly Arg Gly Ala Gln Leu Ala Trp Ile
 100 105 110

 Pro Ala Ala Ala Ala Leu Cys Leu His Thr Pro Tyr Gly Ile Arg His
 115 120 125

 Ser Leu Ile Pro Gly Pro Leu Asp Ala Ala Pro Ala Glu Ala Gly Leu
 130 135 140

 Phe Ser His Trp Asp His Val Val Leu Asn Val Glu Gln Gly Ser Leu
 145 150 155 160

 Gln Ala Ala Ala Asp Trp Tyr Gly Arg Val Leu Gly Trp Arg Arg Leu
 165 170 175

 Tyr Arg Tyr Ser Ile Gly Thr Ala Thr Ser Gly Leu Glu Ser Val Val
 180 185 190

 Val Gly Asp Pro Glu Ala Gly Ile Gln Trp Ala Ile Asn Glu Pro Thr
 195 200 205

 Cys Ala Ala Ser Gln Ile Gln Glu Phe Leu His Ala His Gly Gly Pro
 210 215 220

 Gly Ile Gln His Ala Ala Leu His Ser Ser Asp Ile Val Ala Ser Leu
 225 230 235 240

 Arg Arg Leu Arg Gln Gly Gly Val Asp Phe Leu Gln Val Ala Pro Gln
 245 250 255

[0006]

Tyr Tyr Thr Ser Leu Glu Arg Glu Leu Gly Leu Ala Leu Arg Ser Ala
 260 265 270
 Leu Gly Gln Ala Ile Ser Trp Gln Asp Leu Val Glu Gln Gln Ile Leu
 275 280 285
 Leu Asp Ala Thr Leu Pro Ala Ser Asp Gly Gln Asp Arg Pro Leu Leu
 290 295 300
 Leu Gln Thr Phe Thr Gln Pro Leu Phe Gly Arg Pro Thr Phe Phe Phe
 305 310 315 320
 Glu Val Ile Gln Arg Leu Gly Gly Ala Thr Gly Phe Gly Glu Ala Asn
 325 330 335
 Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gln Arg Gln Arg His
 340 345 350
 Gln Ala Leu Thr Pro
 355
 <210> 6
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 与经优化的转运肽 (WO 2009/144079) 融合的聚球藻属物种 HPPD氨基酸序列 (SEQ ID No. 4)
 <220>
 <221> TRANSIT
 <222> (1)..(125)
 <223> 至叶绿体的经优化的转运肽
 <400> 6
 Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
 20 25 30
 Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
 35 40 45
 Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
 50 55 60
 Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
 65 70 75 80
 Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly
 85 90 95
 Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser
 100 105 110
 Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Asn Pro
 115 120 125

[0007]

Ser Ile Arg Ile Val Gln Gly Ile His His Leu His Phe Tyr Leu Trp
 130 135 140
 Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu His Phe Cys Arg Val Trp Gly Phe Arg
 145 150 155 160
 Val Ala Ser Asp Ala Gly Asn Thr Leu Glu Leu Glu Gln Gly Ser Leu
 165 170 175
 Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala Arg Ala Gly Asp Glu Val Asp Arg
 180 185 190
 His Leu Gln Arg His Gly Pro Gly Val Val Asp Val Ala Leu Ala Val
 195 200 205
 Gly Glu Gln Glu Leu Pro Ala Leu Ala Glu Leu Leu Arg Gly Arg Gly
 210 215 220
 Ala Gln Leu Ala Trp Ile Pro Ala Ala Ala Ala Leu Cys Leu His Thr
 225 230 235 240
 Pro Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu Ile Pro Gly Pro Leu Asp Ala Ala
 245 250 255
 Pro Ala Glu Ala Gly Leu Phe Ser His Trp Asp His Val Val Leu Asn
 260 265 270
 Val Glu Gln Gly Ser Leu Gln Ala Ala Ala Asp Trp Tyr Gly Arg Val
 275 280 285
 Leu Gly Trp Arg Arg Leu Tyr Arg Tyr Ser Ile Gly Thr Ala Thr Ser
 290 295 300
 Gly Leu Glu Ser Val Val Val Gly Asp Pro Glu Ala Gly Ile Gln Trp
 305 310 315 320
 Ala Ile Asn Glu Pro Thr Cys Ala Ala Ser Gln Ile Gln Glu Phe Leu
 325 330 335
 His Ala His Gly Gly Pro Gly Ile Gln His Ala Ala Leu His Ser Ser
 340 345 350
 Asp Ile Val Ala Ser Leu Arg Arg Leu Arg Gln Gly Gly Val Asp Phe
 355 360 365
 Leu Gln Val Ala Pro Gln Tyr Tyr Thr Ser Leu Glu Arg Glu Leu Gly
 370 375 380
 Leu Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Gln Ala Ile Ser Trp Gln Asp Leu
 385 390 395 400
 Val Glu Gln Gln Ile Leu Leu Asp Ala Thr Leu Pro Ala Ser Asp Gly
 405 410 415
 Gln Asp Arg Pro Leu Leu Leu Gln Thr Phe Thr Gln Pro Leu Phe Gly
 420 425 430

[0008]

Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Leu Gly Gly Ala Thr
 435 440 445

Gly Phe Gly Glu Ala Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ala Leu Glu Arg
 450 455 460

Gln Gln Arg Gln Arg His Gln Ala Leu Thr Pro
 465 470 475

<210> 7
 <211> 482
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> SEQ ID No. 3编码的蛋白

<220>
 <221> TRANSIT
 <222> (1)..(125)
 <223> 至叶绿体的经优化的转运肽

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (126)..(126)
 <223> Met

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (127)..(127)
 <223> Ala

<220>
 <221> MISC FEATURE
 <222> (128)..(133)
 <223> 由6个His构成的His标签

<400> 7

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
 20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
 35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
 50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
 65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly
 85 90 95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser
 100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Ala His
 115 120 125

[0009]

His His His His His Asn Pro Ser Ile Arg Ile Val Gln Gly Ile His
 130 135 140
 His Leu His Phe Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu His Phe
 145 150 155 160
 Cys Arg Val Trp Gly Phe Arg Val Ala Ser Asp Ala Gly Asn Thr Leu
 165 170 175
 Glu Leu Glu Gln Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala Arg
 180 185 190
 Ala Gly Asp Glu Val Asp Arg His Leu Gln Arg His Gly Pro Gly Val
 195 200 205
 Val Asp Val Ala Leu Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Pro Ala Leu Ala
 210 215 220
 Glu Leu Leu Arg Gly Arg Gly Ala Gln Leu Ala Trp Ile Pro Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Leu Cys Leu His Thr Pro Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu Ile
 245 250 255
 Pro Gly Pro Leu Asp Ala Ala Pro Ala Glu Ala Gly Leu Phe Ser His
 260 265 270
 Trp Asp His Val Val Leu Asn Val Glu Gln Gly Ser Leu Gln Ala Ala
 275 280 285
 Ala Asp Trp Tyr Gly Arg Val Leu Gly Trp Arg Arg Leu Tyr Arg Tyr
 290 295 300
 Ser Ile Gly Thr Ala Thr Ser Gly Leu Glu Ser Val Val Val Gly Asp
 305 310 315 320
 Pro Glu Ala Gly Ile Gln Trp Ala Ile Asn Glu Pro Thr Cys Ala Ala
 325 330 335
 Ser Gln Ile Gln Glu Phe Leu His Ala His Gly Gly Pro Gly Ile Gln
 340 345 350
 His Ala Ala Leu His Ser Ser Asp Ile Val Ala Ser Leu Arg Arg Leu
 355 360 365
 Arg Gln Gly Gly Val Asp Phe Leu Gln Val Ala Pro Gln Tyr Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Leu Glu Arg Glu Leu Gly Leu Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Gln
 385 390 395 400
 Ala Ile Ser Trp Gln Asp Leu Val Glu Gln Gln Ile Leu Leu Asp Ala
 405 410 415
 Thr Leu Pro Ala Ser Asp Gly Gln Asp Arg Pro Leu Leu Leu Gln Thr

[0010]

<211> 445
 <212> PRT
 <213> 拟南芥
 <400> 9
 Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
 20 25 30
 Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
 35 40 45
 His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
 50 55 60
 Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
 65 70 75 80
 Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
 85 90 95
 Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
 100 105 110
 Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
 115 120 125
 Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
 130 135 140
 Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160
 Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile
 165 170 175
 Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr
 180 185 190
 Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg
 195 200 205
 Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu
 210 215 220
 Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr
 225 230 235 240
 Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp
 245 250 255
 Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser
 260 265 270
 Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr

[0012]

Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn
 50 55 60

Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys
 65 70 75 80

Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr
 85 90 95

Ser Gly Asp Leu Arg Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu
 100 105 110

Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe
 115 120 125

Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val
 130 135 140

Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile
 145 150 155 160

Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn
 165 170 175

Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu
 180 185 190

Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu
 195 200 205

Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr
 210 215 220

Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly
 225 230 235 240

Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala
 245 250 255

Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser
 260 265 270

Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu
 275 280 285

Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu
 290 295 300

His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp
 305 310 315 320

Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly
 325 330 335

Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys
 340 345 350

[0014]

Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu
355 360 365

Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln
370 375 380

Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile
385 390 395 400

Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr
405 410 415

Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu
420 425 430

Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu
435 440 445

Val Gly
450

<210> 11
<211> 568
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID No. 9的蛋白, 加上位于所述蛋白最N-末端的优化的转运肽序列

<220>
<221> TRANSIT
<222> (1)..(125)
<223> 至叶绿体的经优化的转运肽

<220>
<221> TRANSIT
<222> (1)..(125)
<223> 至叶绿体的经优化的转运肽

<400> 11

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly
85 90 95

[0015]

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser
 100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Gln Asn
 115 120 125

Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp Gly Ala Ala Ser Ser
 130 135 140

Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro
 145 150 155 160

Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His His Ile Glu Phe Trp
 165 170 175

Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly
 180 185 190

Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Met Val His
 195 200 205

Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg Phe Leu Phe Thr Ala
 210 215 220

Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr
 225 230 235 240

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser
 245 250 255

Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala
 260 265 270

Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser
 275 280 285

Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu
 290 295 300

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr
 305 310 315 320

Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser
 325 330 335

Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly
 340 345 350

Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr
 355 360 365

Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala
 370 375 380

Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser Asn Asp Glu Met Val
 385 390 395 400

[0016]

Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln
405 410 415

Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Leu Gln His Leu
420 425 430

Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys
435 440 445

Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr
450 455 460

Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp
465 470 475 480

Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp
485 490 495

Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro
500 505 510

Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Met Lys Asp
515 520 525

Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys
530 535 540

Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr
545 550 555 560

Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
565

<210> 12
<211> 575
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> SEQ ID No. 10的蛋白, 加上直接位于所述蛋白最N-末端的优化的转运肽序列

<220>
<221> TRANSIT
<222> (1)..(125)
<223> 至叶绿体的经优化的转运肽

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (126)..(126)
<223> Met

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (127)..(127)
<223> Ala

<220>
<221> MISC FEATURE
<222> (128)..(133)
<223> 由6个His构成的His标签

<400> 12

[0017]

Met Ala Ser Ile Ser Ser Ser Val Ala Thr Val Ser Arg Thr Ala Pro
1 5 10 15

Ala Gln Ala Asn Met Val Ala Pro Phe Thr Gly Leu Lys Ser Asn Ala
20 25 30

Ala Phe Pro Thr Thr Lys Lys Ala Asn Asp Phe Ser Thr Leu Pro Ser
35 40 45

Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Ala Tyr Gly Asn
50 55 60

Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Ser Met Ala Pro
65 70 75 80

Thr Val Met Met Ala Ser Ser Ala Thr Ala Val Ala Pro Phe Gln Gly
85 90 95

Leu Lys Ser Thr Ala Ser Leu Pro Val Ala Arg Arg Ser Ser Arg Ser
100 105 110

Leu Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys Ala Met Ala His
115 120 125

His His His His His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His
130 135 140

Asp Asp Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser
145 150 155 160

Lys Phe Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg
165 170 175

Phe His His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg
180 185 190

Arg Phe Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu
195 200 205

Ser Thr Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp
210 215 220

Leu Arg Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly
225 230 235 240

Glu Ile Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly
245 250 255

Ser Cys Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val
260 265 270

Ala Ile Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala
275 280 285

Asn Gly Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val
290 295 300

[0018]

Thr Ile Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val
 305 310 315 320
 Ser Tyr Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe
 325 330 335
 Glu Arg Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg
 340 345 350
 Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu
 355 360 365
 Thr Tyr Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr
 370 375 380
 Ala Asp Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Ser Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His
 405 410 415
 Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu
 420 425 430
 Gly Ala Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg
 435 440 445
 Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe
 450 455 460
 Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val
 465 470 475 480
 Gly Asp Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly
 485 490 495
 Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr
 500 505 510
 Lys Pro Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg
 515 520 525
 Val Gly Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly
 530 535 540
 Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser
 545 550 555 560
 Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
 565 570 575

<210> 13
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0019]

<220>
 <223> 引物XhoI-OTP-for

<400> 13
 ctcgagatgg cttegatete ctcctc 26

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物NcoI-OTP-rev

<400> 14
 cccatggcgc accgattct tccgcc 26

<210> 15
 <211> 1080
 <212> DNA
 <213> 聚球藻属物种

<400> 15
 atgaaccagt ccaatagaat cgtccaagg atccatcace tgcacttcta tctttgggat 60
 ctgccccgtt ggcaggaaca cttttgtaa gtttgggct tccgaatga aggacagctc 120
 ggcagtacc tctgtctgcg tcaggatcc ctgccttgc gcctatctca gccgctcac 180
 gccgggatg aggtggatcg ctatttgcag caacattcgc ctggcgtggt ggatgtggcc 240
 tttagcgttg tggagcaaga gctgttgggc ttgacagagc ttctgcagag gcgaggagcc 300
 caagtggagt ggatcccgc agaagaggaa ggcggcccca ctctgcgct gcgcaccccc 360
 taiggaactt ggcattcttt getccccgc tcaggatcc ccgattcagc ccttctgag 420
 gagaacctgt tttcccactg ggcacacctg gtattgaac tggagcagg atccctgcag 480
 gcagcggcgg attggtatga gcaggtctg gtttggcgt ctctgtatcg ctatagcatc 540
 cgcaccaaca cctctggcct agaaagtgtg gtgtgggag atccfgaagc cgggatccag 600
 ttggccatca acgagccac ctgtccgct tccagatcc aggagttttt ggatgccat 660
 catggccctg gctgcaaca tgcggcgttg cacagctcag atgtcttgc cagtgtgccc 720
 cggctgcgac agggaggcgt aaactttctg caggtgccac cggagtacta cacaacctg 780
 gcaaggagc tggcttctgg agcaafactc cgttctggtg gtttgcctcc cgcctctcc 840
 tggcagact tgggtggaca gcagctcctt ttggatgcca ccttgcctgc ttctgatcc 900
 ccacaccccc cctgtttgtt gcaaaccttc actcagctc tgtttggtcg gcccaagttt 960
 tttttcagg tcatccaacg attgggtgga gccacaggct ttggcgaagc caactttcaa 1020
 gccctgtttg aagetctaga acgccaacag cgacaacggc agcaagcct ggtctgctaa 1080

<210> 16
 <211> 359
 <212> PRT
 <213> 聚球藻属物种

<400> 16

Met Asn Gln Ser Asn Arg Ile Val Gln Gly Ile His His Leu His Phe
 1 5 10 15

Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Gln Glu His Phe Cys Gln Val Trp
 20 25 30

[0020]

Gly Phe Arg Met Glu Gly Gln Leu Gly Ser Thr Leu Cys Leu Arg Gln
 35 40 45
 Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala His Ala Gly Asp Glu
 50 55 60
 Val Asp Arg Tyr Leu Gln Gln His Ser Pro Gly Val Val Asp Val Ala
 65 70 75 80
 Leu Ala Val Val Glu Gln Glu Leu Leu Gly Leu Ala Glu Leu Leu Gln
 85 90 95
 Arg Arg Gly Ala Gln Val Glu Trp Ile Pro Ala Glu Glu Glu Gly Gly
 100 105 110
 Pro Thr Leu Arg Leu Arg Thr Pro Tyr Gly Leu Arg His Ser Leu Leu
 115 120 125
 Pro Gly Ser Gly Ile Pro Asp Ser Ala Pro Ala Glu Glu Asn Leu Phe
 130 135 140
 Ser His Trp Asp His Leu Val Leu Asn Val Glu Gln Gly Ser Leu Gln
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Asp Trp Tyr Glu Gln Val Leu Gly Trp Arg Ser Leu Tyr
 165 170 175
 Arg Tyr Ser Ile Arg Thr Asn Thr Ser Gly Leu Glu Ser Val Val Val
 180 185 190
 Gly Asp Pro Glu Ala Gly Ile Gln Leu Ala Ile Asn Glu Pro Thr Cys
 195 200 205
 Ala Ala Ser Gln Ile Gln Glu Phe Leu Asp Ala His His Gly Pro Gly
 210 215 220
 Leu Gln His Ala Ala Leu His Ser Ser Asp Val Phe Ala Ser Val Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Gln Gly Gly Val Asn Phe Leu Gln Val Pro Pro Glu Tyr
 245 250 255
 Tyr Thr Asn Leu Ala Arg Glu Leu Ala Ser Gly Ala Ile Leu Arg Ser
 260 265 270
 Gly Gly Leu Pro Pro Ala Ile Ser Trp His Asp Leu Val Glu Gln Gln
 275 280 285
 Leu Leu Leu Asp Ala Thr Leu Pro Ala Ser Asp Ser Pro His Pro Pro
 290 295 300
 Leu Leu Leu Gln Thr Phe Thr Gln Pro Leu Phe Gly Arg Pro Thr Phe
 305 310 315 320
 Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Leu Gly Gly Ala Thr Gly Phe Gly Glu

[0021]

325	330	335
Ala Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ala Leu Glu Arg Gln Gln Arg Gln 340	345	350
Arg Gln Gln Ala Leu Val Cys 355		
<210> 17 <211> 1056 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 针对双子叶植物优化的编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种HPPD的核酸序列		
<400> 17 atggctaace catcattag gatcgttcag ggaatccatc accttcaett ctacctttgg 60 gatcttccaa ggtggagaga gcattttctgt agagtttggg gattcagagt tgcctctgat 120 gctggaaca ctcttgaact tgagcaagga tctcttagge ttaggettte tcaaccagct 180 agagctgggt atgaagtga taggeatctt caaagacatg gaccaggtgt tgttgatggt 240 gctcttgcgt ttggagaaca agaacttcca gctcttgcgt aaettcttag aggaaggggt 300 gctcaacttg cttagattcc agctgctgct gctctttgcc ttcatactcc atacggaatt 360 aggeactccc ttattccagg aecacttgat getgetccag ctgaggetgg actttttct 420 cattgggate acgttgttct taatgtggag cagggatctc ttcaagetgc tgetgattgg 480 tatggaagag ttctttgatg gcgtagactt taccgttact ccatacggaa tgetacttca 540 ggacttgagt ctgtttgtgt tggagatcca gaggetggca ttcaatgggc tatcaacgaa 600 cctacttgcg ctgettctca gattcaagag ttcttcatg ctcatggtgg accaggtatt 660 caacatgctg ctctccactc ttcagatatt gtggcttctc ttagaagget taggcaaggt 720 ggagttgatt tecttcaagt ggetccacag tactatactt ctcttgagag agagcttggg 780 ctgtctetta gatetgetct tggacagget atttcttggc aggatcttgt tgagcagcag 840 atttctcttg atgetactct tccagettct gatggacaag ataggecact tttgetccaa 900 actttcactc aaccactttt cggaaaggcca acattcttct tcgaagtgat tcaaagaett 960 ggaggtgcta ctggatttgg agagctaat ttccaagctc ttttcgaggc tctttaaagg 1020 caacaaagcc aaaggcatca agctcttact ccatga 1056		
<210> 18 <211> 1056 <212> DNA <213> 人工序列		
<220> <223> 针对玉米植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列		
<400> 18 atggcaaaacc cgtccattcg aattgtccaa gggatecace acctgcactt ctacctttgg 60 gatctgcccc gttggcggga acacttttgt cgggtttggg gcttccgggt ggcaagegac 120 gccggcaaca ccttgagct ggagcagga tccctgcgt tgcgctgtc tcagecggca 180 cgggcggggg acgaggtgga ccgccattg cagcggcatg ggccgggggt ggtggatgtg 240 gccttggcgg tgggagagca ggagctaacg gccttggcgg agctgttgcg gggccgagge 300		

[0022]

gcccaactgg cgtggatccc ggcagcagcg ggcctctgcc tccacacccc ctacgggata 360
 cggcattctc tgatccctgg ccccttggat gccgcccctg ccgaagcggg cctgttttcc 420
 cactgggata acgtgggtgtt gaacgtggag cagggatecc tgcaggcggc agccgactgg 480
 taigggcggg tgetgggctg gcggcggctg taccgctaca geatcggcac cggcacctcc 540
 ggcttggaaa gcgtgggtgtt ggggatccg gaagcgggga tccaatgggc catcaacgag 600
 cccacctgtg ccgcttccca gattcaggag tttttgcatg cccatggcgg cccgggcatt 660
 cagcagcggc cgetgcacag ctcagacatt gttgccagcc tgcgcccgtt gcggcagggg 720
 ggagtggact ttttcaagt ggcgcgcag tactacaaca gectggaaag ggagctgggg 780
 ttggcgtccc gttctgccc tgggcaggcc atctcctgga aagacctggt ggagcagcag 840
 atccttctgg atgetacct gcccgcttct gatggccagg atcgcccctc tctgctgcag 900
 acccttaccg agcccctctt tggctggccc acccttttct ttgaagtcat tcaacgcta 960
 ggccgggcca cgggcttgg cgagccaat ttccagctt tgttcgagge cctggaacgg 1020
 caacagcgac agcgacacca ggcctgacc ccttga 1056

<210> 19

<211> 1056

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 针对欧洲油菜植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 19

atggctaate ctagtatcag aattgtgcaa ggaatacacc acttgcattt ctacctctgg 60
 gatctgccga gatggcgtga gcatttctgc agagtgtggg gattccgcgt agcttccgac 120
 gctgaaaca cgttgaact tgagcaggga tcatgagge ttagactcag tcaaccagct 180
 agagctgggg atgaggtaga tagacacttg cagagacatg gaccgggtgt cgtggacgtt 240
 gcgctggctg tgggtgaaca agaacttccg gctctcgtg aactcttgag ggttagaggt 300
 gctcaattgg cgtggattcc agctgcagcc gcactttggt tgcatacgc gtacggata 360
 aggcattcat taattccagg acccctagat gctgcccag cagaggctgg aettttctcc 420
 cactgggacc acgtgggtct aaacgtcag cagggatecc tacaagccgc tgcggattgg 480
 tatggtaggg tctcgggtg gagaagacta tatagatact ccatcggtag ggcaacaagc 540
 ggtttggaat ccgtgtgctg tggggacccc gaagcaggga tccagtgggc cafaaacgaa 600
 ccgacatgtg eggetagtca gattcaggaa itctacacg cacacgggtg acccggeatc 660
 cagcatgccg cctccatc aagcagatc gttgcttctc taagcagact tagacaggga 720
 ggggttgact tcttgcaggg ggccccgcaa tactatacca gcttggagag agaattgggt 780
 ctccgattgc gttccgctt agggcaggca atctctggc aagatcttgt cgagcaacaa 840
 atcttaactg acgctacttt gccagcaagt gatgtcaag atcgccaact cttaactaaa 900
 acgttcaact aaccgctctt cggagaccg actttttttt tcaagttaa ccagcgaact 960
 ggaggggcta ctgatttgg ggagcaaac ttcaagcac tgttcgaagc tctggagcgc 1020
 cagcagagac aacggcatca gctttgact ccttaa 1056

<210> 20

[0023]

<211> 1056
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 针对甜菜 (*Beta vulgaris*) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 20

```
atggctaacc cttctattcg tattgtgcag gggattcacc accitcattt etatttgtgg    60
gatcttccgc gatggcgtga gcacttttgt cgagtatggg gatttcgtgt agctagtgat    120
getgaaaaca cactogaact cgaacaggga tcgttaaggt tacgactaag ccagccggca    180
agagcaggag atgaagtga caggcatcta caaagacatg gteccggcgt tgttgatgta    240
gctcttctcg ttggggaaca agagttacce gctttggcag aattacttag agggcggggg    300
gctcaacttg cctggatacc tgctgcagcg gccctttgct tacatacccc itacggata    360
agacactcgc ttattccagg accacttgac gccgcaccag ctgaggcagg cctcttttagc    420
cattgggate atgttggtgt gaacgttgaa cagggcagcc tccaagcagc tgctgattgg    480
tatggtcggg tcttggcctg gagaaggta tacaggtata gcctcggfac cgtactagt    540
ggtttgaaa gtgttgtgtg tggagacct gaageggta tccagtgggc tatcaacgaa    600
cctacatgtg ctgccagtea aatcaggaa ttccttcacg cacatggigg tccaggaaac    660
caacatgctg ctttacacag ttctgatata gtggcatcac tgcgtaggtt gegacagggc    720
ggggttgatt tccttcaggt cgtctctcaa tattacactt cctttgagag ggaacttga    780
ttggcgttaa ggtccgctct tggtcaggt ataagttggc aagatctctg ggagcagcaa    840
atcttactcg atgcaacatt gccagcctca gacggtcagg atagacctct attattgcaa    900
acttttacac aacctctttt eggtagacca acattctttt ttgaggttat acaacgctta    960
ggtggggcga ctggatttgg tgaggccaat ttccaggett tgtttgaagc ccttgaaagg   1020
cagcaacgtc aaagacacca ggccttaaca ccataa                               1056
```

<210> 21
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 针对陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 21

```
atggctaaccc egagtalccg tatigtacaa ggcattcacc acclacactt ttacccttgg    60
gatctgcaaa ggtggaggga gcatttctgt agagtttggg gctttcgtgt cgcaagtgc    120
gcaggtaata ccttgaact ggagcagggt tcacttaggt taagactgtc teagcctgea    180
agagctgggg acgagggtga ccgicattta caaagacatg gccctggggg cgtagatgta    240
gccctggcgg tgggggagca agaactacce gccctggcgg aacttttacg tggtegggt    300
gcccacttgg cgtggattcc tgcagcagct gcactttgtc tgcatacgcc itacggatt    360
cgccactccc ttatcccggg accattggat gctgctcggc ctgagccggg gctattttcg    420
cattgggate atgtagtctt gaacgtagaa caaggaagtc tccaggcggc tgccgattgg    480
tatggacggg factgggttg gagcggett taccggtacl caattggcac tgcactctet    540
ggtttagaaa gtgttgtgtg ggggatcct gaggccgta tccaatgggc gattaatgaa    600
cctacttgeg cagcctccca gattcaagag tttttgatg ctcacggggg tccgggtatc    660
```

[0024]

caacacgctg ctcttcacag tagcgatatac gttgcctctc tgagaagatt gagacaagga 720
 ggagttgatt tcttgcaggt tccccctcaa tattatacaa gtctggagag ggagcttggc 780
 ctggcccttc gaagtgcaat ggtcaagcg atatcctggc aagatctcgt agaacaacag 840
 attttgcttg atgcaacgct acctgcatcg gatggteaag atagaccttt attgcttcaa 900
 acatttacce aaccattgit cggtaggcca actttttttt ttgaggtgat tcagaggttg 960
 ggagcgcta ctggatttgg ggaggcaaat ttcaggcct tatttgagge actggaaagg 1020
 cagcaacgcc aaagacacca ggccttgact ccatga 1056

<210> 22
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 针对大豆 (Glycine max) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 22
 atggcaaatc ctagtatacg catgtccag ggaatteacc atcttcaactt ttacctctgg 60
 gatcttecta ggtggagaga gcatttctgt agagtttggg gatttagggt cgcgtctgat 120
 gctgtaata cacttgaatt ggaacaggge tcaactacgt tgcgtcttag tcaacctcgt 180
 cgtgctggcg atgaggttga ccgccatttg caaagacacg ggccccgggt tgcgatgtt 240
 gctctggctg tgggtgaaca agaattgcc gccttggcgg agcttttgag gggtaggggg 300
 gcacaattgg catggatecc agcagcagcc gctctttgtt tgcacactcc atacggtatt 360
 agaacctcac ttatacctgg tccgctggat gcagcacctg cggaagetgg actcttttca 420
 cattgggate atgttctgct caacgttga caggctctt tacaggcggc agctgattgg 480
 tatggccgtg tgettggatg gagaegactg tacagatact ctatcggaac tgaacctct 540
 ggtcttgaat ccgtagtgtg tggagateca gaagctggca ttcagtgggc tatcaacgaa 600
 ccaacctgtg ctgcatccca aatteaggaa tttctgcaig etcatggtgg tccaggaata 660
 caacatgctg caettcactc tcttgacatt gttgcctctc tccgcagact gagacagggg 720
 ggggttgact tctccaagt tctctctcag tattatacct ccttgaag agaaactaggg 780
 ctggctctcc gatctgctt gggcaagca atctcatggc aagatctcgt ggagcagcaa 840
 atactacttg atgcaacgtt gctgcatct gacggtcagg acagaccact actcctgcaa 900
 acatttaccg aaccactgit tggagacce acattctttt tcgaggtgat ccaaagctc 960
 ggcggggcta ctggttttgg ggaggetaac ttcaggcct tgttcagagge tcttgagagg 1020
 cagcagcgac agaggcacca agcactaaca ccttag 1056

<210> 23
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 针对大麦 (Hordeum vulgare) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 23
 atggctaate ccagcattcg catcgtgcaa gggatccacc acctgcattt ctatctgtgg 60
 gatttgcgcg cctgggggga gcatttctgt cgagtctggg gcttccgtgt cgccagcgat 120

[0025]

geggtaaca cattagaact cgaacaagge tegtgegcc ttgccttcc acageggcg	180
eggctggcg acgaggtga cegccactt cagcgacacg gtcctggcgt cgttgacgta	240
gtctctctg taggggaaca agagctgcca gegtctggc aactgtctcg tggccgggt	300
gtctagctgg catggatccc cgcgcagcg gccctgtgtc tccacacccc gtacggfatt	360
cgccattccc tcatccggg gccctcgac gcgcgcgcc cgaagcggg tctttcagc	420
cattgggacc acgtcttct gaacgtttag caggcgact tcaagcggc gcccgactgg	480
taeggcagag tcttgggtt gaggaggctc tacaggtatt ctattggtac tgcacgtcc	540
ggccttgagt ctgtctctg cgggatccg gagccggta tacaatggc tatcaacgaa	600
ccgacctgtg ctgcctcga gatccaggaa ttctctcag cccacgggg gccggggatc	660
cagcacggg cgtccattc ttctgacatc gtggcgtcat tgggaggct gagacaggc	720
ggcgtggact tctccaggc cgtccacag tattacactt cgttggaac cgattgggc	780
ttggcctta gatccgctt ggccaggcc atctctggc aagatctgtt ggagcagcag	840
attctcctg atgcaaacct tccgcatcc gaaggccagg ataggcctct gctactccaa	900
acattcacc agccctctt cgcagacc cacttttct tgaagtgat ccagaggtta	960
ggcggggcaa caggcttgg agaggccaac ttccaggccc tcttggaggc gttggagcgc	1020
caacagcggc agcggcacc gccctaac ccttga	1056

<210> 24
 <211> 1056
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 针对稻 (*Oryza sativa*) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列

<400> 24	
atggcgaatc cgtctatccg tattgtccag ggtattcacc acctgcactt ctatctgtgg	60
gaacctccctc ggtggagaga gaactctgc cgggtctggg ggttcagggt gccctccgac	120
geggcaaca ctttggaaact tgaacaggga agtttgagat taagacttag tcagccagcc	180
agggcaggag atgagggtga tagacacctc caacgcatg gccctggcgt cgttagcgtg	240
gccttagcgg tgggtgaaca ggagctccca gccctggccg agctccttag ggtctcgggt	300
gcacagttgg catggatacc tgcgcctct gactctgcc tgcatacgc ctatggaatt	360
cgcattcac taatacccgg accccttgc gctgcctct cagagcggg cctgttccgc	420
cattgggacc acgttgcct caacgtcga caaggtcac tgcagcagc gccagactgg	480
tatggacggg tcttgggtt gcgtcactc taaccgtaca gcattgggac cgaaccagt	540
ggcctggaat cgttggctgt cggagaccg gaggtggca ttcagtggc catcaacgag	600
cctacatcgc cagcttcca gatcaggag ttctctcatg cccacgggg cccgggaate	660
caacacgcc cttacatag ctggatatt gtccttctc tcaggagggt gaggcaaggt	720
ggtgttgatt tctccaggc cgcaccacag tactacactt cgttggagc cgactcggc	780
ttggccttgc ggtcggctct cggccaggct atatcatgga aagacctgtt ggaacaacag	840
attctgctag atgcaacgt cccagctagc gacgggcaag acagaccact gctactcag	900
acgttccgc aaccactttt tggctggcct acattctct tgaagtgat tcagcgtctt	960
ggagcgccta ccggttggg ggaagctaat ttcaagctc tgttgaagc gctggagcgt	1020

[0026]

caacagcgac aacgcatca agccctgaca cctga	1056
<210> 25	
<211> 1056	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 针对小麦 (<i>Triticum aestivum</i>) 植物优化的、编码从菌株JA-3-3Ab获得的聚球藻属物种 HPPD的核酸序列	
<400> 25	
atggccaacc ctagtatcgg cattgttcaa gggattcacc acctgcattt ctatctctgg	60
gatttgccca gatggaggga acactttigt agagtgtggg gattccgtgt ggctttgat	120
gcggggaata ccctcgaact ggagcaggga tctctcggc tggcgctcag ccagcccga	180
agagcaggcg acgaagtga taggcacctc cagaggeatg ggccaggtgt agtcgatgc	240
gctgtggctg tcggtgagca agagctgccc ggcctcagc agctactgcg aggcagagga	300
gcccagctgg cttggatccc cgcgcageca gccctttgcc tgcataccce atatggaatt	360
cgccactcgc tcatacctgg tcttttagc gggccccag ctgaggccgg gctctttfec	420
cattgggatc acgtcgtcct caatgtcgag cagggatccc tccaagegga tgcggactgg	480
tacggtaggg tgttagctg gcgcgcttg taccgttaca gtatcggaac agctaccage	540
ggcctagaga gtgttgtggt tggatgcca gaggcaggaa ttcagtgggc cataaacgag	600
cctacgtgcg ccgctctca gattcaagag ttcttccag cgcattggcg ccccggcacc	660
cagcagctg cgttgcatag ttccgacacc gtggcgtcgc ttaggcgget gagacaggge	720
gggtagact tctccaggt cgcctccgca tattacact ctctggaac agagctgggg	780
cttgcgtcgc ggtcagcact tggccaagct atctcatgca aagatctctg cgaacagcag	840
attctgctg acgtacact accggcgagc gatgggcagg accggccatt gctctccaa	900
acctttacc aaccgctctt cgggaggccc actttctctc tcaggtcat acagaggttg	960
ggggcgcta cagctttgg agaggcgaac ttccagccc tcttcgaagc ccttgaacga	1020
caacaaagga aacgtacca ggcgtcaca cctga	1056

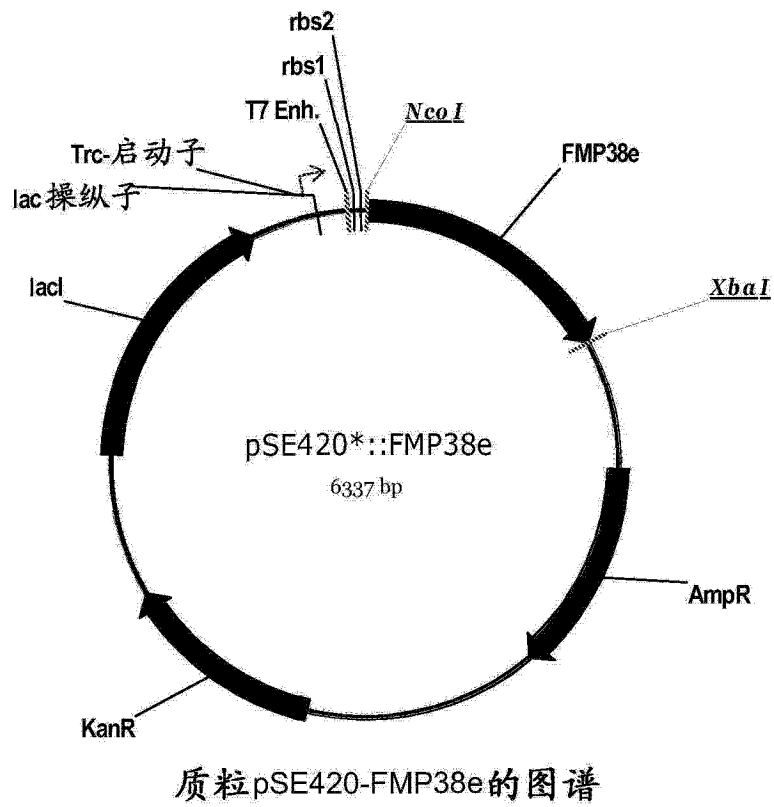


图 1

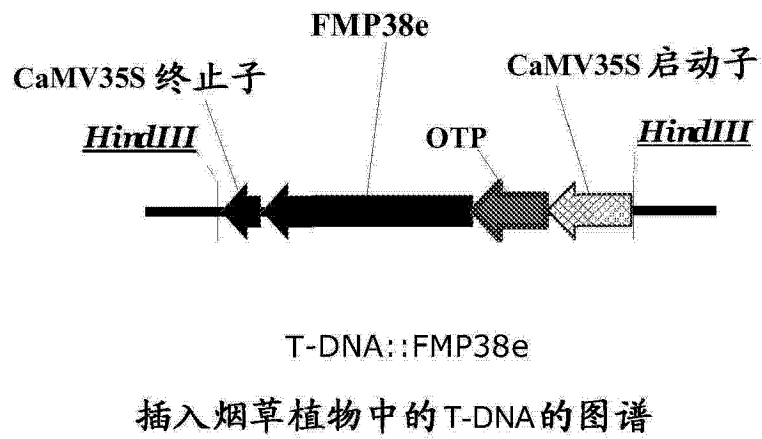
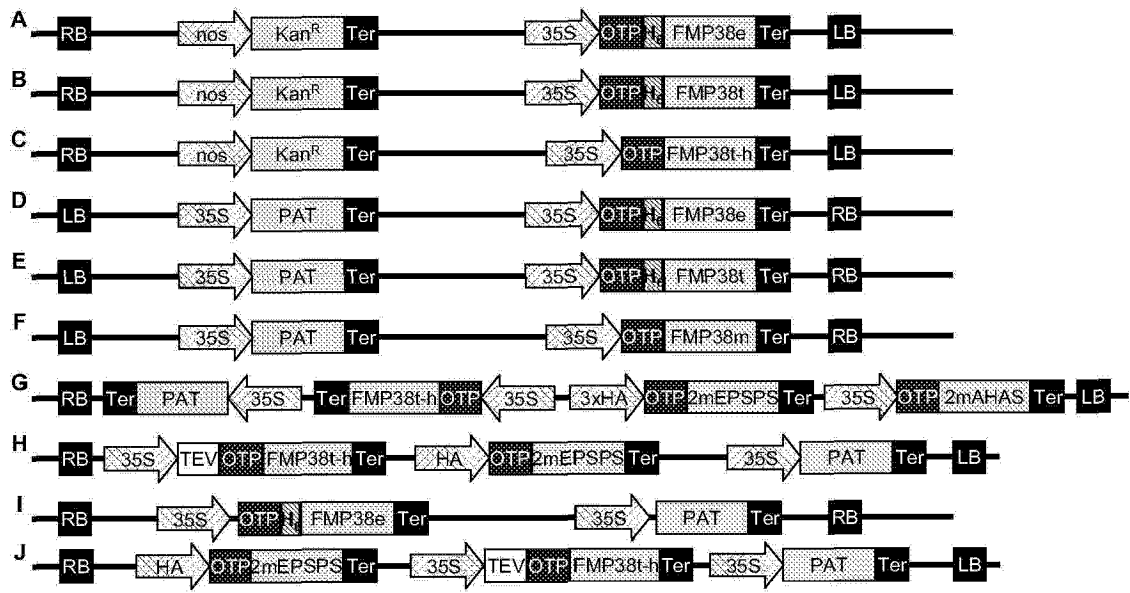


图 2



插入植物中的不同T-DNA的图谱

图 3