



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101500421 B

(45) 授权公告日 2015.04.15

(21) 申请号 200780029235.1

*A01N 57/20*(2006.01)

(22) 申请日 2007.06.06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/811,276 2006.06.06 US

11/758,653 2007.06.05 US

WO 2005107437 A2, 2005.11.17, 全文.

WO 02068607 A2, 2002.09.06, 全文.

Patricia L. Herman et al..A

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009.02.06

Three-component Dicamba O-Demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, Strain DI-6. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2005, 第280卷(第26期), 24759-24767.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/070517 2007.06.06

审查员 靳春鹏

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/143690 EN 2007.12.13

(73) 专利权人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 P·C·C·冯 R·J·布林克

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

*C12N 15/52*(2006.01)

*A01N 37/40*(2006.01)

*A01N 39/02*(2006.01)

*A01N 39/04*(2006.01)

权利要求书4页 说明书36页

序列表29页

(54) 发明名称

用于控制杂草的方法

(57) 摘要

本发明提供了用麦草畏和相关的除草剂来控制杂草的方法。发现在种植时或接近种植时可以进行麦草畏的发芽前施用而无明显的农作物损害或产量损失。该技术可以与除草剂草甘膦组合,以改善杂草控制的程度且允许控制除草剂耐受性杂草。

1. 用于控制农作物生长环境中的杂草生长的方法,其包括:
  - a) 将除草有效量的麦草畏除草剂施用于农作物生长环境;
  - b) 在施用所述除草剂的 21 天内将双子叶植物的转基因种子种植在所述农作物生长环境的土壤中,所述双子叶植物的转基因种子包含编码麦草畏降解酶活性的核酸,所述核酸选自 SEQ ID NOs :1、3、5、7、9 和 11 或编码选自 SEQ ID NOs :2、4、6、8、10 和 12 的多肽的核酸序列;和
  - c) 允许所述种子发芽成植物。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述除草剂在种子种植之前、同时或之后施用。
3. 权利要求 1 的方法,其中在所述除草剂施用前或后 12、10、7 或 3 天内将所述转基因种子种植到土壤内。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 18 天-0 天发芽。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 14 天-0 天发芽。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 7 天-0 天发芽。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述除草有效量的麦草畏是 2.5g/ha-10,080g/ha。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述核酸选自 (1) 编码 SEQ ID NO :8 的多肽的核酸序列,和 (2) 由 SEQ ID NO :7 的序列所示的核酸序列。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述双子叶植物选自苜蓿、菜豆、嫩茎花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜籽、菠菜、大豆、南瓜、番茄和西瓜。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述双子叶植物是大豆、棉花或油菜籽植物。
11. 权利要求 1 的方法,其进一步包括在所述种子发芽后施用麦草畏除草剂的第二次处理。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述第二次处理在选自下述的时间进行:1-2 叶和 3-4 叶阶段之间、在开花前、在开花时、在开花后和在种子形成时。
13. 权利要求 1 的方法,其包括允许从麦草畏除草剂的施用到第二种农作物生长环境的喷雾偏差接触所述植物,其中所述植物对于所述喷雾偏差耐受。
14. 用于控制农作物生长环境中的杂草生长的方法,其包括:
  - a) 将除草有效量的麦草畏除草剂施用于农作物生长环境;
  - b) 在施用所述麦草畏除草剂的 15 天内将单子叶植物的转基因种子种植在所述农作物生长环境的土壤中,所述单子叶植物的转基因种子表达编码麦草畏单加氧酶的核酸,所述核酸编码选自 SEQ ID NO :2、4、6、8、10 和 12 的多肽,其中所述除草有效量是不损害转基因种子或由其发芽的植物但将损害具有相同基因型但缺乏所述核酸、且与所述转基因种子在相同的条件下种植的种子或由其发芽的植物的量;和
  - c) 允许所述种子发芽成植物。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述核酸选自 (1) 编码 SEQ ID NO :8 的多肽的核酸序列,和 (2) 由 SEQ ID NO :7 的序列所示的核酸序列。
16. 权利要求 14 的方法,其中所述除草剂在所述种子种植之前、同时或之后施用。
17. 权利要求 14 的方法,其中在所述除草剂施用前或后 12、10、7 或 3 天内将所述转基因种子种植到土壤内。

18. 权利要求 14 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 18 天-0 天发芽。
19. 权利要求 14 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 14 天-0 天发芽。
20. 权利要求 14 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 7 天-0 天发芽。
21. 权利要求 14 的方法,其中所述除草有效量的麦草畏是至少 175g/ha。
22. 权利要求 14 的方法,其中所述除草有效量的麦草畏是 250g/ha-600g/ha。
23. 权利要求 14 的方法,其中所述单子叶植物选自玉米、稻、高粱、小麦、黑麦、粟、甘蔗、燕麦、黑小麦、柳枝稷和草坪草。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述单子叶植物是玉米或高粱植物。
25. 权利要求 14 的方法,其进一步包括在所述种子发芽后施用麦草畏除草剂的第二次处理。
26. 权利要求 25 的方法,其中所述第二次处理在选自下述的时间进行:1-2 叶和 3-4 叶阶段之间、在开花前、在开花时、在开花后和在种子形成时。
27. 用于控制田地中的草甘膦耐受性杂草的方法,其包括:
  - a) 在包含草甘膦耐受性杂草或其种子的田地中种植转基因种子,其中所述种子包含赋予草甘膦耐受性的转基因和编码麦草畏单加氧酶的转基因,编码麦草畏单加氧酶的转基因包含选自下述的核酸序列(1) 编码 SEQ ID NO:8 的多肽的核酸序列,和(2) 由 SEQ ID NO:7 的序列所示的核酸序列;
  - b) 使所述种子生长成植物;和
  - c) 用有效控制所述草甘膦耐受性杂草的杂草生长的量的麦草畏除草剂和草甘膦处理田地。
28. 权利要求 27 的方法,其中赋予草甘膦耐受性的转基因编码选自下述的蛋白质:草甘膦抗性 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶、草甘膦氧化还原酶、草甘膦-N-乙酰转移酶和草甘膦脱羧酶。
29. 权利要求 28 的方法,其中编码草甘膦-N-乙酰转移酶的转基因由 SEQ ID NO:18 的核酸序列所示或编码 SEQ ID NO:19 的多肽。
30. 权利要求 27 的方法,其中所述种子来自选自下述的双子叶植物:苜蓿、菜豆、嫩茎花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜籽、菠菜、大豆、南瓜、番茄和西瓜。
31. 权利要求 30 的方法,其中所述双子叶植物是大豆、棉花或油菜籽植物。
32. 权利要求 27 的方法,其中所述种子来自选自下述的单子叶植物:玉米、稻、高粱、小麦、黑麦、粟、甘蔗、燕麦、黑小麦、柳枝稷和草坪草。
33. 权利要求 32 的方法,其中所述单子叶植物是玉米或高粱植物。
34. 权利要求 27 的方法,其中处理田地选自下述的时间进行:1-2 叶和 3-4 叶阶段之间、在开花前、在开花时、在开花后和在种子形成时。
35. 权利要求 27 的方法,其中处理田地在种子发芽后进行。
36. 权利要求 27 的方法,其中处理田地在步骤 a) 前 4 周、3 周、2 周、1 周或 0 周进行。
37. 权利要求 27 的方法,其中处理田地与种子的种植同时进行。
38. 权利要求 27 的方法,其中在所述除草剂施用前或后 15、12、10、7 或 3 天内将所述转基因种子种植到土壤内。

39. 权利要求 27 的方法,其中所述转基因种子在处理土壤后 0-18、14、7 或 1 天发芽。
40. 权利要求 27 的方法,其中麦草畏的量是 2.5g/ha-10,080g/ha。
41. 权利要求 34 的方法,其中草甘膦的量是 200g/ha-1,600g/ha。
42. 权利要求 27 的方法,其中所述麦草畏除草剂和草甘膦同时施用。
43. 用于增加除草剂递送装置的使用效率的方法,其包括:
- a) 获得已用于递送包含麦草畏除草剂的第一种组合物的装置;
- b) 使用所述装置将第二种组合物递送给田地而无需首先彻底洗涤所述装置,从而使得包含麦草畏除草剂的除草剂残留物保留在所述装置中且与所述第二种组合物一起递送给田地,其中所述田地包含表达编码麦草畏单加氧酶的核酸的转基因双子叶植物,所述核酸选自 (1) 编码 SEQ ID NO :8 的多肽的核酸序列,和 (2) 由 SEQ ID NO :7 的序列所示的核酸序列,或用发芽成所述转基因双子叶植物的种子进行种植,并且其中所述除草剂残留物以不损害所述转基因双子叶植物但将损害具有相同基因型但缺乏所述编码麦草畏单加氧酶的核酸的植物的量存在。
44. 权利要求 43 的方法,其中所述双子叶植物选自苜蓿、菜豆、嫩茎花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜籽、菠菜、大豆、南瓜、番茄和西瓜。
45. 权利要求 44 的方法,其中所述双子叶植物是大豆、棉花或油菜籽植物。
46. 用于控制农作物生长环境中的杂草生长的方法,其包括:
- a) 在包含杂草或其种子的田地中种植转基因种子,其中所述转基因种子包含赋予草甘膦耐受性的转基因和赋予麦草畏耐受性的转基因,所述赋予麦草畏耐受性的转基因编码包含选自 SEQ ID NO :2、4、6、8、10 和 12 的多肽序列的麦草畏单加氧酶;
- b) 用除草有效量的麦草畏、草甘膦或其混合物处理田地,其中所述种植和所述处理在单次经过所述田地中完成;和
- c) 使所述转基因种子生长成植物。
47. 权利要求 46 的方法,其中赋予草甘膦耐受性的转基因编码选自下述的蛋白质:草甘膦抗性 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶、草甘膦氧化还原酶、和草甘膦-N-乙酰转移酶以及草甘膦脱羧酶。
48. 权利要求 47 的方法,其中编码 GAT 的转基因由 SEQ ID NO :18 的核酸序列所示,或编码 SEQ ID NO :19 的多肽。
49. 权利要求 46 的方法,其中赋予麦草畏耐受性的转基因编码包含选自下述的核酸序列:(a) 编码 SEQ ID NO :8 的多肽的核酸序列,和 (b) 由 SEQ ID NO :7 的序列所示的核酸序列。
50. 权利要求 46 的方法,其中所述转基因种子如果来自双子叶植物,那么选自苜蓿、菜豆、嫩茎花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜籽、菠菜、大豆、南瓜、番茄和西瓜。
51. 权利要求 50 的方法,其中所述双子叶植物是大豆、棉花或油菜籽植物。
52. 权利要求 46 的方法,其中所述转基因种子如果来自单子叶植物,那么选自玉米、稻、高粱、小麦、黑麦、粟、甘蔗、燕麦、黑小麦、柳枝稷和草坪草。
53. 权利要求 52 的方法,其中所述单子叶植物是玉米或高粱植物。

54. 权利要求 46 的方法,其中所述麦草畏的量是 2.5g/ha-10,080g/ha。
55. 权利要求 46 的方法,其中所述麦草畏的量是 200g/ha-1,600g/ha。

## 用于控制杂草的方法

[0001] 发明背景

[0002] 本申请要求 2006 年 6 月 6 日提交的美国临时专利申请序列号 60/811, 276 和 2007 年 6 月 5 日提交的美国专利申请序列号 11/758, 653 的优先权, 所述专利申请的公开内容整体引入本文作为参考。

[0003] 1. 发明背景

[0004] 总的来说, 本发明涉及杂草控制领域。更具体而言, 本发明涉及使用生长素样除草剂例如麦草畏来控制杂草的方法。

[0005] 2. 相关领域的描述

[0006] 杂草每年在农作物损失和使杂草处于控制下的努力付出中耗费农民数十亿美元。杂草还充当农作物疾病和昆虫害虫的宿主。在农业生产环境中由杂草引起的损失包括农作物产量的减少、降低的农作物品质、增加的灌溉成本、增加的收获成本、减少的土地价值、对家畜的损害、以及来自杂草携带的昆虫和疾病的农作物损害。杂草引起这些作用的主要方式是: 1) 与农作物植物竞争生长和发育的必需物质, 2) 引起人或动物健康问题的毒性或刺激化学物质的产生, 3) 污染农业产品和使农业土地中的物种永存的极大量种子或营养生殖部分的产生, 和 4) 必须被处理的非常大量植物的农业和非农业土地的产生。引起的损害可以是显著的。例如, 据估计由于杂草的原因, 在 1972-1976 年间玉米产量减少约 10% (Chandler, 1981)。

[0007] 在充当农作物害虫的宿主的杂草中, 例如辣辣菜 (pepperweed) 和葶苈子 (tansymustard) (播娘蒿属物种 (*Descurainia* sp.)) 在深秋、冬季和春季期间维持大群的小菜蛾。它们还是芜菁蚜虫和绿桃蚜虫的宿主。茄科 (*Solanaceae*) 的几个杂草物种是通常攻击茄子、胡椒、马铃薯和番茄的昆虫的宿主。例如, 马茄 (*Solanum carolinense* L.) 是科罗拉多薯虫的宿主, 龙葵 (*S. nigrum* L.) 是甘蓝银纹夜蛾的宿主。牵牛花是攻击番薯的昆虫特别是高毁灭性番薯象鼻虫的重要宿主。豚草充当关于曼蚊属蚊子的宿主, 和人疾病脑炎和农村丝虫病的昆虫载体。

[0008] 几种杂草是干草、牧草和牧场中不希望有的, 因为它们使家畜遭受机械性损伤。木质茎、荆棘和僵硬的种芒引起对于家畜的口和消化道的损伤; 并且某些植物的绒毛和纤维常常聚成球且阻塞肠, 特别是在马中引起严重问题。由奶牛摄入, 某些杂草尤其例如豚草、野生大蒜 (鸭蒜 (*Allium vineale* L.)) 和芥菜, 对于乳和黄油赋予显然讨厌的气味或味道。有倒钩的种子散布单位可以变得缠绕在绵羊的羊毛中, 使得极大减少它的市场价值。寄生植物例如菟丝子 (菟属物种 (*Cuscuta* sp.))、肉苜蓉 (列当属物种 (*Orobanche* sp.)) 和独脚金, 掠夺它们的宿主植物的有机粮食。

[0009] 化学除草剂多年来已提供了杂草控制的有效方法。除草剂一般可以发芽前和 / 或发芽后施用。发芽前除草剂在农作物从土壤中出现前施用于田地。此类施用一般在农作物种植之前、同时或之后不久施用于土壤。此类施用可以在农作物发芽之前杀死田地中生长的杂草, 并且还可以阻止或减少土壤中存在的杂草发芽。发芽后除草剂一般在农作物已在田地中发芽后用于杀死杂草。此类施用可以杀死田地中的杂草且阻止或减少未来的杂草发

芽。在任一情况下,除草剂可以施用于土壤的表面,与土壤混合,在植物的顶部,或通过本领域技术人员已知的任何其他方法进行施用。

[0010] 一种杂草控制策略是在播种前将除草剂例如麦草畏施用于田地。然而,将除草剂施用于田地后,农夫在用农作物种子播种田地前必须等待至少数周,从而使得除草剂已杀死大多数杂草且已降解以便不损伤播种的农作物。例如,植物对于麦草畏特别敏感,且已建议麦草畏制剂例如 Banvel™ 或 Sterling™ 在种植前 30 天施用,以便控制杂草。可以由麦草畏控制的广泛杂草列表是可获得的 (Anonymous, 2007)。除草剂对于控制较高的杂草特别有用,且更难以控制诸如马齿苋、镰刀豆、牵牛花和金荞麦的杂草。麦草畏可以用于控制对于其他除草剂不敏感的杂草。在施用 Clarity™ 后,另一种麦草畏制剂,对于控制大豆田地中的杂草已推荐对于 4-8 盎司 / 英寸比率,1 英寸降雨的最低限度积聚或过顶的灌溉随后为 14 天等待期,或对于 16 盎司 / 英寸比率,28 天等待期 (参见 VanGessel 和 Majek, 2005 中的表 22)。同样,Clarity® 标签建议它在高粱种植前至少 15 天施用。类似地,对于棉花,建议在将 Clarity® 或 Banvel® 施用于田地后在种植棉花种子前 21 天的等待期 (Craig 等人, 2005, Crop Profile for Cotton (*Gossypium hirsutum*) in Tennessee, www.ipmcenters.org/cropprofiles/docs/tncotton.html), 并且不建议发芽前和发芽后施用。等待期还依赖在任何给定时间的农作物生长环境,例如土壤的类型 (具有有机活性的土壤将更快速地降解麦草畏)、含湿量、降雨、温度以及制剂的类型和施用比率。

[0011] 已推荐除草剂 2,4-D 用于控制大豆田地中的某些杂草,例如芥菜属种、车前草、加拿大蓬和 2,4-D 敏感性一年生阔叶杂草,这是通过在种植前 7-30 天施用,其依赖比率和制剂 (酯或胺) (参见 VanGessel 和 Majek, 2005 中的表 22)。

[0012] 已成功用于控制杂草的一种方法将除草剂处理与对于除草剂耐受的农作物组合。以这种方式,通常将损害农作物的除草剂可以在农作物的生长前和期间施用而不引起损害。因此,杂草可以得到有效控制,并且新杂草控制选择可以被栽培者得到。近年来,已开发了对于几种除草剂耐受的农作物。例如,已开发了对于 2,4-二氯苯氧基乙酸 (Streber 和 Willmitzer, 1989)、溴苯腈 (Stalker 等人, 1988)、草甘膦 (Comai 等人, 1985) 和草丁膦 (phosphinothricin) (De Block 等人, 1987) 耐受的农作物。

[0013] 近来,已分离了来自嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*) (美国专利申请号: 20030135879) 的麦草畏单加氧酶 (DMO) 的基因,其涉及除草剂形式的除草剂麦草畏 (3,6-二氯邻茴香酸) 转化成无毒的 3,6-二氯水杨酸。本发明人报道 DMO 基因转化到烟草和拟南芥 (*Arabidopsis*) 内。转化的植物组织在卡那霉素上进行选择且再生成植物。然而,除草剂耐受性在未成熟的组织或幼苗或其他植物中未得到证实或提出。关于麦草畏的发芽前除草剂耐受性未得到描述。对于麦草畏的施用耐受的转基因大豆植物和其他植物在 Behrens 等人, (2007) 中得到描述。

[0014] 麦草畏是通常称为“生长素样”除草剂或“合成生长素”的一类除草剂的一个成员。这些除草剂模拟或如同称为生长素的天然植物生长调节剂起作用。生长素样除草剂看起来影响细胞壁可塑性和核酸代谢,这可以导致不受控制的细胞分裂和生长。由生长素样除草剂引起的损伤症状包括茎和柄的偏上性弯曲和扭曲,叶成杯形和卷曲,以及异常的叶形状和叶脉。

[0015] 麦草畏是低成本、环境友好的除草剂的许多生长素样除草剂之一,其已在双子叶

植物中用作发芽前除草剂（即种植前 30 天），以及在玉米、高粱、小谷粒、牧草、干草、牧场、甘蔗、芦笋、草坪和草籽农作物中用作发芽前和 / 或发芽后除草剂，以有效控制一年生和多年生阔叶杂草和几种似草的杂草 (Crop Protection Chemicals Reference, 1995)。不幸的是，麦草畏可以损害许多商用农作物，包括菜豆、大豆、棉花、豌豆、马铃薯、向日葵、番茄、烟草和果树、观赏植物和树木、以及与之接触的其他阔叶植物。大豆和棉花对麦草畏特别敏感。因此，麦草畏的施用一般必须在敏感农作物的种植前数周发生，以确保残留的麦草畏在农作物发芽前从农作物环境中充分清除。对于玉米中的发芽后杂草控制，麦草畏是用于阔叶杂草的第 5 种最广泛使用的除草剂。然而，尽管阔叶杂草控制的最佳比率是 280-560g/h(克 / 公顷)，但玉米中的平均使用比率是 168g/h，因为在较高的使用比率和在某些环境下，麦草畏可以损伤玉米。

[0016] 如上所述，目前制造商的指导在麦草畏的施用和敏感农作物的种植之间一般需要至少 30 天延迟。无法接近农作物种植的时间施用麦草畏延迟了播种时间且缩短了生长季节，从而增加了使农作物暴露于秋天的霜冻的危险。延迟还意味着农民必须经过田地 2 次；1 次用于种植和 1 次用于喷雾，从而增加了对于农民的燃料和穿着损耗 (wear-tear) 成本。将消除延迟的超过现有技术的改善将正面影响农作物的质量和数量，这可以导致且减少对于农民的经济损失。更有效的杂草控制还将减少杂草发展对于现有除草剂的抗性的危险。

#### [0017] 发明概述

[0018] 在一个方面，本发明提供了用于控制田地中的杂草生长的方法，其包括：a) 将除草有效量的生长素样除草剂施用于农作物生长环境；和 b) 将双子叶植物的转基因种子种植在农作物生长环境的土壤中，所述双子叶植物表达的转基因种子编码麦草畏单加氧酶的核酸，其中所述种子在施用除草剂的 30 天或更短时间内发芽，并且其中麦草畏单加氧酶包含与 SEQ ID NO :2 的多肽序列的至少 70% 的序列同一性；和 c) 允许种子发芽成植物。在某些实施方案中，种子在用生长素样除草剂处理生长环境后 4 周、3 周、2 周或小于 1 周内发芽。处理的生长环境可以是例如其中种植农作物的田地。可以将对于生长素样除草剂耐受的植物的种子群体种植在田地中。处理环境可以根据本领域的已知技术来进行，其中使用例如商购可得的增长素样除草剂的制剂例如麦草畏。环境包括这样的区域，即对于其希望控制杂草以及其中可以种植对于生长素样除草剂耐受的植物的种子。杂草可以在环境中与除草剂直接接触，并且环境中的土壤可以与除草剂接触，预防或减少土壤中的杂草生长。用除草剂处理环境的步骤可以在用转基因种子种植土壤的步骤之前、之后或同时进行。转基因种子可以种植到环境中的土壤内，例如在处理前或后 3 周内，包括处理前或后约 2 周、1 周到 0 周，进一步包括处理前或后约 1、2、3、4、5 或 6 天，包括与处理同时。在该方法中，种子可以例如在处理环境后约 30 天 -0 天发芽，包括处理环境后约 21、18、16、14、12、10、8、6、5、4、3、2、1 到约 0 天。该方法可以进一步包括在种子发芽和 / 或植物生长后施用生长素样除草剂的一次或多次另外处理。在某些实施方案中，第二次处理在选自下述的时间进行：约 1-2 叶和 3-4 叶阶段之间、在开花前、在开花时、在开花后和在种子形成时。在一个实施方案中，第二次处理包含施用麦草畏和 / 或 2,4-二氯苯氧基乙酸化合物 (2,4-D)。

[0019] 在本发明的方法中，生长素样除草剂可以选自苯氧基羧酸化合物、苯甲酸化合物、吡啶羧酸化合物、喹啉羧酸化合物和草除灵乙基 (benazolinethyl) 化合物。苯氧基羧酸化合物的例子包括 2,4-二氯苯氧基乙酸和 (4-氯-2-甲基苯氧基) 乙酸。在某些实施方案中，



除草有效量的 2,4-D 和 / 或 (4-氯-2-甲基苯氧基) 乙酸以约 2g/ha(克 / 公顷) - 约 5000g/ha 使用, 包括约 50g/ha- 约 2500g/ha、约 60g/ha- 约 2000g/ha、约 100g/ha- 约 2000g/ha、约 75g/ha- 约 1000g/ha、约 100g/ha- 约 500g/ha、和约 100g/ha- 约 280g/ha。在发现对本发明特别作用良好的一个实施方案中, 麦草畏作为除草剂使用。在某些实施方案中, 使用的除草有效量的麦草畏可以是约 2.5g/ha- 约 10,080g/ha, 包括约 2.5g/ha- 约 5,040g/ha、约 5g/ha- 约 2,020g/ha、约 10g/a- 约 820g/h- 约 50g/ha- 约 1,000g/ha、约 100g/ha- 约 800g/ha 和约 250g/ha- 约 800g/ha。

[0020] 在本发明的方法中, 可以使用显示出对于生长素样除草剂包括麦草畏的耐受性的植物。此种植物可以包含编码麦草畏单加氧酶的核酸。在一个实施方案中, 植物定义为包含编码麦草畏单加氧酶的核酸, 所述麦草畏单加氧酶与 SEQ ID NOs :2、4、6、8、10 或 12 中的任何一个或多个的多肽序列具有至少 70% 的同一性, 包括与这些序列具有至少约 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 和更大的序列同一性。可以进行多肽或多核苷酸比较并且如本领域已知的测定同一性, 例如使用 MEGAlign (DNASStar, Inc., 1228 S. Park St., Madison, Wis. 53715) 与缺省参数。此种软件通过指定相似性或同一性的程度来匹配相似序列。

[0021] 本发明的方法可以与显示出对于生长素样除草剂的敏感性的植物例如双子叶的 (双子叶) 植物结合使用。在某些实施方案中, 使用选自下述的双子叶植物: 苜蓿、菜豆、嫩茎花椰菜、甘蓝、胡萝卜、花椰菜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜籽、菠菜、大豆、南瓜、番茄和西瓜。在某些实施方案中, 双子叶植物是大豆、棉花或油菜籽植物。

[0022] 在另一个方面, 本发明提供了用于控制田地中的杂草的方法, 其包括: a) 在田地中种植转基因种子, 其中所述种子包含赋予对于生长素样除草剂和第二种除草剂的耐受性的转基因, b) 使种子生长成植物; 和 c) 用有效控制杂草生长的量的生长素样除草剂和第二种除草剂处理田地。在某些实施方案中, 第二种除草剂可以是草铵膦 (glufosinate) (De Block 等人, 1987)、磺酰脲 (Sathasiivan 等人, 1990)、咪唑啉酮 (U. S. 5, 633, 437 ;U. S. 6, 613, 963)、溴苯腈 (Stalker 等人, 1988)、茅草枯或 2,2-二氯丙酸 (Buchanan-Wollaston 等人, 1989)、环己二酮 (U. S. 6, 414, 222)、原卟啉原氧化酶抑制剂 (U. S. 5, 939, 602)、达草灭 (Misawa 等人, 1993 和 Misawa 等人, 1994) 或异噁唑草酮 (isoxaflutole) (W0 96/38567) 除草剂及其它。生长素样除草剂和第二种除草剂可以同时或分开施用。在一个具体实施方案中, 第二种除草剂是草甘膦, 且生长素样除草剂是麦草畏。在一个实施方案中, 植物包含与 SEQ ID NOs :1、3、5、7、9 或 11 中的任何一个或多个的核酸序列具有至少 70% 的同一性, 包括与这些序列具有至少约 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 和更大的序列同一性的核酸。

[0023] 在进一步的实施方案中, 诸如前述的植物定义为包含赋予草甘膦耐受性的转基因。草甘膦抗性 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 是本领域众所周知的, 且例如公开于美国专利 5,627,061、美国专利 5,633,435、美国专利 6,040,497、美国专利 5,094,945、W004074443 和 W004009761 中。编码草甘膦降解酶例如草甘膦氧化还原酶 (GOX, 美国专利 5,463,175) 的核酸以及编码草甘膦灭活酶例如草甘膦-N-乙酰转移酶 (GAT, 美国专利公开 20030083480 ;美国专利公开 20070079393) 和草甘膦脱羧酶 (W005003362 和美国

专利申请 20040177399) 的核酸也是已知的。在某些实施方案中, GAT 酶包含 GAT4601 的序列 (SEQ ID NO :19), 或由包含 SEQ ID NO :18 的核酸序列的转基因编码。在一个具体实施方案中, GAT 多肽使用 SCP1 启动子进行表达。

[0024] 在该方法中, 处理田地可以在选自下述的时间进行: 约 1-2 叶和 3-4 叶阶段之间、在开花前、在开花时、在开花后和在种子形成时。处理田地可以进一步定义为在接近步骤 a) 的时间进行, 从而使得种子发芽, 同时生长素样除草剂以有效控制杂草生长的量保留在土壤中。在该方法中, 处理田地可以在步骤 a) 前约 3 周、2 周、1 周或 0 周进行。生长素样除草剂可以选自苯氧基羧酸化合物、苯甲酸化合物、吡啶羧酸化合物、喹啉羧酸化合物和草除灵乙基化合物。

[0025] 苯氧基羧酸化合物可以选自 2,4-二氯苯氧基乙酸、(4-氯-2-甲基苯氧基) 乙酸和 4-(2,4-二氯苯氧基) 丁酸 (2,4-DB)。使用的 2,4-二氯苯氧基乙酸化合物的量可以小于约 280g/ha。使用的 4-(2,4-二氯苯氧基) 丁酸 (2,4-DB) 的量可以小于约 1120g/ha。使用的 (4-氯-2-甲基苯氧基) 乙酸化合物的量可以小于约 280g/ha。在一个实施方案中, 生长素样除草剂是麦草畏。使用的麦草畏的量可以是例如约 2.5g/ha-约 10,080g/ha, 包括约 2.5g/ha-约 1040g/ha、约 5g/ha-约 2040g/ha、约 10g/a-约 820g/h、和约 50g/ha-约 1000g/ha。草甘膦的量可以是约 200g/ha-约 1,600g/h, 包括约 200g/ha-约 1,000g/h、约 200g/ha-约 800g/h、约 200g/ha-约 400g/h、和约 400g/ha-约 800g/h。

[0026] 在另外一个方面, 本发明提供了用于控制农作物生长环境中的杂草生长的方法, 其包括: a) 将除草有效量的生长素样除草剂施用于农作物生长环境; b) 在施用生长素样除草剂的 21 天内将单子叶植物的转基因种子种植在农作物生长环境的土壤中, 所述单子叶植物的转基因种子包含编码麦草畏降解酶活性例如麦草畏单加氧酶的核酸, 其中所述除草有效量是不损害转基因种子或由其发芽的植物但损害具有相同基因型但缺乏所述核酸、且与所述转基因种子在相同的条件下种植的种子或由其发芽的植物的量, 其中所述核酸选自 (1) 编码 SEQ ID NO :8 的多肽的核酸序列, (2) 包含 SEQ ID NO :7 的序列的核酸序列, (3) 在 5XSSC、50% 甲酰胺和 42°C 的条件下, 与 SEQ ID NO :7 的核酸序列的互补序列杂交的核酸序列, (4) 与 SEQ ID NO :7 的核酸序列具有至少 70% 序列同一性的核酸序列, 和 (5) 编码与 SEQ ID NO :8 的多肽序列具有至少 70% 序列同一性的多肽的核酸序列; 和 c) 允许种子发芽成植物。与 SEQ ID NO :7 的核酸序列具有至少 70% 序列同一性的核酸序列可以编码在 112 位处包含半胱氨酸残基的多肽。这个实施方案可以与上文提供的任何方法和组合物组合。

[0027] 在本发明的具体实施方案中, 对于单子叶植物的除草剂处理可以以比先前可以进行的更高的比率和 / 或更接近农作物的发芽进行而不损害农作物。在具体实施方案中, 除草有效量的 2,4-D 和 / 或 MCPA, 例如至少约 200、300、300、500、590、650、700、800 或更多 g/ha 的任一或两种除草剂, 包括约 300-约 1200g/ha、约 500-约 1200g/ha、约 600-约 1200g/ha、约 590-约 1400g/ha、和约 700-约 1100g/ha 的任一或两种除草剂。除草剂还可以是麦草畏并且除草有效量可以是例如至少约 168、175、190、200、225、250、280、300、400、500、560 或更多 g/ha 麦草畏, 包括约 200g/ha-约 600g/ha、约 250g/ha-约 600g/ha、约 250g/ha-约 800g/ha、约 225g/ha-约 1120g/ha 和约 250g/ha-约 1200g/ha、约 280g/ha-约 1120g/ha 和约 560g/ha-约 1120g/ha。在具体实施方案中, 单子叶植物选自玉米、稻、高粱、小麦、黑麦、粟、甘蔗、燕麦、黑小麦、柳枝稷和草坪草。与可以施用于不包含编码麦草畏降解酶活性的转

基因的单子叶农作物植物的麦草畏水平比较,在单子叶农作物植物例如玉米中表达转基因麦草畏降解酶活性例如单加氧酶,允许将更高水平的麦草畏施用于农作物,从而实现在植物生长的任何阶段控制杂草的目的。

[0028] 在另外一个方面,本发明提供了用于控制田地中的杂草生长的方法,其包括:a)将除草有效量的除麦草畏外的生长素样除草剂施用于田地,其中所述田地包含含有编码麦草畏单加氧酶的核酸的转基因双子叶植物,或用在施用所述除草剂的21天内发芽成所述转基因双子叶植物的种子进行种植,其中所述除草有效量是不损害所述转基因双子叶植物但将损害具有相同基因型但缺乏所述编码麦草畏单加氧酶的核酸的植物的量,其中所述核酸选自(1)编码SEQ ID NO:8的多肽的核酸序列,(2)包含SEQ ID NO:7的序列的核酸序列,(3)在5X SSC、50%甲酰胺和42℃的条件下,与SEQ ID NO:7的核酸序列的互补序列杂交的核酸序列,(4)与SEQ ID NO:7的核酸序列具有至少70%序列同一性的核酸序列,和(5)编码与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽的核酸序列;和b)允许转基因双子叶植物生长。在该方法中,步骤a)可以包括将除草有效量的生长素样除草剂施用于与包含转基因双子叶植物的生长环境邻接的生长环境,且允许除草剂漂移到植物上或植物生长的土壤上。生长素样除草剂可以是如本文所描述的任何除草剂。在该方法中,步骤b)可以包括允许转基因双子叶植物生长至成熟。在具体实施方案中,除草有效量可以定义为不损害转基因植物的量。

[0029] 在另外一个方面,本发明提供了用于增加除草剂送递装置的使用效率的方法,其包括:a)获得已用于送递包含生长素样除草剂的第一种组合物的装置;b)使用所述装置将第二种组合物送递给田地而无需首先彻底洗涤所述装置,从而使得包含所述生长素样除草剂的除草剂残留物保留在所述装置中且与所述第二种组合物一起送递给田地,其中所述田地包含表达编码麦草畏单加氧酶的核酸的转基因双子叶植物,或用在送递第二种组合物21天内发芽成所述转基因双子叶植物的种子进行种植,其中所述除草剂残留物以不损害所述转基因双子叶植物但将损害具有相同基因型但所述缺乏编码麦草畏单加氧酶的核酸的植物的量存在,其中所述核酸选自(1)编码SEQ ID NO:8的多肽的核酸序列,(2)包含SEQ ID NO:7的序列的核酸序列,(3)在5X SSC、50%甲酰胺和42℃的条件下,与SEQ ID NO:7的核酸序列的互补序列杂交的核酸序列,(4)与SEQ ID NO:7的核酸序列具有至少70%序列同一性的核酸序列,和(5)编码与SEQ ID NO:8的多肽序列具有至少70%序列同一性的多肽的核酸序列。

[0030] 发明详述

[0031] 在一个实施方案中,本发明涉及下述未预料到的发现:生长素样除草剂例如麦草畏的发芽前施用可以接近农作物的种植或甚至与农作物的种植同时进行。本发明提供了优良的杂草控制选择,包括杂草中除草剂耐受性的减少和/或预防。生长素样除草剂例如麦草畏的发芽前施用先前要求除草剂施用充分提前于对生长素样除草剂敏感的植物种植和发育,以允许环境中的除草剂分解且避免显著的农作物损害或死亡。大多数农作物植物且特别是双子叶植物例如大豆和棉花对于麦草畏极端敏感。因此,由制造商推荐的在种植中的施用后延迟必须严密遵循。

[0032] 年幼的小植株和种子对于除草剂特别敏感。即使在转基因种子和植物中,未成熟的组织也无法充分地表达使得其对于除草剂耐受的基因,或可能无法具有积聚的足够水

平的蛋白质以赋予耐受性。例如,已发现成熟的植物显示出对于除草剂 Harness<sup>TM</sup>(乙草胺)、Lasso<sup>TM</sup>(甲草胺)、Treflan<sup>TM</sup>(氟乐灵)、Eptam<sup>TM</sup>(EPTC)和/或Far-Go<sup>TM</sup>(野麦畏;<http://pmp.cce.cornell.edu/profiles/herb-growthreg/sethoxydim-vernolate/triallate/herb-prof-triallate.html>)的高水平耐受性,但在发芽时对于除草剂的敏感性。由于年幼组织中的这种变异性,对于麦草畏除草剂的发芽后施用(例如,在更成熟的营养组织中)的农作物响应可以显著不同于对更年幼的更敏感的组织所暴露的除草剂的发芽前施用的农作物响应。前者不一定预测后者。这在植物对于给定除草剂高度敏感例如双子叶植物和除草剂麦草畏的情况下得到强调。因此,本发明出乎意料地显示由麦草畏的发芽前施用可以达到高于预测水平的农作物安全性。

[0033] 本发明使用生长素样除草剂,它也称为生长素或生长调节剂除草剂,或第4组除草剂(基于其作用方式)。这些类型的除草剂模拟或如同称为生长素的天然植物生长调节剂起作用。生长素样除草剂的作用看起来影响细胞壁可塑性和核酸代谢,这可以导致不受控制的细胞分裂和生长。

[0034] 生长素样除草剂包括4个化学家族:苯氧基、羧酸(或吡啶)、苯甲酸和喹啉羧酸。苯甲基除草剂是最常用的,且自从二十世纪四十年代(当(2,4-二氯苯氧基)乙酸(2,4-D)被开发时)以来已用作除草剂。其他例子包括4-(2,4-二氯苯氧基)丁酸(2,4-DB)、4-(2,4-二氯苯氧基)丙酸(2,4-DP)、(2,4,5-三氯苯氧基)乙酸(2,4,5-T)、2-(2,4,5-三氯苯氧基)丙酸(2,4,5-TP)、2-(2,4-二氯-3-甲基苯氧基)-N-苯基丙酰胺(氯甲酰草胺)、(4-氯-2-甲基苯氧基)乙酸(MCPA)、4-(4-氯-邻甲苯氧基)丁酸(MCPB)和2-(4-氯-2-甲基苯氧基)丙酸(MCPP)。

[0035] 下一个最大的化学制品家族是羧酸除草剂,也称为吡啶除草剂。例子包括3,6-二氯-2-吡啶羧酸(二氯吡啶酸)、4-氨基-3,5,6-三氯-3-吡啶羧酸(氨基吡啶酸)、(2,4,5-三氯苯氧基)乙酸(定草酯)、和4-氨基-3,5-二氯-6-氟-2-吡啶氧基乙酸(氯草烟)。苯甲酸的例子包括3,6-二氯对茴香酸(麦草畏)和3-氨基-2,5-二氯苯甲酸(choramben)。麦草畏是用于本发明中的特别有用的除草剂。生长素除草剂的第4个化学家族是喹啉羧酸家族。例子包括3,7-二氯-8-喹啉羧酸(二氯喹啉酸)。这种除草剂是独特的,因为它还将控制某些禾本科杂草,与基本上仅控制阔叶或双子叶植物的其他生长素样除草剂不同。这个类别中的其他除草剂是7-氯-3-甲基-8-喹啉羧酸(氯甲喹啉酸)。

[0036] 发现例如用编码麦草畏单加氧酶(DMO)的多核苷酸构建体转化的大豆植物对于麦草畏甚至早期发芽前施用耐受,在甚至9倍标记的施用比率时具有小于10%的损伤比率(5,040g/ha,4.51b/英亩;表1)。本发明人发现,即使使用10,080g/ha的18倍施用比率(91b/英亩),对于转基因麦草畏耐受植物的损害也小于20%(表4)。在1122g/ha的约2倍施用比率时,观察到小于2%的损伤。因此,指出可以使用与除草剂的发芽前和发芽后施用相关的改善的杂草控制,而没有由于除草剂损害导致的生产力的任何显著减少。根据本发明麦草畏的发芽前施用因此可以与对麦草畏耐受的植物发芽后的一次或多次除草剂施用组合,同时维持农作物产量和获得改善的杂草控制。例如,一个此种除草剂施用方案涉及在发育的V2阶段时麦草畏的晚期发芽前施用与麦草畏的发芽后施用结合。在某些实施方案中,发芽后施用可以在从发芽到收获的任何点上进行。特别有利的将是在直至大豆株冠关闭的任何V阶段时的发芽后施用,例如在约V1、V2、V3、V4、V5、V6和/或更晚的阶段。

[0037] 依照本发明,提供了用于控制杂草的方法和组合物,其包括显示出对于草甘膦和生长素样除草剂例如麦草畏的耐受性的植物的使用。如工作实施例中显示的,麦草畏和草甘膦允许使用减少量的除草剂以达到相同水平的草甘膦耐受性杂草的控制,且因此这个实施方案提供了用于在商业生产领域中控制除草剂耐受性的显著进步。在一个实施方案中,将草甘膦和麦草畏的罐装混合物在发芽前和/或发芽后施用于植物。此外,草甘膦和麦草畏可以分开施用。为了获得使用减少量的除草剂的能力,草甘膦和麦草畏优选在两种除草剂保持活性和能够控制杂草生长的足够时间间隔内施用。

[0038] 因此,这个实施方案允许使用较低量的任一除草剂,达到与仅一种除草剂的施用相同程度的杂草控制。例如,本发明提供了杂草控制的方法,其包括在用对麦草畏和草甘膦具有耐受性的转基因植物种植的田地中施用除草剂组合物,所述除草剂组合物相对于标准制造商标记的比率,包含1倍比率的草甘膦和/或麦草畏。分别的草甘膦和麦草畏施用比率的例子包括约0.5x-0.95x的任一除草剂,特别包括约0.5x、0.6x、0.7x、0.8x、0.85x、0.9x和0.95x的任一除草剂以及其所有可推导的组合,以及更高的比率例如0.97x和0.99x。可替代地,在更难以控制杂草或需要更大程度的杂草控制的情况下,考虑到本文的甚至更高的麦草畏施用比率也不会显著损害植物的发现,可以进行1x和更高的施用比率。1x施用比率由商购可得的除草剂制剂的制造商设定且是本领域技术人员已知的。例如,对于Fallow Master™的标签,具有约2:1的草甘膦:麦草畏比的草甘膦和麦草畏混合物建议约451g/ha(311ae g/ha草甘膦:140ae g/ha麦草畏)-621ae g/ha(428ae g/ha草甘膦:193ae g/ha麦草畏)的施用比率,这取决于杂草物种和杂草高度。

[0039] “草甘膦”指N-膦酰甲基甘氨酸及其盐。草甘膦可以众多制剂商购。草甘膦的这些制剂的例子包括但不限于,作为ROUNDUP®、ROUNDUP® ULTRA、ROUNDUP® ULTRAMAX、ROUNDUP® CT、ROUNDUP® EXTRA、ROUNDUP® BIACTIVE、ROUNDUP® BIOFORCE、RODEO®、POLARIS®、SPARK®和ACCORD®除草剂由Monsanto公司销售的那些,所有这些都包含作为异丙铵盐的草甘膦;ROUNDUP® WEATHERMAX包含作为钾盐的草甘膦;ROUNDUP® DRY和RIVAL®除草剂,其包含作为铵盐的草甘膦;ROUNDUP® GEOFORCE,其包含作为钠盐的草甘膦;和TOUCHDOWN®除草剂,其包含作为三甲基铊盐的草甘膦。“麦草畏”指3,6-二氯邻茴香酸或3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸及其酸和盐。它的盐包括异丙胺、二甘醇胺(diglycoamine)、二甲胺、钾和钠。麦草畏的商业制剂的例子包括但不限于,Banvel™(作为DMA盐)、Clarity™(作为DGA盐)、VEL-58-CS-11™和Vanquish™(作为DGA盐,BASF)。

[0040] 可以使用麦草畏有效控制的杂草的非限制性例子是下述:乳酪杂草、鸡杂草、白三叶草、苍耳、亚洲鸭跖草、死亡荨、红茎菲拉雷(filaree)、卡罗来纳天竺葵、大麻田菁、宝盖草、野生马尾(加拿大蓬)、蓼科杂草、地肤、lambquarter、牵牛花、芥菜、野生芥菜、红根藜、光滑藜、多刺金午时花、切叶月见草、普通马齿苋、普通豚草、三裂叶豚草、俄罗斯蓟、shepardspurse、宾夕法尼亚荨麻、大戟、苘麻、野生紫罗兰、金荞麦、野生萝卜、大豆马齿苋(soybeanpurslane)、镰刀豆、牵牛花、金荞麦、普通豚草、加拿大蓬(加拿大蓬)、多毛蚤草、鹿角车前草和帕尔默藜。可以使用麦草畏和草甘膦加以控制的杂草的非限制性例子是下述:稗子、早雀麦、自生谷物、波斯毒麦、野生蒺藜草、绿色狐尾草、野生燕麦、金荞麦、自生低芥酸菜子、麦仙翁(cowcockle)、葶苈子、地肤、春蓼、墙藜、野生芥菜、多刺莴苣、红根藜、荨

麻、大画眉草、曼陀螺、俄罗斯蓟、狐尾草和黍。组合的草甘膦和麦草畏在除草剂的量减少的情况下达到相同水平的杂草控制,且因此当除草剂组合时,可以增加在任何给定除草剂施用比率时可以加以控制的杂草谱。

[0041] 具有除草剂耐受性的转基因植物可以如本领域描述的进行制备。例如通过来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶(DMO)的基因可以赋予麦草畏耐受性(美国专利申请号:20030135879)。在这方面可以使用的序列的例子是编码 SEQ ID Nos:2、4、6、8、10 和 12 的多肽的核酸。编码这些多肽的序列的例子作为 SEQ ID NOS:1、3、5、7、9 和 11 给出。SEQ ID NO:1 显示使用拟南芥密码子选择,为在双子叶植物中表达而优化的来自嗜麦芽假单胞菌的 DMO。预测分别在位置 2、3、112 具有 Ala、Thr、Cys 的多肽在 SEQ ID NO:2 中给出。SEQ ID NO:3 显示为在双子叶植物中表达而优化且编码 SEQ ID NO:4 的多肽的另一种嗜麦芽假单胞菌 DMO,SEQ ID NO:4 预测在位置 2、3、112 处分别具有 Leu、Thr、Cys。SEQ ID NO:5 显示双子叶植物优化的 DMO 的编码序列,SEQ ID NO:6 显示双子叶植物优化的 DMO 的多肽,预测在位置 2、3、112 处分别具有 Leu、Thr、Trp。SEQ ID NOS:7 和 8 显示预测在位置 2、3、112 处分别具有 Ala、Thr、Cys 的 DMO 的编码和多肽序列。SEQ ID NOS:9 和 10 显示预测在位置 2、3、112 处分别具有 Ala、Thr、Trp 的 DMO 的双子叶植物优化的编码序列和多肽序列。SEQ ID NOS:11 和 12 显示来自嗜麦芽假单胞菌的 DMO 的编码序列和多肽序列(美国专利申请号:20030135879)。另一个示例性 DMO 序列可以是预测在位置 2、3、112 处分别具有 Leu、Thr、Cys 的 DMO,其具有嗜麦芽假单胞菌的密码子选择(美国专利申请号:20030135879)。

[0042] 赋予草甘膦耐受性的序列也是已知的,包括草甘膦抗性 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS),如美国专利 5,627,061、美国专利 5,633,435、美国专利 6,040,497、美国专利 5,094,945、W004074443、W004009761 中描述,所有这些专利引入本文作为参考;通过表达编码草甘膦降解酶例如草甘膦氧化还原酶(GOX,引入本文作为参考的美国专利 5,463,175),草甘膦脱羧酶(引入本文作为参考的 W005003362;美国专利申请 20040177399)的核酸;以及通过表达编码草甘膦灭活酶例如草甘膦-N-乙酰转移酶(GAT,例如引入本文作为参考的美国专利公开 20030083480 和 20070079393)的核酸。

[0043] 具有降解生长素样除草剂、草甘膦或其他除草剂的能力的蛋白质的变体可以根据标准方法容易地制备和测定活性。此种序列还可以通过本领域已知的技术例如由合适的生物包括细菌进行鉴定,所述生物降解生长素样除草剂例如麦草畏或其他除草剂(美国专利 5,445,962;Cork 和 Krueger,1991;Cork 和 Khalil,1995)。分离 DMO 或其他序列的一种方法是通过核酸杂交,例如与由来源生物构建的文库杂交,或基于所公开的去饱和酶,使用来自来源生物的 mRNA 和引物,通过 RT-PCR。本发明因此包含了使用在严格条件下与本文描述的 DMO 编码序列杂交的核酸。本领域技术人员应当理解通过增加盐浓度和降低温度可以使条件较不严格。因此,杂交条件可以容易地操纵,且因此一般将是依赖所需结果选择的方法。高严格性条件的例子是 5X SSC、50%甲酰胺和 42°C。通过在此种条件下进行洗涤,例如 10 分钟,可以去除在这些条件下不与特定靶序列杂交的那些序列。

[0044] 变体还可以例如使用已知的 DMO 多核苷酸序列根据本领域众所周知的技术进行化学合成。例如,DNA 序列可以通过亚磷酰胺化学在 DNA 自动合成仪中进行合成。化学合成具有许多优点。特别地,化学合成是理想,因为表达 DNA 序列的宿主优选的密码子可以用于优化表达。并非所有密码子都必须改变以获得改善的表达,但优选至少将在宿主中很

少使用的密码子变成宿主优选的密码子。通过将超过约 50%、最优选至少约 80% 的密码子变成宿主优选密码子可以获得高水平的表达。许多宿主细胞的密码子优先性是已知的 (PCT WO 97/31115 ; PCT W097/11086 ; EP 646643 ; EP 553494 ; 和美国专利号 : 5,689,052 ; 5,567,862 ; 5,567,600 ; 5,552,299 和 5,017,692)。其他宿主细胞的密码子优先性可以通过本领域已知的方法进行推导。此外,使用化学合成,可将容易地改变 DNA 分子或其编码的蛋白质的序列,例如以优化表达(例如,消除干扰转录或翻译的 mRNA 二级结构),在方便的点上添加独特限制位点,且删除蛋白酶切割位点。

[0045] 可以对蛋白质的多肽序列例如本文提供的 DMO 序列进行修饰和改变,同时保留酶活性。下述是基于改变蛋白质的氨基酸以制备等价的,或甚至是改善的、修饰的多肽和相应的编码序列的讨论。已知例如在蛋白质结构中的某些氨基酸可以置换其他氨基酸,而不造成与结构,例如底物分子上的结合位点的相互作用结合能力的相当损失。因为是蛋白质的相互作用能力和性质限定蛋白质的生物功能活性,所以可以在蛋白质序列中进行某些氨基酸序列置换,以及当然在它作为基础的 DNA 编码序列进行置换,且仍然获得具有相似性质的蛋白质。因此预期可以在本文描述的 DMO 肽序列或其他除草剂耐受性多肽和相应的 DNA 编码序列中进行各种改变,而无其生物效用或活性的相当损失。

[0046] 在进行此类改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在对蛋白质赋予相互作用生物功能中的重要性是本领域公知的 (Kyte et al., 1982)。公认氨基酸的相对亲水特征对所得蛋白质的二级结构有贡献,所述二级结构又确定了该蛋白质与其他分子如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等等的相互作用。每个氨基酸已经基于它们的疏水性和电荷特征被分配了疏水性指数 (Kyte et al., 1982), 这些为 : 异亮氨酸 (+4.5) ; 缬氨酸 (+4.2) ; 亮氨酸 (+3.8) ; 苯丙氨酸 (+2.8) ; 半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5) ; 甲硫氨酸 (+1.9) ; 丙氨酸 (+1.8) ; 甘氨酸 (-0.4) ; 苏氨酸 (-0.7) ; 丝氨酸 (-0.8) ; 色氨酸 (-0.9) ; 酪氨酸 (-1.3) ; 脯氨酸 (-1.6) ; 组氨酸 (-3.2) ; 谷氨酸 (-3.5) ; 谷氨酰胺 (-3.5) ; 天冬氨酸 (-3.5) ; 天冬酰胺 (-3.5) ; 赖氨酸 (-3.9) ; 和精氨酸 (-4.5)。

[0047] 本领域已知氨基酸可以被具有相似亲水指数或得分的其他氨基酸替代并且仍然得到具有相似的生物活性的蛋白质,即仍然得到生物学功能等同的蛋白质。在进行此类改变时,亲水指数在  $\pm 2$  以内的氨基酸替代是优选的,在  $\pm 1$  以内是尤其优选的,在  $\pm 0.5$  是尤其更优选的。

[0048] 本领域也理解基于亲水性可以有效进行类似氨基酸的替代。美国专利 4,554,101 公开了蛋白质的最大的局部平均亲水性(如通过其相邻氨基酸的亲水性控制)与蛋白质的生物学性质相关。如美国专利 4,554,101 中详述,下面的亲水性值被分配给氨基酸残基 : 精氨酸 (+3.0) ; 赖氨酸 (+3.0) ; 天冬氨酸 (+3.0 $\pm$ 1) ; 谷氨酸 (+3.0 $\pm$ 1) ; 丝氨酸 (+0.3) ; 天冬酰胺 (+0.2) ; 谷氨酰胺 (+0.2) ; 甘氨酸 (0) ; 苏氨酸 (-0.4) ; 脯氨酸 (-0.5 $\pm$ 1) ; 丙氨酸 (-0.5) ; 组氨酸 (-0.5) ; 半胱氨酸 (-1.0) ; 甲硫氨酸 (-1.3) ; 缬氨酸 (-1.5) ; 亮氨酸 (-1.8) ; 异亮氨酸 (-1.8) ; 酪氨酸 (-2.3) ; 苯丙氨酸 (-2.5) ; 色氨酸 (-3.4)。可以理解氨基酸可以替代具有相似亲水性值的另一氨基酸并且仍然得到生物学等同的蛋白质。在此类改变中,亲水性值在  $\pm 2$  以内的氨基酸替代是优选的, $\pm 1$  以内的氨基酸替代是尤其优选的,在  $\pm 0.5$  以内的氨基酸替代是甚至更尤其优选的。考虑这些和多种前述特征的示例性替代是本领域技术人员公知的并且包括 : 精氨酸和赖氨酸 ; 谷氨酸和天冬氨酸 ; 丝氨酸和苏氨

酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0049] 赋予除草剂耐受性的基因一般将与驱动基因表达的植物启动子连接,其量足以赋予除草剂耐受性。适合于这个和其他用途的启动子是本领域众所周知的。描述此种启动子的例子包括美国专利 6,437,217(玉米 RS81 启动子),美国专利 5,641,876(稻肌动蛋白启动子),美国专利 6,426,446(玉米 RS324 启动子),美国专利 6,429,362(玉米 PR-1 启动子),美国专利 6,232,526(玉米 A3 启动子),美国专利 6,177,611(组成型玉米启动子),美国专利 5,322,938、5,352,605、5,359,142 和 5,530,196(35S 启动子),美国专利 6,433,252(玉米 L3 油质蛋白启动子),美国专利 6,429,357(稻肌动蛋白 2 启动子以及稻肌动蛋白 2 内含子),美国专利 5,837,848(根特异性启动子),美国专利 6,294,714(光诱导型启动子),美国专利 6,140,078(盐诱导型启动子),美国专利 6,252,138(病原体诱导型启动子),美国专利 6,175,060(磷缺乏诱导型启动子),美国专利 6,388,170(PC1SV 启动子),美国专利 6,635,806( $\gamma$ -coixin 启动子),和美国专利申请序列号 09/757,089(玉米叶绿体醛缩酶启动子)。可以使用的另外启动子是胭脂碱合酶(NOS)启动子(Ebert 等人,1987),章鱼碱合酶(OCS)启动子(其携带在根癌土壤杆菌的肿瘤诱导质粒上),花椰菜花叶病毒启动子,如花椰菜花叶病毒(CaMV)19S 启动子(Lawton 等人,1987),CaMV 35S 启动子(Ode11 等人,1985),玄参花叶病毒 35S-启动子(Walker 等人,1987),蔗糖合酶启动子(Yang 等人,1990),R 基因复合体启动子(Chandler 等人,1989),叶绿素 a/b 结合蛋白基因启动子,CaMV35S(美国专利号 5,322,938;5,352,605;5,359,142;和 5,530,196),FMV35S(美国专利 6,051,753;5,378,619),PC1SV 启动子(美国专利 5,850,019;或 SEQ ID NO:20),SCP 启动子(美国专利号 6,677,503)和 AGRtu. nos(GenBank 登记 V00087;Depicker 等人,1982;Bevan 等人,1983)启动子等(还参见表 1)。

[0050] 通过使用编码转运肽的序列可以获得用于表达除草剂耐受性基因的利益。例如,合适的叶绿体转运肽例如拟南芥 EPSPS CTP(Klee 等人,1987)和牵牛花 EPSPS CTP(della-Cioppa 等人,1986)的掺入已显示使异源 EPSPS 蛋白质序列靶向转基因植物中的叶绿体。叶绿体转运肽(CTPs)被改造成与蛋白质的 N 末端融合以指导蛋白质进入植物叶绿体内。此种序列可以特别与赋予麦草畏耐受性的核酸结合使用。许多叶绿体定位的蛋白质作为前体由核基因表达,且通过在输入过程期间被去除的叶绿体转运肽靶向叶绿体。叶绿体蛋白质的例子包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的小亚基(RbcS2)、铁氧还蛋白、铁氧还蛋白氧化还原酶、捕获光的复合体蛋白质 I 和蛋白质 II 以及硫氧还蛋白 F。其他示例性叶绿体靶向序列包括玉米 cab-m7 信号序列(Becker 等人,1992;PCT W097/41228),豌豆谷胱甘肽还原酶信号序列(Creissen 等人,1995;PCTWO 97/41228)和烟草(Nicotiana tabacum)核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基叶绿体转运肽的 CTP(SSU-CTP)(Mazur, 等人,1985)。AtRbcS4(CTP1;美国专利 5,728,925),AtShkG(CTP2;Klee 等人,1987),AtShkGzm(CTP2synthetic;参见 W004009761 的 SEQ ID NO:14)和 PsRbcS(Coruzzi 等人,1984)以及例如在美国临时申请公开 60/891,675 中公开的那些(其肽和核酸序列在本文中在 SEQ ID NOs:21-32 处列出)的使用对于本发明的使用可能有益。

[0051] 充当翻译前导序列的 5'UTR 是位于基因的启动子序列和编码序列之间的 DNA 遗传元件。翻译前导序列存在于翻译起始序列上游的完全加工的 mRNA 中。翻译前导序列可以影响一级转录物加工成 mRNA、mRNA 稳定性或翻译效率。翻译前导序列的例子包括玉米和牵牛



花热激蛋白前导序列(美国专利号 5,362,865)、植物病毒包膜蛋白质前导序列、植物核酮糖二磷酸羧化酶前导序列(Turner 和 Foster,1995)及其它。对于使用来说可以特别有利的 5' UTRs 的非限制性例子是 GmHsp(美国专利 5,659,122)、PhDnaK(美国专利 5,362,865)、AtAnt1、TEV(Carrington 和 Freed,1990)和 AGRtunos(GenBank 登记 V00087 ;Bevan 等人,1983)。

[0052] 3' 非翻译序列、3' 转录终止区或聚腺苷酸化区意指与结构多核苷酸分子连接且位于其下游的 DNA 分子,并且包括提供聚腺苷酸化信号和能够影响转录、mRNA 加工或基因表达的其他调节信号的多核苷酸。聚腺苷酸化信号在植物中用于引起给 mRNA 前体的 3' 末端添加聚腺苷酸核苷酸。聚腺苷酸化序列可以来源于天然基因、各种植物基因或 T-DNA 基因。3' 转录终止区的例子是胭脂碱合酶 3' 区域(nos 3' ;Fraley 等人,1983)。不同 3' 非翻译区的使用得到例示(Ingelbrecht 等人,1989)。来自豌豆(*Pisum sativum*)RbcS2 基因(Ps. RbcS2-E9 ;Coruzzi 等人,1984)和 AGRtu.nos(Rojiyaa 等人,1987,Genbank 登记 E01312)的聚腺苷酸化分子对于本发明的使用可能特别有益。

[0053] 本领域已知内含子序列帮助在单子叶植物细胞中表达转基因。内含子的例子包括玉米肌动蛋白内含子(美国专利 5,641,876)、玉米 HSP70 内含子(ZmHSP70 ;美国专利 5,859,347 ;美国专利 5,424,412)和稻 TPI 内含子(OsTPI ;美国专利号 7,132,528),并且在实践本发明中有益。

[0054] 本领域已知用于将转基因引入植物内的任何技术可以用于制备依照本发明的除草剂耐受性植物(参见例如 Miki 等人,1993)。用于转化植物的合适方法被认为包括可以将 DNA 引入细胞内的基本上任何方法,例如通过如美国专利号 5,384,253 中举例说明的电穿孔;如美国专利号 5,015,580 ;5,550,318 ;5,538,880 ;6,160,208 ;6,399,861 ;和 6,403,865 中举例说明的微粒轰击;如美国专利号 5,635,055 ;5,824,877 ;5,591,616 ;5,981,840 ;和 6,384,301 中举例说明的土壤杆菌介导的转化;以及如美国专利号 5,508,184 中举例说明的原生质体转化等。通过诸如这些的技术的施用,可以稳定转化基本上任何植物物种的细胞,并且使这些细胞发育成转基因植物。在棉花转化的背景中可能特别有用的技术公开于美国专利号 5,846,797,5,159,135,5,004,863 和 6,624,344 中;用于转化芸苔属植物的技术特别公开于例如美国专利 5,750,871 中;用于转化大豆的技术例如公开于 Zhang 等人,1999 和美国专利 6,384,301) 中。玉米可以使用 W09506722 和美国专利申请 20040244075 中描述的方法进行转化。

[0055] 实现将外源 DNA 送递给受体细胞后,接下来的步骤一般涉及鉴定经转化的细胞用于进一步培养和植物再生。为了改善鉴定转化体的能力,可能希望使用选择或筛选标记基因与依照本发明制备的转化载体。在这种情况下,随后通常通过使细胞暴露于一种或多种选择剂来测定潜在转化的细胞群体,或筛选细胞的所需标记基因性状。

[0056] 暴露于选择剂后存活的细胞或在筛选测定法中已评为阳性的细胞可以在支持植物再生的培养基中进行培养。在一个示例性实施方案中,通过包括进一步的物质例如生长调节剂可以修改任何合适的植物组织培养基,例如 MS 和 N6。组织可以维持在具有生长调节剂的基础培养基上,直至足够的组织可用于开始植物再生努力,或进行手工选择的重复循环,直至组织的形态学适合于再生,一般至少 2 周,然后转移至有助于芽形成的培养基。定期转移培养物直至已发生足够的芽形成。一旦芽形成,就将它们转移至有助于根形成的培

培养基。一旦足够的根形成,就可以将植物转移至土壤用于进一步的生长和成熟。

[0057] 为了证实再生植物中外源 DNA 或“转基因”的存在,可以进行各种测定法。此种测定法包括例如“分子生物学”测定法,例如 DNA 和 RNA 印迹和 PCR™;“生物化学”测定法,例如通过免疫学方法(ELISAs 和蛋白质印迹)或通过酶功能检测蛋白质产物的存在;植物部分测定法,例如叶或根测定法;以及通过分析整个再生植物的表型。

[0058] 一旦转基因已引入植物内,该基因就可以通过杂交引入与第一种植物性相容的任何植物内,无需曾经直接转化第二种植物。因此,如本文所使用的,术语“后代”指依照本发明制备的亲本植物的任何代的子孙,其中所述后代包含依照本发明制备的所选择的 DNA 构建体。“转基因植物”因此可以是任何代。如本文公开的,使植物“杂交”以提供相对于起始植物品系具有一种或多种添加的转基因或等位基因的植物品系,定义为通过使起始品系与包含本发明的转基因或等位基因的供体植物品系杂交来导致特定序列引入植物品系内的技术。为了达到这点,例如可以执行下述步骤:(a) 种植第一种(起始品系)和第二种(包含所需转基因或等位基因的供体植物品系)亲本植物的种子;(b) 使第一种和第二种亲本植物的种子生长成具有花的植物;(c) 用来自第二种亲本植物的花粉给来自第一种亲本植物的花授粉;和(d) 收获在具有受精花的亲本植物上产生的种子。

[0059] 考虑到本公开内容,用于与本发明结合使用的除草剂组合物的制备对于本领域技术人员将是显而易见的。商购可得的此种组合物除活性成分外一般还将包括诸如表面活性剂、固体或液体载体、溶剂和粘合剂的组分。可以用于施用于植物的表面活性剂的例子包括芳香族磺酸,例如木素(ligno)-、苯酚-、萘-和二丁基萘磺酸的碱金属、碱土金属或铵盐,以及芳基磺酸酯的脂肪酸的碱金属、碱土金属或铵盐,烷基醚的脂肪酸的碱金属、碱土金属或铵盐,月桂基醚的脂肪酸的碱金属、碱土金属或铵盐,脂肪醇硫酸酯的脂肪酸的碱金属、碱土金属或铵盐和脂肪醇乙二醇醚硫酸酯的脂肪酸的碱金属、碱土金属或铵盐,磺化萘及其衍生物与甲醛的缩合物,萘或萘磺酸与苯酚和甲醛的缩合物,苯酚或苯酚磺酸与甲醛的缩合物,苯酚与甲醛和亚硫酸钠的缩合物,聚氧乙烯辛基苯基醚,乙氧基化异辛基-、辛基或壬基酚,三丁基苯基聚乙二醇醚,烷基芳基聚醚醇,异十三醇,乙氧基化蓖麻油,乙氧基化三芳基酚,磷酸化三芳基酚乙氧基化物的盐,月桂醇聚乙二醇醚乙酸酯,山梨糖醇酯,木质素-亚硫酸盐废液或甲基纤维素或这些的混合物。在表面活性剂使用的情況下的常规实践是约 0.25 重量% -1.0 重量%,且更通常是约 0.25 重量% -0.5 重量%

[0060] 施用于植物的组合物可以是固体的或液体的。当使用固体组合物时,可能希望包括一种或多种载体材料与活性化合物。载体的例子包括矿物土例如二氧化硅、硅胶、硅酸盐、滑石粉、高岭土、镁质粘土、石灰石、白垩、黄土、陶土、白云石、硅藻土、硫酸钙、硫酸镁、氧化镁、磨碎的合成材料,肥料例如硫酸铵、磷酸铵、硝酸铵、硫脲和尿素,植物来源的产物例如谷物粗粉、树皮粗粉、木粗粉和壳粗粉、纤维素粉、绿坡缕石、蒙脱石、云母、蛭石、合成二氧化硅和合成硅酸钙或这些的混合物。

[0061] 对于液体溶液,可以包括水溶性化合物或盐,例如硫酸钠、硫酸钾、氯化钠、氯化钾、乙酸钠、硫酸氢铵、氯化铵、乙酸铵、甲酸铵、草酸铵、碳酸铵、碳酸氢铵、硫代硫酸铵、二磷酸氢铵、一磷酸二氢铵、磷酸氢钠铵、硫氰酸铵、氨基磺酸铵或氨基甲酸铵。

[0062] 在除草组合物中的其他示例性组分包括粘合剂例如聚乙烯吡咯烷酮,聚乙烯醇,部分水解的聚乙酸乙烯酯,羧甲基纤维素,淀粉,乙烯吡咯烷酮/乙酸乙烯酯共聚物和聚乙

酸乙烯酯,或这些的混合物;润滑剂例如硬脂酸镁,硬脂酸钠,滑石粉或聚乙二醇,或这些的混合物;消泡剂例如硅酮乳状液,长链醇,磷酸酯,乙炔二醇,脂肪酸或有机氟化合物,以及络合剂例如:乙二胺四乙酸(EDTA)的盐,三次氨基三乙酸的盐或聚磷酸的盐,或这些的混合物。

[0063] 如本文公开的,本领域已知的设备和方法用于施用各种除草剂处理。除草剂的施用比率可以改变,例如如上文描述的,依赖土壤质地、pH、有机物质含量、耕地系统和杂草的大小,并且对于合适的除草剂比率可以通过参考除草剂标签进行测定。

#### [0064] 实施例

[0065] 包括下面的实施例用于阐明本发明的实施方案。本领域技术人员将理解下面实施例中公开的技术代表本发明人发现的在本发明的实践中良好地发挥作用的技术。然而,本领域技术人员根据本公开将理解可以在公开的特定实施方案中进行许多改变并且仍然得到相似或类似的结果而不背离本发明的概念、精神和范围。更具体地,将显而易见的是化学或生理学相对的某些物质可以代替本文所述的物质而实现相同或相似的结果。认为本领域技术人员显而易见的所有此类相似的替代方案和修饰在所附权利要求定义的本发明的精神、范围和概念之内。

#### [0066] 实施例 1

[0067] 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于麦草畏的早期发芽前施用的耐受性

[0068] 使用标准操作和包含作为 SEQ ID NO :7 给出的 DMO 编码多核苷酸(其编码 SEQ ID NO :8 的多肽)的二元载体通过大豆子叶节的土壤杆菌转化来获得转基因大豆植物。制备 4 个转基因大豆事件且指定为事件 1-4。相对于对照,包含该事件的转基因大豆植物就其对于麦草畏除草剂的耐受性进行测试,证实除草剂耐受性。非转基因大豆植物用作对照。

[0069] 将转基因和对照大豆种子种植到包含 Redi-earth™ 的 3.5 英寸方形塑料罐(Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio)内。用各种量(561-5040g/ha、0.5-4.5lb/英亩或 1x-9x 标记的比率)的麦草畏制剂(Clarity™ 或 Banvel™, BASF, Raleigh, NC)处理土壤表面。将罐置于在 35 英寸×60 英寸纤维玻璃添水托盘的毛细垫上,用于高架和/或地下灌溉用于测试期的持续时间,以便维持最佳土壤湿度用于植物生长,且用 Osmocote(14-14-14 缓慢释放;Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio)以 100gm/cu. ft. 的比率进行施肥,以维持植物生长用于温室试验的持续时间。

[0070] 使植物在温室中在 27°C /21°C 日/夜温度和 25% -75% 相对湿度下生长,以模拟深秋的温暖季节生长条件。需要时用约 600 μE 的补充光提供 14 小时最低限度光周期。通过用每次处理的 4-6 次重复在通过比率随机化的随机区组设计中建立实验,这依赖植物质量、可用性,且考虑可能已在每个温室的范围内发生的任何环境变异性。

[0071] 相对于未处理的对照植物,在温室实验中处理的植物在处理后的特定日期(DAT)以 0-100 的等级对损伤进行肉眼评估,其中 0 表示“无”损伤,100%表示“完全”损伤或死亡。收集数据且使用合适的统计方法进行分析。

[0072] 研究结果令人惊讶地显示用 DMO 编码多核苷酸构建体转化的大豆植物对于麦草畏的甚至早期发芽前施用也是耐受的。如下表 1 中所示,即使在最高的施用比率即 5040g/

ha、4.51b/ 英亩或 9x 标记的麦草畏比率时,对于转基因植物的损伤也小于 10%。

[0073] 表 1. 来自在播种时麦草畏的早期发芽前施用的、对非转基因或转基因大豆植物的损伤百分比。损伤%表示为 ANOVA 平均值比较。相似字母表示在  $p = 0.05$  水平时无统计学差异。

[0074]

制剂	ID	在 14 DAT 时在所示比率 (g ae/ha*) 时的损伤 %									
		561		840		2244		4485		5040	
Clarity™	对照	67.0	a	73.0	b	96.6	a	98.2	a	99.5	a
	对照	61.0	a	86.0	a	98.1	a	98.3	a	99.8	a
	事件 1	0.0	b	0.0	c	1.7	bc	0.7	b	3.1	b
	事件 2	0.0	b	0.0	c	1.1	c	1.0	b	2.2	b
	事件 3	0.0	b	0.0	c	1.1	c	0.6	b	3.5	b
	事件 4	0.0	b	0.0	c	4.4	b	0.8	b	7.2	b
	LSD	9.9		7.2		3.2		2.2		5.1	

[0075] 实施例 2

[0076] 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于在播种时麦草畏的早期发芽前施用及随后麦草畏的发芽后施用的耐受性

[0077] 除了实施例 2 中关于麦草畏的早期发芽前 (在播种时) 施用描述的方法外,使用 Teejet 9501E 扁平风扇喷嘴 (Spraying Systems Co, Wheaton, IL) 用轨道喷雾器进行麦草畏的发芽后 (大豆发育的 V2 阶段) 施用,其中气压设定为 24psi (165kpa) 的最小值。喷嘴保持在植物材料的顶部上约 16 英寸的高度处用于喷雾。喷雾体积是 10 加仑 / 英亩或 93 升 / 公顷。

[0078] 如表 2 中所示,用 DMO 编码多核苷酸构建体转化的大豆植物对于在播种时麦草畏的早期发芽前施用以及随后的麦草畏的发芽后施用是耐受的。令人惊讶的是,在 10080g/ha 的总麦草畏比率、91b/ 英亩或 18x 标记的比率时,对于转基因植物的损伤小于 20%。

[0079] 表 2. 来自在播种时麦草畏的施用以及随后在 V2 阶段时的发芽后施用的、对于非转基因或转基因大豆植物的损伤百分比。\*

[0080]

制剂	植物	在 28DAT 时在所示比率 (g ae/ha*) 时的损伤 %									
Clarity™		1122		1680		4488		8970		10080	
	对照	97.5	a	98.8	a	99.8	a	100.0	a	100.0	a
	对照	95.6	a	98.1	a	99.4	a	100.0	a	100.0	a
	事件 1	0.0	c	1.8	b	4.5	d	11.9	c	16.9	b
	事件 2	2.6	bc	3.9	b	8.1	bc	13.8	b	16.9	b
	事件 3	3.1	b	2.9	b	8.8	b	11.9	c	17.5	b
	事件 4	2.3	bc	2.0	b	6.9	c	11.9	c	15.6	b
	LSD	3.1		2.2		1.4		1.6		1.9	

[0081] \* 损伤%表示为 ANOVA 平均值比较。相似字母表示在  $p = 0.05$  水平时无统计学差异。

[0082] 实施例 3

[0083] 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于麦草畏的晚期发芽前施用的耐受性

[0084] 进行在由于大豆幼苗下胚轴的出现而土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用的作用的分析。如先前实施例中所述,使用轨道喷雾器进行麦草畏施用。如表 3 中所示,发现用 DMO 编码多核苷酸构建体转化的大豆植物对于在土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用是耐受的。重要的是,即使在最高比率即 5040g/ha、4.51b/ 英亩或 9x 标记的麦草畏比率时,转基因事件中的损伤也小于 5%。

[0085] 表 3. 来自在土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用的、对于非转基因或转基因大豆植物的损伤百分比。\*

[0086]

制剂	植物	在 14 DAT 时在所示比率 (g ae/ha*) 时的损伤 %									
Clarity™		561		840		2244		4485		5040	
	对照	86.9	a	96.8	a	98.4	A	98.5	a	99.2	a
	对照	89.6	a	91.9	a	98.4	A	99.0	a	99.4	a
	事件 1	0.0	b	0.0	b	0.5	C	2.5	bc	2.0	b
	事件 2	0.0	b	0.0	b	2.9	bc	0.0	c	1.5	b
	事件 3	0.0	b	0.0	b	1.5	bc	4.4	b	1.3	b
	事件 4	0.0	b	0.5	b	3.3	B	3.0	bc	1.3	b
	LSD	8.1		5.4		2.4		3.9		2.3	

[0087] \* 损伤%表示为 ANOVA 平均值比较。相似字母表示在  $p = 0.05$  水平时无统计学差异。

[0088] 实施例 4

[0089] 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于麦草畏的晚期发芽前施用以及随后的麦草畏的发芽后施用的耐受性

[0090] 除了上文研究外,还进行在土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用以及随后在发育的 V2 阶段时麦草畏的发芽后施用的作用的分析。如表 4 中所示,用 DMO 编码多核苷酸构建体转化的大豆植物对于在土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用和麦草畏的发芽后施用是耐受的。即使在最高比率即 10080g/ha 的总麦草畏比率、91b/ 英亩或 18x 标记的比率时,对于转基因事件的损伤也小于 20%。

[0091] 表 4. 来自在土壤裂缝时麦草畏的晚期发芽前施用以及随后在 V2 阶段时的发芽后施用的、对于非转基因或转基因大豆植物的损伤百分比。\*

[0092]

制剂	植物	在 28DAT 时在所示比率 (g ae/ha*) 时的损伤 %									
Clarity™		1122		1680		4488		8970		10080	
	对照	95.6	a	98.1	a	100.0	a	100.0	a	100.0	a
	对照	95.0	a	98.1	a	99.4	a	99.8	a	100.0	a
	事件 1	0.3	b	0.9	b	6.3	b	13.1	b	16.3	bc
	事件 2	0.8	b	1.6	b	6.0	b	11.3	c	15.0	c
	事件 3	1.0	b	1.4	b	7.5	b	11.3	c	17.5	b
	事件 4	1.8	b	1.8	b	7.5	b	13.1	b	16.3	bc
	LSD	4.5		2.7		1.6		1.6		1.9	

[0093] \* 损伤%表示为 ANOVA 平均值比较。相似字母表示在  $p = 0.05$  水平时无统计学差异。

[0094] 实施例 5

[0095] 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于田地中的麦草畏的发芽前和发芽后施用的耐受性

[0096] 在最佳生长条件时大约生长季节开始时种植非转基因和转基因大豆种子,这依赖土壤湿度、温度和种植深度。在裂区设计下经过所有位置种植种子,用麦草畏处理作为全区效应并且事件作为裂区效应。设计细节如下:6 个位置、2 次重复/位置、2 行/区块、行长 12 英尺 (+3ft 小径)、9 粒种子/英尺、108 粒种子/行、5 个事件(事件 1-4 和分离的第 5 个事件);以及如下表 5 中所示的 4 种处理。在 6 个位置上种植总共 240 个区块(40/位置)。

[0097] 表 5. 显示转基因大豆对于麦草畏的耐受性的施用的 4 种处理的细节。

[0098]

处理	第一次施用		第二次施用	
	比率	植物阶段	比率	植物阶段
1	无麦草畏	无麦草畏	无麦草畏	无麦草畏
2	1.5 lb ae/英亩	在种植时	N/A	N/A
3	N/A	N/A	1.5 lb ae/英亩	V3-4
4	1.5 lb ae/英亩	在种植时	1.5 lb ae/英亩	V3-4

[0099] 实验自始至终使用已知商业品系例如 A3525 种植 4 个非转基因边缘行。遵循本领域已知的最佳生产和管理实践。需要时实践实施的害虫控制和疾病控制,以阻止麦草畏施用的混淆效应。需要时根据标准实践灌溉田地。

[0100] 田地中的所有植物都用麦草畏的发芽前或发芽后施用进行处理,并且相对于未处理的对照植物,在种植后的特定日期以 0-100% 的等级肉眼评估损伤,其中 0 表示“无”损伤,100% 表示“完全”损伤或死亡。在 Monmouth, IL 中在晚春隔开约 1 个月进行种子种植和发芽前处理。如表 6 中所示,发现所有转基因大豆植物无损伤或极少损伤。使用的第 5 个转基因事件看起来是分离的,因此一定百分比的植物在处理死亡。

[0101] 表 6. 包含 DMO 编码多核苷酸构建体的大豆植物对于在田地中的麦草畏的发芽前和发芽后施用的耐受性。\*

[0102]

事件#	处理	损伤 %	损伤 %	损伤 %	损伤 %	生长下 降%	损伤 %	生长下 降%	死亡 或矮 化的
		6/7	6/13	6/20	6/27	6/27	7/5	7/5	
1	无喷雾	0	0	0	0	0	2	0	0
1	无喷雾	0	0	0	0	0	0	0	0
2	无喷雾	0	0	0	1	0	3	3	0
2	无喷雾	0	0	0	0	0	0	0	0
3	无喷雾	0	0	0	1	0	3	0	0
3	无喷雾	0	0	0	0	0	3	0	0
4	无喷雾	0	0	0	2	0	0	0	0
4	无喷雾	0	0	0	0	0	5	0	0
5	无喷雾	0	0	0	7	0	5	2	0
5	无喷雾	0	0	0	7	3	7	3	0
1	在播种时发芽前	0	0	0	1	0	0	0	0
1	在播种时发芽前	0	2	0	2	0	0	0	0
2	在播种时发芽前	0	0	0	5	0	0	0	0
2	在播种时发芽前	0	0	0	2	0	0	0	0
3	在播种时发芽前	0	4	0	1	0	0	0	0
3	在播种时发芽前	0	2	0	5	0	3	0	0

[0103]



事件#	处理	损伤	损伤	损伤	损伤	生长下	损伤	生长下	死亡 或矮 化的
		%	%	%	%	降%	%	降%	
		6/7	6/13	6/20	6/27	6/27	7/5	7/5	
4	在播种时发芽前	0	3	0	5	0	0	0	0
4	在播种时发芽前	0	4	0	2	0	0	0	0
5	在播种时发芽前	0	15	15	5	0	0	0	24
5	在播种时发芽前	0	8	10	2	0	0	0	14
1	在 V3 时发芽后	0	0	0	5	0	0	0	0
1	在 V3 时发芽后	0	0	0	7	0	0	0	2
2	在 V3 时发芽后	0	0	0	3	0	0	0	0
2	在 V3 时发芽后	0	0	0	3	0	2	0	1
3	在 V3 时发芽后	0	0	0	3	3	0	0	0
3	在 V3 时发芽后	0	0	0	5	0	3	0	0
4	在 V3 时发芽后	0	0	0	3	0	0	0	0
4	在 V3 时发芽后	0	0	0	3	0	0	0	0
5	在 V3 时发芽后	0	0	0	7	0	2	0	15
5	在 V3 时发芽后	0	0	0	5	5	2	0	15
1	发芽前和发芽后	0	0	0	5	0	0	0	3
1	发芽前和发芽后	0	2	2	5	3	0	0	0
2	发芽前和发芽后	0	0	0	1	0	2	0	0
2	发芽前和发芽后	0	0	0	2	0	0	0	0
3	发芽前和发芽后	0	0	0	3	0	2	0	0
3	发芽前和发芽后	0	2	0	3	0	0	0	0
4	发芽前和发芽后	0	0	0	3	8	2	2	0
4	发芽前和发芽后	0	1	0	3	3	0	0	0
5	发芽前和发芽后	0	15	10	3	5	0	0	23
5	发芽前和发芽后	0	10	10	1	0	0	0	20

[0104] \* 无喷雾意指无麦草畏施用于植物。播种时发芽前意指在种植时施用 1.5lb/ 英亩的麦草畏。在 V3 时发芽后意指在种植后 4 周施用 1.5lb/ 英亩的麦草畏。发芽前和发芽后意指在种植时施用 1.5lb/ 英亩的麦草畏和在种植后 4 周施用 1.5lb/ 英亩的麦草畏。损伤 % 意指在给定日期时的损伤百分比。生长下降 % 意指生长下降的百分比。

[0105] 实施例 6

[0106] 通过麦草畏控制草甘膦耐受性杂草

[0107] 加拿大蓬 (marestail) 是农作物田地中的主要杂草之一。加拿大蓬通过草甘膦得

到有效控制,但关于用其他除草剂控制这种常见杂草的方法的开发是重要的,以使除草剂耐受性发展的机会降到最低。进行分析,以测定这种草甘膦耐受性杂草可以通过麦草畏的施用加以控制的程度。各自来自不同地理区,即加利福尼亚(CA)和肯塔基(KY)的2个生物型的加拿大蓬(*Coryza canadensis*)植物进行生长,且如实施例2和3中所述,在4-6英寸直径莲座叶阶段时用麦草畏进行处理。如表7中所示,研究的结果证实麦草畏在控制来自CA和KY的敏感性和耐受性生物型的加拿大蓬方面同样有效。麦草畏在较低施用比率时在控制抗性生物型方面比草甘膦更有效。例如,需要2100g/ha的草甘膦以获得CA和KY抗性生物型的约77%和91%的抑制,而仅需要280g/ha的麦草畏以获得CA和KY抗性生物型的约83%和约91%的抑制。

[0108] 表7. 草甘膦耐受性杂草经由麦草畏的控制。

[0109]

制剂	比率 g/ha	损伤% (21 DAT)			
		加拿大蓬(CA) 敏感性	加拿大蓬 (CA) 抗性	加拿大蓬 (KY) 敏感性	加拿大蓬 (KY) 抗性
Roundup WeatherMAX <sup>TM</sup>	840	97.2	55.0	76.7	58.3
	1680	100.0	64.2	97.5	79.2
	2100	100.0	76.7	100.0	90.8
Clarity <sup>TM</sup>	50	68.3	61.7	78.3	78.3
	140	82.5	80.8	90.0	88.3
	280	85.0	82.5	91.7	90.8

[0110] 实施例7

[0111] 用于控制田地中的草甘膦耐受性杂草的方法的开发

[0112] 将具有麦草畏耐受性的转基因种子种植在田地中,所述田地种植转基因种子前已用草甘膦进行处理。该田地随后在种植种子前和后用除草有效量的麦草畏进行处理,以控制草甘膦抗性杂草。除草有效量的麦草畏是这样的,即使得草甘膦抗性杂草的生长得到控制,但对于种植的农作物无害,如本文描述的实施例中所示。因此,具有麦草畏耐受性的转基因种子与有效量的麦草畏组合对于控制草甘膦抗性杂草有用。无需麦草畏耐受性农作物植物的延迟种植即可实现该方法,因此提供了超过现有技术的显著进步,现有技术中麦草畏必须充分提前于种植,使得麦草畏在环境中充分降解以避免对于农作物植物的损伤。

[0113] 实施例8

[0114] 麦草畏和草甘膦的组合用于控制草甘膦抗性杂草以允许减少的除草剂施用比率

[0115] 如表 8 中所示,单独的麦草畏在较低施用比率时在控制抗性生物型方面比草甘膦更有效。此外,出乎意料地发现麦草畏与草甘膦组合允许在较低施用比率时控制草甘膦耐受性和敏感性杂草。例如,尽管 200g/ha 的草甘膦在 18DAT 时能够控制仅 6% 的加拿大蓬 (KY 抗性生物型),并且 40g/ha 的麦草畏在 18DAT 时能够控制约 52% 的 KY 生物型,但 200g/ha 草甘膦和 40g/ha 麦草畏混合物在 18DAT 时能够控制约 79% 的 KY 生物型。

[0116] 一般而言,包含麦草畏的任何制剂看起来对于抗性生物型比单独的草甘膦更有效。此外,一般而言,发现草甘膦与麦草畏比率对于抗性生物型的有效性方面的下述趋势是真实的,即 4 : 1 > 10 : 1 > 20 : 1 > 40 : 1 > 80 : 1。该结果显示包含 200g/h 草甘膦和 50g/h 麦草畏的 4 : 1 的草甘膦与麦草畏混合比提供比单独的草甘膦或麦草畏的更好的控制。

[0117] 表 8. 麦草畏和草甘膦用于控制草甘膦抗性杂草的作用。

[0118]

化学制剂	比率 g/ha	比	损伤%		损伤%	
			(18 DAT)		(30 DAT)	
			加拿大蓬 敏感性 (KY)	加拿大蓬 抗性(KY)	加拿大蓬 敏感性 (KY)	加拿大 蓬抗性 (KY)
Roundup WeatherMAX™	200		86.0	5.8	96.3	0.0
	400		99.7	25.0	100.0	18.3
	800		100.0	46.7	100.0	44.2
	1600		100.0	59.2	100.0	62.5
Clarity™	2.5		6.7	10.8	15.8	7.5
	5		18.3	25.0	20.8	35.0
	10		34.2	35.8	29.2	39.2
	20		40.8	45.8	40.0	45.0
	40		50.0	52.5	51.7	68.3
	80		68.3	69.2	71.7	84.3
	100		83.3	75.8	86.3	87.5
	200		89.2	83.3	99.3	94.3
Roundup WeatherMAX™	200 + 2.5	80: 1	50.8	20.8	55.8	31.7
+ Clarity™	400 + 5	80: 1	85.8	39.2	97.7	40.8
	800 + 10	80: 1	99.7	47.5	100.0	45.0
	1600 + 20	80: 1	100.0	50.8	100.0	63.3
Roundup WeatherMAX™	200 + 5	40: 1	56.7	28.3	64.2	35.0
+ Clarity™	400 + 10	40: 1	82.5	40.0	94.2	43.3
	800 + 20	40: 1	99.3	53.3	100.0	60.8
	1600 + 40	40: 1	100.0	70.8	100.0	80.8
Roundup WeatherMAX™	200 + 10	20: 1	58.3	38.3	66.7	40.0
+ Clarity™	400 + 20	20: 1	81.7	56.7	93.3	50.0

[0119]

化学制剂	比率 g/ha	比	损伤 % (18 DAT)		损伤 % (30 DAT)	
			加拿大蓬 敏感性 (KY)	加拿大蓬 抗性(KY)	加拿大蓬 敏感性 (KY)	加拿大 蓬抗性 (KY)
	800 +40	20: 1	99.0	62.5	100.0	73.3
	1600 + 80	20: 1	99.7	77.5	100.0	88.3
Roundup WeatherMAX™	200 + 20	10: 1	56.7	52.5	70.8	60.0
+ Clarity™	400 + 40	10: 1	84.2	79.2	93.3	86.3
	800 + 80	10: 1	98.7	83.3	100.0	96.8
	1600 + 160	10: 1	99.7	89.2	100.0	99.3
Roundup WeatherMAX™	200 + 50	4: 1	61.7	79.2	83.5	87.2
+ Clarity™	400 + 100	4: 1	89.2	88.3	99.7	98.7
	800 + 200	4: 1	99.7	88.3	100.0	99.3
	1600 + 400	4: 1	100.0	89.7	100.0	100.0

[0120] 实施例 9

[0121] 具有麦草畏和草甘膦耐受性的转基因种子的生产

[0122] 用于生产具有草甘膦耐受性的转基因种子的方法是本领域已知的,并且此种种子可以由本领域技术人员通过使用编码草甘膦抗性 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 的多核苷酸进行生产,如美国专利 5,627,061、美国专利 5,633,435、美国专利 6,040,497 以及美国专利 5,094,945、W004074443 和 W004009761 中所述,所有这些专利引入本文作为参考。已生产了包含 Roundup **Ready**® 性状事件 40-3-2 的大豆育种品系 (Padgett 等人,1995)。来自命名为 MON19788 的大豆植物的种子已在 ATCC 保藏号 PTA-6708 下进行保藏。

[0123] 草甘膦耐受性植物还可以通过掺入编码草甘膦降解酶的多核苷酸进行生产,所述酶例如草甘膦氧化还原酶 (GOX,引入本文作为参考的美国专利 5,463,175)、草甘膦-N-乙酰转移酶 (GAT,引入本文作为参考的美国专利公开 20030083480) 和草甘膦脱羧酶 (引入本文作为参考的 W005003362 ;美国专利申请 20040177399)。

[0124] 麦草畏耐受性植物公开于本文。使来自各自的合适品系进行杂交,且用草甘膦和麦草畏的除草剂施用筛选后代种子,以获得表达两种基因且显示出对于麦草畏和草甘膦的耐受性的后代。可替代地,将赋予对于一种或两种除草剂的耐受性的编码序列直接引入给定品系内。如下文描述的,来自这些植物的种子用于开发用于控制田地中的杂草抗性发展的方法。

[0125] 测试具有麦草畏和草甘膦耐受性的转基因种子对于麦草畏、草甘膦或这两种除草剂的耐受性。表 9 显示携带草甘膦和麦草畏耐受性转基因的转基因大豆在植物生长的各个阶段时对于草甘膦、麦草畏、以及草甘膦和麦草畏的耐受性。当任一或两种除草剂在发芽前阶段时施用，未见对于植物的损伤。在 V3、R1 和 R3-4 时任一或两种除草剂的发芽后处理仅显示很少的损伤。

[0126] 表 9. 携带草甘膦和麦草畏耐受性转基因的转基因大豆对于草甘膦、麦草畏、以及草甘膦和麦草畏的耐受性。

[0127]

植物品系	施用的除草剂	比率	发芽前处理	发芽后处理		
				V3	R1	R3-4
		gm ae/ha	20 DAT	8 DAT	7 DAT	18 DAT
			损伤 % (4 次重复的平均值)			
非转基因对照	CLARITY	561	99.0	83.8	71.3	85.0
	RWMax	841	0.0	81.3	66.3	67.5
	CLARITY+RWMax	561+841	99.5	93.8	81.3	99.0
RR1+ DMO 品系 1	CLARITY	561	0.0	7.0	6.3	4.5
	RWMax	841	0.0	3.5	3.5	11.3
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	3.0	4.0	10.0
RR1+ DMO 品系 2	CLARITY	561	0.0	5.3	6.3	5.3
	RWMax	841	0.0	4.5	4.5	11.7
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	5.0	4.0	8.8
RR1+ DMO 品系 3	CLARITY	561	0.0	9.0	8.8	7.5
	RWMax	841	0.0	3.5	4.0	11.3

[0128]

	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	4.5	3.5	10.0
RR1+ DMO 品系 4	CLARITY	561	0.0	8.5	8.8	3.5
	RWMax	841	0.0	3.5	3.5	11.3
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	4.5	4.5	8.8
RR2+ DMO 品系 1	CLARITY	561	0.0	8.5	6.3	5.3
	RWMax	841	0.0	3.5	3.5	3.0
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	5.0	4.5	5.0
RR2+ DMO 品系 2	CLARITY	561	0.0	9.0	6.3	3.0
	RWMax	841	0.0	3.5	6.3	3.0
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	9.5	7.0	3.0
RR2+ DMO 品系 3	CLARITY	561	0.0	9.5	7.5	3.5
	RWMax	841	0.0	3.5	6.3	4.5
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	8.5	3.5	3.3
RR2+ DMO 品系 4	CLARITY	561	0.0	5.3	5.8	3.0
	RWMax	841	0.0	16.5	17.0	4.0
	CLARITY+RWMax	561+841	0.0	11.0	3.5	5.3

[0129] 实施例 10

[0130] 用于控制田地中的杂草抗性发展的方法的开发

[0131] 将如上所述制备的具有麦草畏和草甘膦耐受性的转基因种子种植在田地中。该田地种植种子前或后用麦草畏和草甘膦进行处理，其中使用有效量的麦草畏和草甘膦的混合物以控制杂草生长。一般约 1x 施用比率的任一除草剂在控制杂草生长方面将是有效的，但如本领域已知的，比率可以依环境条件和待控制的杂草类型而变。施用比率还可以增加或减少，这依赖希望的控制比率。一般来说，增加一种除草剂的比率将允许减少第二种除草剂的比率，以便获得相同水平的杂草控制。在具体实施方案中，约 200- 约 1600g/ha 草甘膦的施用与约 20- 约 400g/ha 麦草畏组合。

[0132] 所需施用比率可以在任何特定环境中进行优化，或在特定杂草的背景中可以使用实施例 9 的实验设计进行测定，其中使用本文描述的不同制剂比率。除了所需水平的杂草控制外，选择除草剂水平以一方面避免使用比所需更多的除草剂，且避免可能导致除草剂耐受性植物的弱杂草控制。除草剂的过度施用还可能损害除草剂耐受性农作物。然而，如上文实施例 9 中所示，这些除草剂的组合优化施用提供甚至除草剂耐受性杂草的显著控制水平，且因此代表本领域中的主要进步。

[0133] 实施例 11

[0134] 用于在单次通过中控制田地中的杂草的方法的开发

[0135] 施用实施例 9 和 10 中的操作以开发用于控制在农作物生长环境中的杂草生长的方法，其涉及在包含杂草或其种子的田地中种植转基因种子，且在经过田地的单次通过中

处理田地。处理包含除草有效量的麦草畏、草甘膦或其混合物，其与种子的种植同时施用。转基因种子的种植、处理和生长通过标准农业方法来达到。

[0136] 在一次通过中种植转基因种子和处理转基因种子的此种方法消除了农民进行经过田地的多次通过的需要，包括 1 次用于种植和 1 次用于喷雾。该技术因此减少了对于农民的燃料和穿着损耗成本。

[0137] 实施例 12

[0138] 包含 DMO 编码多核苷酸分子的植物对于其他生长素样除草剂的耐受性

[0139] 除草剂漂移和除草剂送递设备的污染是农业中的严重问题，并且可以损伤非靶农作物，导致农民的损失。然而，由于改变环境条件例如风和生长田地的接近，某些水平的漂移通常是不可避免的。此外，在除草剂施用后消除罐中所有残留水平的除草剂通常是困难和昂贵的，并且残留除草剂通常导致对于农作物的非故意损伤。在可以用于另一种除草剂前通常需要除草剂送递设备的几次冲洗，这浪费水和清洁化学制品。

[0140] 因为诸如 2,4-D 和 MCPA 的除草剂是某些农作物的发芽后除草剂，但可以引起对于非靶农作物的严重损害，所以这些除草剂的残留污染具有特别的关注。对于至少低水平的这些除草剂耐受的转基因农作物因此在控制由于喷雾偏差和除草剂设备污染的损伤中将具有重要价值。这还可以减少除草剂送递设备所需的设备洗涤的程度。

[0141] 因此进行分析，以测定具有 DMO 编码多核苷酸的大豆植物是否能够灭活除麦草畏外的其他生长素样除草剂（包括 2,4-D 和 MCPA）。这通过对包含 DMO 的植物组织或植物施用各种浓度的其他生长素样除草剂的商购可得制剂来进行，所述除草剂例如 2,4-D (Helena, Collierville, TN)、MCPA (Agrilience, St. Paul, MN)、定草酯 (GARLON 3A ;Dow Elanco, Indianapolis, IN)、二氯吡啶酸 (STINGER ;Dow Elanco, Indianapolis, IN)、毒莠定 (TORDON 22K ;Dow Elanco, Indianapolis, IN) 或者 Banvel 或 CLARITY (BASF, Raleigh, NC)。

[0142] 如上文对于命名为事件 1-4 的事件所述的，用 DMO 编码多核苷酸通过土壤杆菌属介导的大豆外植体转化来获得转基因大豆植物。非转基因品系用作对照。将非转基因和转基因大豆种子种植到包含 Redi-earth™ 的 3.5 英寸方形塑料罐内 (Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio)。将罐置于在 35 英寸 × 60 英寸纤维玻璃添水托盘的毛细垫上，用于高架和 / 或地下灌溉用于测试期的持续时间，以便维持最佳土壤湿度用于植物生长。罐用 Osmocote (14-14-14 缓慢释放 ;Scotts-Sierra Horticultural Products Co., Marysville, Ohio) 以 100gm/cu. ft. 的比率进行施肥，以维持植物生长用于温室试验的持续时间，且在温室中在 27°C / 21°C 日 / 夜温度和 25% -75% 相对湿度下生长，以模拟深秋的温暖季节生长条件。需要时用约 600 μ E 的补充光提供 14 小时最低限度光周期。

[0143] 使用 Teejet 9501E 扁平风扇喷嘴 (Spraying Systems Co, Wheaton, IL) 用轨道喷雾器进行所有除草剂施用，其中气压设定为 24psi (165kpa) 的最小值。喷嘴保持在植物材料的顶部上约 16 英寸的高度处用于喷雾。喷雾体积是 10 加仑 / 英亩或 93 升 / 公顷。当植物已达到 V-3 阶段时进行施用。所有实验在随机区组设计（通过比率随机化）中建立，具有每次处理的 4-6 次重复，这依赖植物质量、可用性，且考虑可能已在每个温室的范围内发生的任何环境变异性。



[0144] 相对于未处理的对照植物,在温室实验中所有处理的植物在处理后的约 4、14、18 和 21 天时 (DAT) 以 0-100 的等级肉眼评估损伤,其中 0 表示“无”损伤,100%表示“完全”损伤或死亡。使用掌上电脑收集数据且使用标准统计学方法进行分析。表 10 中所示的结果清楚地指出相对于非转基因品系,转基因大豆对于其他生长素样除草剂例如 2,4-D 和 MCPA 的耐受性。

[0145] 表 10. 相对于未处理的对照,在 25DAT 时不同生长素样除草剂的 V3 后施用对于非转基因或转基因大豆植物的损伤百分比。\*

[0146]

除草剂	植物/实验	在 21 DAT 时在所示比率 (g ae/ha**) 时的损伤 %					
		280		561		1120	
<b>麦草畏 (Clarity)</b>							
	非转基因			100		100	
	事件 1			0.0		1.2	
	事件 2			0.0		1.7	
	事件 3			0.0		0.7	
	事件 4			0.0		1.5	
<b>麦草畏 (Banvel)</b>							
	非转基因			100.0		100.0	
	事件 1			0.0		1.5	
	事件 2			0.0		0.7	
	事件 3			0.0		0.5	
	事件 4			0.0		1.3	
<b>2,4-D</b>							
	非转基因	86.8		100.0		100.0	
	事件 1	58.3		75.0		100.0	
	事件 2	64.2		94.7		100.0	
	事件 3	40.0		85.0		100.0	
	事件 4	45.8		84.2		100.0	
<b>MCPA</b>							
	非转基因	93.0		98.3		100.0	
	事件 1	72.5		99.3		100.0	
	事件 2	55.0		95.0		99.7	
	事件 3	55.0		95.8		100.0	
	事件 4	88.3		98.8		100.0	
	<i>LSD</i>	16.3		10.6		3.7	

[0147]

除草剂	植物/实验	在 21 DAT 时在所示比率 (g ae/ha**) 时的损伤 %					
		在 14 DAT 时在所示比率 (g ae/ha**) 时的损伤 %					
定草酯							
	非转基因	86.7		97.3		98.7	
	事件 1	88.3		95.7		99.3	
	事件 2	86.7		98.7		99.3	
	事件 3	86.7		94.0		96.3	
	事件 4	90.8		98.0		99.2	
二氯吡啶酸							
	非转基因	99.3		100.0		100.0	
	事件 1	99.2		100.0		100.0	
	事件 2	98.2		99.7		100.0	
	事件 3	99.3		100.0		100.0	
	事件 4	99.7		100.0		100.0	
毒莠定							
	非转基因	99.3		100.0		100.0	
	事件 1	99.7		100.0		100.0	
	事件 2	99.3		100.0		100.0	
	事件 3	99.3		99.7		100.0	
	事件 4	99.3		100.0		100.0	
	LSD	2.9		1.8		1.4	

[0148] \* 损伤%表示为 ANOVA 平均值比较。 \*\* 活性酸等价物的克 / 公顷

[0149] 另一种生长素样除草剂 Butyrac 200 (2,4-DB ;Albaugh) 也在携带 DMO 基因的转基因大豆植物上进行测试,用于测试对它的植物耐受性。除草剂作为发芽后处理以 3 个施用比率施用于 2 种转基因大豆事件,且针对所有 3 个施用比率 :280g/ha(0.251b/a)、561g/ha(0.51b/a) 和 841g/ha(0.751b/a) (参见表 11),与非转基因品系比较总体农作物损伤。2 种转基因大豆品系都显示出对于 2,4-DB 低水平的耐受性。这个实施例显示麦草畏耐受性大豆对于低水平的 2,4-DB 也是耐受的,并且在控制来自相同或邻近田地的喷雾偏差的损害中应当是有用的,以阻止农作物损失,并且将显示出在除草剂递送设备的不彻底洗涤后对于残留水平的 2,4-DB 的耐受性。

[0150] 表 11. 通过将 2,4-DB 施用于非转基因或转基因大豆植物在 16DAT 时相对于未处理的对照的损伤百分比。

[0151]

除草剂	植物	在 16 DAT 时在所示比率 (g ae/ha**) 时的损伤 %		
		280	561	1120
2, 4-DB ( Butyrac 200 )				
	非 转 基 因 NE3001	59.2	70.0	79.2
	462-1-21	25.0	43.3	75.8
	469-13-19	18.3	37.5	70.0

[0152] 这个实施例显示转基因大豆植物显示出对于其他生长素样除草剂的耐受性,指出关于麦草畏和其他生长素样除草剂例如 2,4-D 和 MCPA 的可能共有的灭活机制。在定草酯、二氯吡啶酸和毒莠定的情况下,280g ae/ha 的施用比率在这个研究中看起来太严格了,且因此在大多数背景中可能需要更低的浓度以减少植物损害。因此,对于麦草畏耐受的包含 DMO 多核苷酸的大豆对于低水平的 2,4-D 和 MCPA 也是耐受的,且应阻止或使来自相同或邻近田地的喷雾偏差的损害降到最低,以阻止农作物损失,并且应显示出在除草剂递送设备的不彻底洗涤后对于残留水平的这些除草剂的耐受性。除草剂递送设备应包括罐、容器、软管、过滤器、杆、喷雾器、喷嘴、泵以及配件,例如联接器、弯管、柄和阀。递送设备可手动操作或例如在农场车辆、飞机和直升机等上机械操作。

[0153] 实施例 13

[0154] 麦草畏耐受性转基因玉米植物的生产

[0155] 为了测试 DMO 基因在给单子叶植物提供麦草畏耐受性中的用途,生产转基因玉米植物,其包含植物基因表达元件例如启动子(例如 PC1SV、e35S、OsAct1、OsTPI、OsAct15)和内含子(例如 OsAct1、OsAct15、OsTPI、ZmHSP70)控制下的如上文公开的 DMO 基因,其中含或不含转运肽(例如 TaWaxy、CTP1、CTP2synthetic、CTP4)。这个表达元件包含来自稻肌动蛋白 1 基因的第一个内含子和侧翼 UTR 外显子序列,并且在 5' 末端处包括外显子 1 的 12nt 并且在 3' 末端处包含外显子 2 的 7nt) 以及 3' UTR(例如 TaHsp17)。各种表达元件的核苷酸序列和 / 或专利参考文献公开于共同未决的申请美国序列号 60/891,675 中。

[0156] 通过本领域已知的方法例如 W09506722 和美国专利申请 20040244075 生产转基因玉米植物。具有单拷贝的转基因玉米事件在单位置重复实验中评估麦草畏耐受性。使用来自 6 种构建体中的每一种的 6 个事件。实验设计如下:行 / 条目:1;处理:在 V3 阶段时 0.51b/a 的麦草畏随后为在 V8 阶段时 11b/a 的麦草畏 (**Clarity®**, BASF, Raleigh, NC);重复:2;行距:30 英寸;区块长度:最小 20 英尺;植物密度:约 30 棵植物 / 17.5ft;小径:2.5 英尺。整个区块均匀地施肥以获得农业上可接受的农作物。在种植时以 5oz. / 1000ft. 行施用土壤杀虫剂例如 **Force®** 3G (Syngenta Crop Protection, Greensboro, NC, USA) 用于控制玉米根虫。如果观察到黑色切根虫侵袭,那么使用 4-8oz. / 英亩比率的 **POUNCE®**

3. 2EC(FMC Corporation, Philadelphia, PA)。此外,杀虫剂喷雾方案用于控制所有地上鳞翅目害虫,包括欧洲玉米螟、玉米穗蛾和秋夜蛾。**POUNCE®** 3. 2EC 以 4-8oz./ 英亩每 3 周进行施用以控制鳞翅目害虫;进行约 4 次施用。区块用除草剂例如**Harness®** Xtra 5. 6L(Monsanto, St. Louis, MO) 和 Degree **Xtra®** (Monsanto, St. Louis, MO) 的发芽前施用维持无杂草。如果在未处理的检查中观察到杂草逃逸,那么在整个实验中通过手工除草或 PERMIT(Monsanto, St. Louis, MO) 或**BUCTRIL®** (Bayer, Research Triangle Park, NC) 的发芽后施用来控制它们。

[0157] 当在 V3 阶段时用 0. 5lb/a 的麦草畏随后在 V8 阶段时用 1lb/a 的麦草畏处理时,用包含 DMO 转基因的 DNA 构建体转化的玉米自交品系通过测量支柱根损伤而测试麦草畏耐受性。支柱根损伤通过与“指状”结构的一般形态比较,对行中显示具有融合的支柱根的“非典型”形态的植物数目进行计数而肉眼评估。如表 12 中所示,用编码未与 CTP 连接的 DMO 的 DNA 构建体 (pMON73699、pMON73704) 转化的玉米植物显示更高水平的支柱根损伤,即在麦草畏处理后更低水平的保护。编码与 CTP 连接的 DMO 的构建体 (pMON73716、pMON73700、pMON73715、pMON73703) 显示更低水平的支柱根损伤,即在麦草畏处理后更高水平的保护。

[0158] 表 12. 作为用携带 DMO 的 DNA 构建体转化的转基因玉米植物所显示的麦草畏耐受性测量值的支柱根损伤百分比。

[0159]

近交 / 构建体	细节	支柱根损伤
01CS16	对于麦草畏敏感的近交	95. 4
LH244	对于麦草畏抗性的近交	93. 8
pMON73699	PC1SV/I-OsAct1/DMO-Wmc/TaHsp17	93. 2
pMON73704	e35S/I-OsAct1/DMO-Wmc/TaHsp17	91. 3
pMON73716	PC1SV/I-OsAct1/TaWaxy/DMO-Wmc/TaHsp17	78. 8
pMON73700	PC1SV/I-OsAct1/CTP1/DMO-Wmc/TaHsp17	74. 4
pMON73715	PC1SV/I-OsAct1/CTP2syn/DMO-Wmc/TaHsp17	68. 2
pMON73703	e35S/I-OsAct1/CTP1/DMO-Wmc/TaHsp17	68. 8

[0160] 实施例 14

[0161] 麦草畏耐受性转基因棉花植物的生产

[0162] 为了测试 DMO 基因在给棉花提供麦草畏耐受性中的用途,生产转基因棉花植物。如下产生了携带植物基因表达元件例如启动子 (例如 PC1SV、FMV 或 e35S) 和 3' UTR (例如 E6 ;登记 #U30508) 控制下的如本文公开的 DMO 编码区的几种 DNA 构建体,其中含转运肽 (例如 PsRbcS CTP,CTP1,CTP2),且转化到棉花 (*Gossypium hirsutum*) 内。关于各种表达元件的核苷酸序列和 / 或专利参考文献公开于共同未决的申请美国序列号 60/891,675 中。使

用的材料在表 13 中指出。

[0163] 例如如根据美国专利申请公开 20040087030 中所述,经由胚胎发生方法进行棉花转化。使棉花 cv Coker 130 的外植体在体外且在携带目的 DNA 构建体的根癌土壤杆菌的液体悬浮液存在下进行生长,使用包含卡那霉素的培养基上的选择。然后将推定的转基因幼苗转移至土壤以获得成熟的棉花植物。转化体的转基因性质通过 DNA 测试加以证实。

[0164] 表 13. 用于棉花转化的各种培养基的组成。

[0165]

组分	量/L				
	葡萄糖	蔗糖	UMO	TRP+	SHSU
MS 基础盐 (Phytotech.)	4.33 g	4.33 g	4.33 g	4.33 g	-
Gamborg's B5 维生素(Phytotech) (500X)	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	-
2, 4-D (1 mg/ml)	0.1 ml	0.1 ml	-	-	-
Stewart 和 Hsu 主要成分 (10X)	-	-	-	-	100 ml
Stewart 和 Hsu 次要成分 (100X)	-	-	-	-	10 ml
Stewart 和 Hsu 有机成分 (100X)	-	-	-	-	10 ml
细胞分裂素 (0.5 mg/ml)	1 ml	1 ml	-	-	-
螯合铁 (100X)	-	-	-	-	1.5 ml
葡萄糖	30 g	30 g	30 g	30 g	5 g
硝酸钾	-	-	-	1.9 g	-
酪蛋白水解物	-	-	-	0.1 g	-
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	6.8
Phytigel (Sigma)	2.5 g	2.5 g	-	-	-
脱乙酰吉兰糖胶 (Kelco)	-	-	3.5 g	3.5 g	2.2 g
羧苄青霉素 (250 mg/ml)	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml	-
头孢噻肟 (100 mg/ml)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
苯菌灵 (50 mg/ml)	-	-	-	1 ml	1 ml
卡那霉素 (50 mg/ml)	0.8-1.0 ml	0.8-1.0 ml	1 ml	-	-
蔗糖	-	0.1 g	-	-	-
抗坏血酸	-	-	100 mg	-	-

[0166] 包含 DNA 构建体 (即各自包含 DMO 编码区与转运肽、启动子和 3' UTR 的不同组合) 的经转化的棉花植物用麦草畏 (Clarity®, BASF, Raleigh, NC) 进行处理,以 561g ae/ha(0.51b/a) 的比率在 V4-5 生长阶段时作为发芽后处理,且发现是耐受的,而未转化的棉花植物显示 79% -86% 的损伤比率。选择显示超过 95% 耐受性 (等于小于 5% 损伤) 的转

基因植物用于进一步的研究。转基因植物对于麦草畏的后续发芽后处理也是耐受的。例如，在 V3-4 阶段时用 0.5lb/ 英亩的麦草畏随后在 V5 或稍后阶段时用 1 或 2lb/ 英亩的麦草畏处理的植物对于麦草畏仍是耐受的。还对 R1 转基因种子和植物实施发芽前或发芽前和发芽后麦草畏处理，且发现是耐受的。这个实施例显示 DMO 基因在生长的各个阶段时可以对棉花提供麦草畏耐受性，因此使得能够在各个阶段时施用麦草畏以获得有效的杂草控制。

[0167] \*\*\*\*\*

[0168] 本文公开和要求保护的所有组合物和 / 或方法可以根据本公开不用过度实验进行和实施。尽管已经按照优选实施方案描述了本发明的组合物和方法，但是本领域技术人员显而易见的是改变的方案可施用于所述组合物和 / 或方法和本文公开的方法的步骤或步骤的顺序中而不背离本发明的概念、精神和范围。更特别地，将显而易见的是化学和生理学相关的某些物质可以代替本文描述的物质而将实现相同或相似的结果。认为本领域技术人员显而易见的所有此类相似的替代和修饰都在所附权利要求限定的本发明的精神、范围和概念之内。

[0169] 参考文献

[0170] 下文列出的参考文献引入本文作为参考，其程度至它们补充、解释、提供关于本文使用的方法、技术和 / 或组合物的背景，或教导本文使用的方法、技术和 / 或组合物。

[0171] 美国专利 4,554,101 ; 美国专利 5,004,863 ; 美国专利 5,015,580 ; 美国专利 5,017,692 ; 美国专利 5,094,945 ; 美国专利 5,159,135 ; 美国专利 5,322,938 ; 美国专利 5,352,605 ; 美国专利 5,359,142 ; 美国专利 5,384,253 ; 美国专利 5,424,412 ; 美国专利 5,445,962 ; 美国专利 5,463,175 ; 美国专利 5,508,184 ; 美国专利 5,530,196 ; 美国专利 5,538,880 ; 美国专利 5,550,318 ; 美国专利 5,552,299 ; 美国专利 5,567,600 ; 美国专利 5,567,862 ; 美国专利 5,591,616 ; 美国专利 5,627,061 ; 美国专利 5,633,435 ; 美国专利 5,633,437 ; 美国专利 5,635,055 ; 美国专利 5,641,876 ; 美国专利 5,689,052 ; 美国专利 5,750,871 ; 美国专利 5,824,877 ; 美国专利 5,837,848 ; 美国专利 5,846,797 ; 美国专利 5,859,347 ; 美国专利 5,939,602 ; 美国专利 5,981,840 ; 美国专利 6,040,497 ; 美国专利 6,140,078 ; 美国专利 6,160,208 ; 美国专利 6,175,060 ; 美国专利 6,177,611 ; 美国专利 6,232,526 ; 美国专利 6,252,138 ; 美国专利 6,294,714 ; 美国专利 6,384,301 ; 美国专利 6,388,170 ; 美国专利 6,399,861 ; 美国专利 6,403,865 ; 美国专利 6,414,222 ; 美国专利 6,426,446 ; 美国专利 6,429,357 ; 美国专利 6,429,362 ; 美国专利 6,433,252 ; 美国专利 6,437,217 ; 美国专利 6,613,963 ; 美国专利 6,635,806 ; U. S. Pat. No. 6,677,503 ; 美国专利 7,132,528

[0172] 美国申请序列 09/757,089

[0173] 美国专利申请公开 20030083480

[0174] 美国专利申请公开 20030135879

[0175] 美国专利申请公开 2004087030

[0176] 美国专利申请公开 20070079393

[0177] 美国临时专利申请序列号 60/891,675

[0178] Anonymous, Greenbook Crop Protection Reference, 第 23 版, Greenbook Products, Lenexa, KS, 2007.

- [0179] Becker 等人, *Plant Mol. Biol.*, 20(1) :49-60, 1992.
- [0180] Behrens 等人, *Science* 316 :1185-1188, 2007.
- [0181] Buchanan-Wollaston 等人, *J. Cell. Biochem.*, Supp. 13D, 330, 1989.
- [0182] Chandler 等人, *Plant Cell*, 1 :1175-1183, 1989.
- [0183] Chandler, In :*CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*, Pimentel (编辑), I :95-109, 1981.
- [0184] Comai 等人, *Nature*, 317 :741, 1985.
- [0185] Cork 和 Khalil, *Adv. Appl. Microbiol.*, 40 :289-321, 1995.
- [0186] Cork 和 Krueger, *Adv. Appl. Microbiol.*, 36 :1-66, 1991.
- [0187] Coruzzi 等人, *EMBO J.*, 3 :1671, 1984.
- [0188] Creissen 等人, *Plant J.*, 8(2) :167-175, 1995.
- [0189] *Crop Protection Chemicals Reference*, Chemical & Pharmaceutical Press, Inc., NY, 第 11 版, 1803-1821, 1995
- [0190] De Block 等人, *EMBO J.*, 6(9) :2513-2518, 1987.
- [0191] della-Cioppa 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :6873-6877, 1986.
- [0192] Ebert 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 :5745-5749, 1987.
- [0193] 欧洲申请 553494
- [0194] 欧洲申请 646643
- [0195] Klee 等人, *Mol. Gen. Genet.*, 210 :437-442, 1987.
- [0196] Kyte 和 Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1) :105-132, 1982.
- [0197] Lawton 等人, *Plant Mol. Biol.* 9 :315-324, 1987.
- [0198] Mazur, 等人, *Nucleic Acids Res.*, 13(7) :2373-2386, 1985.
- [0199] Miki 等人, In :*Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick 和 Thompson (编辑), CRC Press, 67-88, 1993.
- [0200] Misawa 等人, *Plant J.*, 4 :833-840, 1993.
- [0201] Misawa 等人, *Plant J.*, 6 :481-489, 1994.
- [0202] Odell 等人, *Nature*, 313 :810-812, 1985.
- [0203] Padgett 等人, *Crop Sci.*, 35 :1451-1461, 1995.
- [0204] PCT 申请 WO 95/06722
- [0205] PCT 申请 WO 97/41228
- [0206] PCT 申请 WO 96/38567
- [0207] PCT 申请 WO 97/31115
- [0208] PCT 申请 WO 97/11086
- [0209] PCT 申请 WO 04009761
- [0210] PCT 申请 WO 04074443
- [0211] Sathasiivan 等人, *Nucl. Acids Res.*, 18 :2188-2193, 1990.
- [0212] Stalker 等人, *Science*, 242 :419, 1988.
- [0213] Stalker 等人, *Science*, 242 :419-422, 1988.
- [0214] Streber 和 Willmitzer, *Bio/Technology*, 7 :811, 1989.



- [0215] VanGessel 和 Majek, 2005 Soybean Weed Management Guide :for Delaware and New Jersey, University of Delaware and Rutgers University, 2005.
- [0216] Walker 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 :6624, 1987.
- [0217] Yang 和 Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 :4144-4148, 1990.
- [0218] Zhang 等人, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56 :37-46, 1999.

## 序列表

<110>FENG, PAUL C. C.

BRINKER, RONALD J.

<120> 用于控制杂草的方法

<130>MONS :083US

<140> 未知

<141>2007-06-05

<150>60/811, 276

<151>2006-06-06

<160>32

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>1023

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>1

```

atggccactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag      60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga      120
gttgtecgctg cctgcttga tatttgtccg catcgcttcg ctccggtgag tgacgggtatt      180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag      240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgcctgctt ctctgaacgt gcgacatc      300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccctg gagatccage actcgcagat      360
cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgcggaggt      420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac      480
gctcagtagc tgcaccgcgc taacgcccac acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag      540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatagaaga tccctggtgg cacaccctca      600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc      660

```

cggtggaata aggtgtcggc tatgetgaac ttcacgcggg tcgcgccgga agggacgccg 720  
 aaggagcagt caatccactc cegaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc 780  
 tgccattact tcttcggttag tteccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840  
 gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900  
 atcgaaaggc ggagggetta cgtegaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc 960  
 gacgaggcag ccgtcagggt atccaggagg attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020  
 tga 1023

<210>2

<211>340

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>2

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu  
                   20                   25                   30  
 Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile  
                   35                   40                   45  
 Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
                   50                   55                   60  
 His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65                   70                   75                   80  
 Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
                   85                   90                   95  
 Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
                   100                   105                   110  
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
                   115                   120                   125  
 Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
                   130                   135                   140  
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145                   150                   155                   160  
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg

	165	170	175
Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met			
	180	185	190
Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg			
	195	200	205
Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys			
	210	215	220
Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro			
225	230	235	240
Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu			
	245	250	255
Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly			
	260	265	270
Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln			
	275	280	285
Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg			
	290	295	300
Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys			
305	310	315	320
Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln			
	325	330	335
Leu Glu Ala Ala			
	340		

<210>3

<211>1023

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>3

atgctcactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag	60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgta acctgacgga	120
gttgctgctg cctgcttga tatttgctcg catcgcttgc ctccgcttgc tgacggtatt	180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag	240
tgtgtccaca acccgacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc	300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctgccctg gagatccagc actcgcagat	360

```

cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt 420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac 480
gctcagtacg tgcaccgegc taacgeccaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag 540
gtgateggtg gcgacggcga gatecaggcg ctcatagaaga tccctgggtg cacaccctca 600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc 660
cggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcatacggg tcgcgccgga agggacgccg 720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcetta ctcctgagac cgaggcaagc 780
tgccattact tcttcggtag tteccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt 840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct 900
atcгааaggc ggagggctta cgtegaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc 960
gacgaggcag ccgtcagggt atccagggag attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg 1020
tga 1023

```

<210>4

<211>340

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>4

```

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
1           5           10           15
Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
           20           25           30
Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
           35           40           45
Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
           50           55           60
His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
65           70           75           80
Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn
           85           90           95
Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys
           100          105          110
Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly
           115          120          125

```

Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
 130 135 140  
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175  
 Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220  
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210>5

<211>1023

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>5

atgctcactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag

60

```

aagcctctag gaagaactat cctegatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga      120
gttgtegctg ccctgcttga tatttgtecg catcgcttcg ctccgttgag tgacggtatt      180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggctctgg aatttgacgg aggtggccag      240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc      300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actcgcagat      360
cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt      420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac      480
gctcagtacg tgcaccgcgc taacgcecaa acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag      540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctgggtg cacaccctca      600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtgggtct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc      660
cgggtgaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcatcgcgg tcgcgccgga agggacgccg      720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctcctgagac cgaggcaagc      780
tgccattact tcttcggtag ttcccgcaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt      840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct      900
atcgaaaggc ggagggctta cgtegaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc      960
gacgaggcag ccgtcagggt atccaggagg attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg      1020
tga                                                                           1023

```

<210>6

<211>340

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>6

```

Met Leu Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
1           5           10           15
Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
           20           25           30
Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
           35           40           45
Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly
           50           55           60
His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln
65           70           75           80
Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn

```

	85	90	95
Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp			
	100	105	110
Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly			
	115	120	125
Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val			
	130	135	140
Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His			
145	150	155	160
Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg			
	165	170	175
Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met			
	180	185	190
Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg			
	195	200	205
Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys			
	210	215	220
Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro			
225	230	235	240
Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu			
	245	250	255
Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly			
	260	265	270
Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln			
	275	280	285
Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg			
	290	295	300
Arg Ala Tyr Val Glu Ala Ash Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys			
305	310	315	320
Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln			
	325	330	335
Leu Glu Ala Ala			
	340		

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;1023

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;人工序列



<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>7

```

atggccacct tcgtccgcaa tgcttggtat gtggcggcgc tgcccaggga actgtccgaa      60
aagccgctcg gccggacgat tctcgacaca ccgctcgcgc tctaccgcca gcccgacggt      120
gtggtcgcgg cgctgctega catctgtccg caccgcttcg cgccgctgag cgacggcatc      180
ctcgtcaacg gccatctcca atgcccctat cacgggctgg aattcgatgg cggcgggcag      240
tgcgtccata acccgcacgg caatggcgcc cgcccggctt cgctcaacgt ccgctccttc      300
ccggtggtgg agcgcgacgc gctgatctgg atctgtcccg gcgatccggc gctggccgat      360
cctggggcga tccccgactt cggtcgccgc gtcgatcccg cctatcggac cgtcggcggc      420
tatgggcatg tcgactgcaa ctacaagctg ctggtcgaca acctgatgga cctcggccac      480
gccaatatg tccatcgcgc caacgcccag accgacgcct tcgaccggct ggagcgcgag      540
gtgatcgtcg gcgacggtga gacacaggcg ctgatgaaga ttcccggcgg cacgccgagc      600
gtgctgatgg ccaagttcct gcgcggcgcc aatacccccg tcgacgcttg gaacgacatc      660
cgctggaaca aggtgagcgc gatgctcaac ttcatcgcgg tggcgccgga aggcaccccg      720
aaggagcaga gcatccactc gcgcggtacc catatcctga cccccgagac ggaggcgagc      780
tgccattatt tcttcggctc ctcgcgcaat ttcggcatcg acgatccgga gatggacggc      840
gtgctgcgca gctggcaggc tcaggcgctg gtcaaggagg acaaggctgt cgtcgaggcg      900
atcgagcgcg gcccgcccta tgctgaggcg aatggcatcc gcccggcgat gctgtcgtgc      960
gacgaagccg cagtcctgtg cagccgcgag atcgagaagc ttgagcagct cgaagccgcc     1020
tga                                                                                   1023

```

<210>8

<211>340

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>8

```

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu
1           5           10           15
Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu
           20           25           30
Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile
           35           40           45

```

Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly  
 50 55 60  
 His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln  
 65 70 75 80  
 Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn  
 85 90 95  
 Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Cys  
 100 105 110  
 Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly  
 115 120 125  
 Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val  
 130 135 140  
 Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg  
 165 170 175  
 Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met  
 180 185 190  
 Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg  
 195 200 205  
 Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys  
 210 215 220  
 Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu  
 245 250 255  
 Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly  
 260 265 270  
 Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln  
 275 280 285  
 Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg  
 290 295 300  
 Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210>9

<211>1023

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>9

```

atggccactt tcgtagaaa cgcttggtac gttgctgcac ttcctgagga gttgagcgag      60
aagcctctag gaagaactat cctcgatact ccactagctc tctatcgtca acctgacgga      120
gttgctcgctg ccctgcttga tatttgctccg catcgcttcg ctccgcttgag tgacggtatt      180
ctagtcaacg gacatctcca gtgtccatat cacggtctgg aatttgacgg aggtggccag      240
tgtgtccaca acccgcacgg caacggagcc cgccctgctt ctctgaacgt gcgatcattc      300
cctgtcgtgg aaagagacgc attgatctgg atctggcctg gagatccagc actcgcagat      360
cccggtgcta tccctgactt tgggtgtcgt gttgatccag cttaccgtac tgtcggaggt      420
tacggtcacg tggactgcaa ctacaagctc cttgtggata acctcatgga tcttggacac      480
gctcagtacg tgcaccgcgc taacgcccac acagacgcct tcgatagact tgagcgtgag      540
gtgatcgttg gcgacggcga gatccaggcg ctcatgaaga tccctggtgg cacaccctca      600
gttctcatgg ctaagttctt gcgtggtgct aacacaccag ttgacgcctg gaacgacatc      660
cgggtggaata aggtgtcggc tatgctgaac ttcctcgcgg tcgctccgga agggacgccg      720
aaggagcagt caatccactc ccgaggaacc catatcctta ctctgagac cgaggcaagc      780
tgccattact tcttcggtag ttcccgaac ttcggtatag acgatccaga gatggacggt      840
gttctcagga gctggcaagc tcaagccctg gtgaaggagg acaaagtggc cgttgaagct      900
atcgaaaggc ggagggctta cgctgaagcg aacgggatca gacccgccat gttgtcctgc      960
gacgagcgag ccgtcagggt atccaggagg attgagaagc tcgaacaact agaagcggcg     1020
tga                                                                                   1023

```

<210>10

<211>340

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于来自嗜麦芽假单胞菌的麦草畏单加氧酶基因

<400>10

Met Ala Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu

1	5	10	15
Glu Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu			
	20	25	30
Ala Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val Val Ala Ala Leu Leu Asp Ile			
	35	40	45
Cys Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly			
	50	55	60
His Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln			
65	70	75	80
Cys Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn			
	85	90	95
Val Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp			
	100	105	110
Pro Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly			
	115	120	125
Cys Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val			
130	135	140	
Asp Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His			
145	150	155	160
Ala Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg			
	165	170	175
Leu Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met			
	180	185	190
Lys Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg			
	195	200	205
Gly Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys			
	210	215	220
Val Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro			
225	230	235	240
Lys Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu			
	245	250	255
Thr Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly			
	260	265	270
Ile Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln			
	275	280	285
Ala Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg			
	290	295	300
Arg Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys			
305	310	315	320

Asp Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln  
 325 330 335  
 Leu Glu Ala Ala  
 340

<210>11

<211>1020

<212>DNA

<213> 嗜麦芽假单胞菌

<400>11

atgaccttcg tccgcaatgc ctggtatgtg gcggcgctgc ccgaggaact gtccgaaaag 60  
 ccgctcggcc ggacgattct cgacacaccg ctcgcgctct accgccagcc cgacggtgtg 120  
 gtcgcggcgc tgctcgacat ctgtccgcac cgcttcgcgc cgctgagcga cggcatcctc 180  
 gtcaacggcc atctccaatg cccctatcac gggctggaat tcgatggcgg cgggcagtgc 240  
 gtccataacc cgcacggcaa tggegcgccg cggcttcgc tcaacgtccg ctcttccc 300  
 gtggtggagc gcgacgcgct gatctggate tggcccggcg atccggcgct ggccgatcct 360  
 gggcgatcc cgcacttcgg ctgccgcgct gatcccgcct atcggaccgt cggcggtat 420  
 gggcatgtcg actgcaacta caagctgctg gtcgacaacc tgatggacct cggccacgcc 480  
 caatatgtcc atcgcgcaa cgcccagacc gacgccttcg accggctgga gcgcgaggtg 540  
 atcgtcggcg acggtgagat acaggcgctg atgaagattc ccggcggcac gccgagcgtg 600  
 ctgatggcca agttcctgcg cggcgccaat acccccgtcg acgcttgga cgacatccgc 660  
 tggaacaagg tgagcgcgat gctcaacttc atcgcggtgg cgccggaagg caccgccgaag 720  
 gagcagagca tccactcgcg cggtagccat atcctgaccc ccgagacgga ggcgagctgc 780  
 cattatttct tcggctctc gcgcaatttc ggcatcgacg atccggagat ggacggcgtg 840  
 ctgcgcagct ggcaggctca ggcgctggtc aaggaggaca aggtcgtcgt cgaggcgatc 900  
 gagcggccgc gcgcctatgt cgaggcgaat ggcatccgcc cggcgatgct gtcgtgcgac 960  
 gaagccgcag tccgtgtcag ccgcgagatc gagaagcttg agcagctcga agccgcctga 1020

<210>12

<211>339

<212>PRT

<213> 嗜麦芽假单胞菌

<400>12

Met Thr Phe Val Arg Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Leu Pro Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Glu Lys Pro Leu Gly Arg Thr Ile Leu Asp Thr Pro Leu Ala

20	25	30
Leu Tyr Arg Gln Pro Asp Gly Val ValAla Ala Leu Leu Asp Ile Cys		
35	40	45
Pro His Arg Phe Ala Pro Leu Ser Asp Gly Ile Leu Val Asn Gly His		
50	55	60
Leu Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Phe Asp Gly Gly Gly Gln Cys		
65	70	75
Val His Asn Pro His Gly Asn Gly Ala Arg Pro Ala Ser Leu Asn Val		
85	90	95
Arg Ser Phe Pro Val Val Glu Arg Asp Ala Leu Ile Trp Ile Trp Pro		
100	105	110
Gly Asp Pro Ala Leu Ala Asp Pro Gly Ala Ile Pro Asp Phe Gly Cys		
115	120	125
Arg Val Asp Pro Ala Tyr Arg Thr Val Gly Gly Tyr Gly His Val Asp		
130	135	140
Cys Asn Tyr Lys Leu Leu Val Asp Asn Leu Met Asp Leu Gly His Ala		
145	150	155
Gln Tyr Val His Arg Ala Asn Ala Gln Thr Asp Ala Phe Asp Arg Leu		
165	170	175
Glu Arg Glu Val Ile Val Gly Asp Gly Glu Ile Gln Ala Leu Met Lys		
180	185	190
Ile Pro Gly Gly Thr Pro Ser Val Leu Met Ala Lys Phe Leu Arg Gly		
195	200	205
Ala Asn Thr Pro Val Asp Ala Trp Asn Asp Ile Arg Trp Asn Lys Val		
210	215	220
Ser Ala Met Leu Asn Phe Ile Ala Val Ala Pro Glu Gly Thr Pro Lys		
225	230	235
Glu Gln Ser Ile His Ser Arg Gly Thr His Ile Leu Thr Pro Glu Thr		
245	250	255
Glu Ala Ser Cys His Tyr Phe Phe Gly Ser Ser Arg Asn Phe Gly Ile		
260	265	270
Asp Asp Pro Glu Met Asp Gly Val Leu Arg Ser Trp Gln Ala Gln Ala		
275	280	285
Leu Val Lys Glu Asp Lys Val Val Val Glu Ala Ile Glu Arg Arg Arg		
290	295	300
Ala Tyr Val Glu Ala Asn Gly Ile Arg Pro Ala Met Leu Ser Cys Asp		
305	310	315
Glu Ala Ala Val Arg Val Ser Arg Glu Ile Glu Lys Leu Glu Gln Leu		
325	330	335

Glu Ala Ala

<210>13

<211>455

<212>PRT

<213> 根癌土壤杆菌

<400>13

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

Val Pro Gly Asp Pro Ser Ser Thr Ala Phe Pro Leu Val Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Leu Val Pro Gly Ser Asp Val Thr Ile Leu Asn Val Leu Met Asn Pro  
 260 265 270  
 Thr Arg Thr Gly Leu Ile Leu Thr Leu Gln Glu Met Gly Ala Asp Ile  
 275 280 285  
 Glu Val Ile Asn Pro Arg Leu Ala Gly Gly Glu Asp Val Ala Asp Leu  
 290 295 300  
 Arg Val Arg Ser Ser Thr Leu Lys Gly Val Thr Val Pro Glu Asp Arg  
 305 310 315 320  
 Ala Pro Ser Met Ile Asp Glu Tyr Pro Ile Leu Ala Val Ala Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Ala Glu Gly Ala Thr Val Met Asn Gly Leu Glu Glu Leu Arg Val  
 340 345 350  
 Lys Glu Ser Asp Arg Leu Ser Ala Val Ala Asn Gly Leu Lys Leu Asn  
 355 360 365  
 Gly Val Asp Cys Asp Glu Gly Glu Thr Ser Leu Val Val Arg Gly Arg  
 370 375 380  
 Pro Asp Gly Lys Gly Leu Gly Asn Ala Ser Gly Ala Ala Val Ala Thr  
 385 390 395 400  
 His Leu Asp His Arg Ile Ala Met Ser Phe Leu Val Met Gly Leu Val  
 405 410 415  
 Ser Glu Asn Pro Val Thr Val Asp Asp Ala Thr Met Ile Ala Thr Ser  
 420 425 430  
 Phe Pro Glu Phe Met Asp Leu Met Ala Gly Leu Gly Ala Lys Ile Glu  
 435 440 445  
 Leu Ser Asp Thr Lys Ala Ala  
 450 455

<210>14

<211>448

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来源于莴苣的变体 TIPa EPSPS

<400>14



Lys Pro Ser Thr Ala Pro Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu  
1                      5                      10                      15  
Ile Ser Gly Thr Val Asn Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg  
                    20                      25                      30  
Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn  
                    35                      40                      45  
Leu Leu Asn Ser Asp Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Ala  
                    50                      55                      60  
Leu Gly Leu His Val Glu Glu Asn Gly Ala Leu Lys Arg Ala Ile Val  
65                      70                      75                      80  
Glu Gly Cys Gly Gly Val Phe Pro Val Gly Arg Glu Ser Lys Asp Glu  
                    85                      90                      95  
Ile Gln Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ala Leu Thr  
                    100                      105                      110  
Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Ile Leu Asp Gly  
                    115                      120                      125  
Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Thr Gly Leu  
                    130                      135                      140  
Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro  
145                      150                      155                      160  
Pro Val Arg Val Val Gly Ser Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys  
                    165                      170                      175  
Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Thr Ala Leu Leu Met Ala  
                    180                      185                      190  
Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu  
                    195                      200                      205  
Ile Ser Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Lys Leu Met Glu Arg Phe  
                    210                      215                      220  
Gly Val Ser Val Gln His Ser Asp Thr Trp Asp Arg Phe His Val Gln  
225                      230                      235                      240  
Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Gly Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp  
                    245                      250                      255  
Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly  
                    260                      265                      270  
Thr Ile Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Ser Ser Leu Gln Gly Asp Val  
                    275                      280                      285  
Lys Phe Ala Glu Val Leu Gly Gln Met Gly Ala Gln Val Thr Trp Thr  
                    290                      295                      300  
Glu Asn Ser Val Thr Val Lys Gly Pro Pro Arg Asp Pro Ser Gly Arg

305	310	315	320
Lys His Leu Arg Pro Val Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val			
	325	330	335
Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Tyr Ala Asp Gly Pro Thr Ala			
	340	345	350
Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Ile			
	355	360	365
Ala Ile Cys Thr Glu Leu Arg Lys Leu Gly Ala Thr Val Glu Glu Gly			
	370	375	380
Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala			
385	390	395	400
Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala			
	405	410	415
Ala Cys Ala Asp Val Ala Val Thr Ile Lys Asp Pro Gly Cys Thr Arg			
	420	425	430
Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Glu Val Leu Gln Arg Phe Ala Lys His			
	435	440	445

<210>15

<211>434

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来源于玉米的变体 TIPA EPSPS

<400>15

Ile Lys Glu Ile Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu			
1	5	10	15
Ser Asn Arg Ile Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val			
	20	25	30
Val Asp Asn Leu Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala			
	35	40	45
Leu Arg Thr Leu Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg			
	50	55	60
Ala Val Val Val Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys			
65	70	75	80
Glu Glu Val Gln Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ala			

	85	90	95
Leu Thr Ala Ala Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu			
	100	105	110
Asp Gly Val Pro Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val			
	115	120	125
Gly Leu Lys Gln Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp			
	130	135	140
Cys Pro Pro Val Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys			
145	150	155	160
Val Lys Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu			
	165	170	175
Met Ala Ala Pro Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp			
	180	185	190
Lys Leu Ile Ser Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu			
	195	200	205
Arg Phe Gly Val Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr			
	210	215	220
Ile Lys Gly Gly Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu			
225	230	235	240
Gly Asp Ala Ser Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr			
	245	250	255
Gly Gly Thr Val Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly			
	260	265	270
Asp Val Lys Phe Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr			
	275	280	285
Trp Thr Glu Thr Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe			
	290	295	300
Gly Arg Lys His Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro			
305	310	315	320
Asp Val Ala Met Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro			
	325	330	335
Thr Ala Ile Arg Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg			
	340	345	350
Met Val Ala Ile Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu			
	355	360	365
Glu Gly Pro Asp Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val			
	370	375	380
Thr Ala Ile Asp Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser			
385	390	395	400

Leu Ala Ala Cys Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys  
 405 410 415  
 Thr Arg Lys Thr Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val  
 420 425 430  
 Lys Asn

<210>16

<211>428

<212>PRT

<213> 野油菜黄单胞菌

<400>16

Met Lys Ile Tyr Lys Leu Gln Thr Pro Val Asn Ala Ile Leu Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Ile Ala Ala Asp Lys Ser Ile Ser His Arg Phe Ala Ile Phe Ser Leu  
 20 25 30  
 Leu Thr Gln Glu Glu Asn Lys Ala Gln Asn Tyr Leu Leu Ala Gln Asp  
 35 40 45  
 Thr Leu Asn Thr Leu Glu Ile Ile Lys Asn Leu Gly Ala Lys Ile Glu  
 50 55 60  
 Gln Lys Asp Ser Cys Val Lys Ile Ile Pro Pro Lys Glu Ile Leu Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Cys Ile Leu Asp Cys Gly Asn Ser Gly Thr Ala Met Arg Leu  
 85 90 95  
 Met Ile Gly Phe Leu Ala Gly Ile Ser Gly Phe Phe Val Leu Ser Gly  
 100 105 110  
 Asp Lys Tyr Leu Asn Asn Arg Pro Met Arg Arg Ile Ser Lys Pro Leu  
 115 120 125  
 Thr Gln Ile Gly Ala Arg Ile Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Asn Leu Ala  
 130 135 140  
 Pro Leu Cys Ile Glu Gly Gln Lys Leu Lys Ala Phe Asn Phe Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Glu Ile Ser Ser Ala Gln Val Lys Thr Ala Met Ile Leu Ser Ala Phe  
 165 170 175  
 Arg Ala Asp Asn Val Cys Thr Phe Ser Glu Ile Ser Leu Ser Arg Asn  
 180 185 190  
 His Ser Glu Asn Met Leu Lys Ala Met Lys Ala Pro Ile Arg Val Ser  
 195 200 205

Asn Asp Gly Leu Ser Leu Glu Ile Asn Pro Leu Lys Lys Pro Leu Lys  
 210 215 220  
 Ala Gln Asn Ile Ile Ile Pro Asn Asp Pro Ser Ser Ala Phe Tyr Phe  
 225 230 235 240  
 Val Leu Ala Ala Ile Ile Leu Pro Lys Ser Gln Ile Ile Leu Lys Asn  
 245 250 255  
 Ile Leu Leu Asn Pro Thr Arg Ile Glu Ala Tyr Lys Ile Leu Gln Lys  
 260 265 270  
 Met Gly Ala Lys Leu Glu Met Thr Ile Thr Gln Asn Asp Phe Glu Thr  
 275 280 285  
 Ile Gly Glu Ile Arg Val Glu Ser Ser Lys Leu Asn Gly Ile Glu Val  
 290 295 300  
 Lys Asp Asn Ile Ala Trp Leu Ile Asp Glu Ala Pro Ala Leu Ala Ile  
 305 310 315 320  
 Ala Phe Ala Leu Ala Lys Gly Lys Ser Ser Leu Ile Asn Ala Lys Glu  
 325 330 335  
 Leu Arg Val Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ala Val Met Val Glu Asn Leu  
 340 345 350  
 Lys Leu Cys Gly Val Glu Ala Arg Glu Leu Asp Asp Gly Phe Glu Ile  
 355 360 365  
 Glu Gly Gly Cys Glu Leu Lys Ser Ser Lys Ile Lys Ser Tyr Gly Asp  
 370 375 380  
 His Arg Ile Ala Met Ser Phe Ala Ile Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ile  
 385 390 395 400  
 Glu Ile Asp Asp Ser Asp Cys Ile Lys Thr Ser Phe Pro Asn Phe Ile  
 405 410 415  
 Glu Ile Leu Ser Asn Leu Gly Ala Arg Ile Asp Tyr  
 420 425

<210>17

<211>443

<212>PRT

<213> 新月柄杆菌

<400>17

Met Ser Leu Ala Gly Leu Lys Ser Ala Pro Gly Gly Ala Leu Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Ile Val Arg Ala Pro Gly Asp Lys Ser Ile Ser His Arg Ser Met Ile

20	25	30
Leu Gly Ala Leu Ala Thr Gly Thr Thr Thr Val Glu Gly Leu Leu Glu		
35	40	45
Gly Asp Asp Val Leu Ala Thr Ala Arg Ala Met Gln Ala Phe Gly Ala		
50	55	60
Arg Ile Glu Arg Glu Gly Val Gly Arg Trp Arg Ile Glu Gly Lys Gly		
65	70	75
Gly Phe Glu Glu Pro Val Asp Val Ile Asp Cys Gly Asn Ala Gly Thr		
85	90	95
Gly Val Arg Leu Ile Met Gly Ala Ala Ala Gly Phe Ala Met Cys Ala		
100	105	110
Thr Phe Thr Gly Asp Gln Ser Leu Arg Gly Arg Pro Met Gly Arg Val		
115	120	125
Leu Asp Pro Leu Ala Arg Met Gly Ala Thr Trp Leu Gly Arg Asp Lys		
130	135	140
Gly Arg Leu Pro Leu Thr Leu Lys Gly Gly Asn Leu Arg Gly Leu Asn		
145	150	155
Tyr Thr Leu Pro Met Ala Ser Ala Gln Val Lys Ser Ala Val Leu Leu		
165	170	175
Ala Gly Leu His Ala Glu Gly Gly Val Glu Val Ile Glu Pro Glu Ala		
180	185	190
Thr Arg Asp His Thr Glu Arg Met Leu Arg Ala Phe Gly Ala Glu Val		
195	200	205
Ile Val Glu Asp Arg Lys Ala Gly Asp Lys Thr Phe Arg His Val Arg		
210	215	220
Leu Pro Glu Gly Gln Lys Leu Thr Gly Thr His Val Ala Val Pro Gly		
225	230	235
Asp Pro Ser Ser Ala Ala Phe Pro Leu Val Ala Ala Leu Ile Val Pro		
245	250	255
Gly Ser Glu Val Thr Val Glu Gly Val Met Leu Asn Glu Leu Arg Thr		
260	265	270
Gly Leu Phe Thr Thr Leu Gln Glu Met Gly Ala Asp Leu Val Ile Ser		
275	280	285
Asn Val Arg Val Ala Ser Gly Glu Glu Val Gly Asp Ile Thr Ala Arg		
290	295	300
Tyr Ser Gln Leu Lys Gly Val Val Val Pro Pro Glu Arg Ala Pro Ser		
305	310	315
Met Ile Asp Glu Tyr Pro Ile Leu Ala Val Ala Ala Ala Phe Ala Ser		
325	330	335

Gly Glu Thr Val Met Arg Gly Val Gly Glu Met Arg Val Lys Glu Ser  
 340 345 350  
 Asp Arg Ile Ser Leu Thr Ala Asn Gly Leu Lys Ala Cys Gly Val Gln  
 355 360 365  
 Val Val Glu Glu Pro Glu Gly Phe Ile Val Thr Gly Thr Gly Gln Pro  
 370 375 380  
 Pro Lys Gly Gly Ala Thr Val Val Thr His Gly Asp His Arg Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Met Ser His Leu Ile Leu Gly Met Ala Ala Gln Ala Glu Val Ala Val  
 405 410 415  
 Asp Glu Pro Gly Met Ile Ala Thr Ser Phe Pro Gly Phe Ala Asp Leu  
 420 425 430  
 Met Arg Gly Leu Gly Ala Thr Leu Ala Glu Ala  
 435 440

<210>18

<211>441

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (441)

<400>18

atg ata gag gtg aaa ccg att aac gca gag gat acc tat gaa cta agg 48  
 Met Ile Glu Val Lys Pro Ile Asn Ala Glu Asp Thr Tyr Glu Leu Arg  
 1 5 10 15  
 cat aga ata ctc aga cca aac cag ccg ata gaa gcg tgt atg ttt gaa 96  
 His Arg Ile Leu Arg Pro Asn Gln Pro Ile Glu Ala Cys Met Phe Glu  
 20 25 30  
 agc gat tta ctt cgt ggt gca ttt cac tta ggc ggc ttt tac agg ggc 144  
 Ser Asp Leu Leu Arg Gly Ala Phe His Leu Gly Gly Phe Tyr Arg Gly  
 35 40 45  
 aaa ctg att tcc ata gct tca ttc cac cag gcc gag cac tcg gaa ctc 192  
 Lys Leu Ile Ser Ile Ala Ser Phe His Gln Ala Glu His Ser Glu Leu

50	55	60	
caa ggc cag aaa cag tac cag etc cga ggt atg gct acc ttg gaa ggt			240
Gln Gly Gln Lys Gln Tyr Gln Leu Arg Gly Met Ala Thr Leu Glu Gly			
65	70	75	80
tat cgt gag cag aaa gcg gga tca act cta gtt aaa cac gct gaa gaa			288
Tyr Arg Glu Gln Lys Ala Gly Ser Thr Leu Val Lys His Ala Glu Glu			
	85	90	95
atc ctt cgt aag agg ggg gcg gac atg ctt tgg tgt aat gcg agg aca			336
Ile Leu Arg Lys Arg Gly Ala Asp Met Leu Trp Cys Asn Ala Arg Thr			
	100	105	110
tcc gcc tca ggc tac tac aaa aag tta ggc ttc agc gag cag gga gag			384
Ser Ala Ser Gly Tyr Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ser Glu Gln Gly Glu			
	115	120	125
ata ttt gac acg ccg cca gta gga cct cac atc ctg atg tat aaa agg			432
Ile Phe Asp Thr Pro Pro Val Gly Pro His Ile Leu Met Tyr Lys Arg			
	130	135	140
atc aca taa			441
Ile Thr			
145			

<210>19

<211>146

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400>19

Met Ile Glu Val Lys Pro Ile Asn Ala Glu Asp Thr Tyr Glu Leu Arg			
1	5	10	15
His Arg Ile Leu Arg Pro Asn Gln Pro Ile Glu Ala Cys Met Phe Glu			
	20	25	30
Ser Asp Leu Leu Arg Gly Ala Phe His Leu Gly Gly Phe Tyr Arg Gly			
	35	40	45
Lys Leu Ile Ser Ile Ala Ser Phe His Gln Ala Glu His Ser Glu Leu			
	50	55	60
Gln Gly Gln Lys Gln Tyr Gln Leu Arg Gly Met Ala Thr Leu Glu Gly			
65	70	75	80



Tyr Arg Glu Gln Lys Ala Gly Ser Thr Leu Val Lys His Ala Glu Glu  
85 90 95  
Ile Leu Arg Lys Arg Gly Ala Asp Met Leu Trp Cys Asn Ala Arg Thr  
100 105 110  
Ser Ala Ser Gly Tyr Tyr Lys Lys Leu Gly Phe Ser Glu Gln Gly Glu  
115 120 125  
Ile Phe Asp Thr Pro Pro Val Gly Pro His Ile Leu Met Tyr Lys Arg  
130 135 140  
Ile Thr  
145

<210>20

<211>433

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 基于 PCISV 启动子序列

<400>20

agatcttgag ccaatcaaag aggagtgatg tagacctaaa gcaataatgg agccatgacg 60  
taagggctta cgccatacag aaataattaa aggctgatgt gacctgtcgg tctctcagaa 120  
cctttacttt ttatgtttgg cgtgtatfff taaatttcca cggcaatgac gatgtgaccc 180  
aacgagatct tgagccaatc aaagaggagt gatgtagacc taaagcaata atggagccat 240  
gacgtaaggg cttacgcca tacgaaataa ttaaaggctg atgtgacctg tcggctcttc 300  
agaaccttta ctttttatat ttggcgtgta tttttaaatt tccacggcaa tgacgatgtg 360  
acctgtgcat ccgctttgcc tataaataag ttttagtttg tattgatcga cacggtcgag 420  
aagacacggc cat 433

<210>21

<211>57

<212>PRT

<213> 豌豆

<400>21

Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala  
1 5 10 15  
Ser Arg Gly Gln Ser Ala Ala Met Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser  
20 25 30

Met Thr Gly Phe Pro Val Arg Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile  
 35 40 45  
 Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys  
 50 55

<210>22

<211>85

<212>PRT

<213> 拟南芥

<400>22

Met Ala Ser Ser Met Leu Ser Ser Ala Thr Met Val Ala Ser Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala  
 20 25 30  
 Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Asn Asp Ile Thr Ser Ile Thr Ser  
 35 40 45  
 Asn Gly Gly Arg Val Asn Cys Met Gln Val Trp Pro Pro Ile Glu Lys  
 50 55 60  
 Lys Lys Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Asp Leu Thr Asp Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Val Asn Cys  
 85

<210>23

<211>76

<212>PRT

<213> 拟南芥

<400>23

Met Ala Gln Val Ser Arg Ile Cys Asn Gly Val Gln Asn Pro Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Ser Gln Arg Lys Ser Pro Leu Ser Val  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Thr Gln Gln His Pro Arg Ala Tyr Pro Ile Ser Ser Ser  
 35 40 45  
 Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Met Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Arg  
 50 55 60  
 Pro Leu Lys Val Met Ser Ser Val Ser Thr Ala Cys

65

70

75

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt;76

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 拟南芥

&lt;400&gt;24

Met Ala Gln Val Ser Arg Ile Cys Asn Gly Val Gln Asn Pro Ser Leu

1                   5                   10                   15

Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Ser Gln Arg Lys Ser Pro Leu Ser Val

20                   25                   30

Ser Leu Lys Thr Gln Gln His Pro Arg Ala Tyr Pro Ile Ser Ser Ser

35                   40                   45

Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Met Thr Leu Ile Gly Ser Glu Leu Arg

50                   55                   60

Pro Leu Lys Val Met Ser Ser Val Ser Thr Ala Cys

65                   70                   75

&lt;210&gt;25

&lt;211&gt;72

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; 牵牛花

&lt;400&gt;25

Met Ala Gln Ile Asn Asn Met Ala Gln Gly Ile Gln Thr Leu Asn Pro

1                   5                   10                   15

Asn Ser Asn Phe His Lys Pro Gln Val Pro Lys Ser Ser Ser Phe Leu

20                   25                   30

Val Phe Gly Ser Lys Lys Leu Lys Asn Ser Ala Asn Ser Met Leu Val

35                   40                   45

Leu Lys Lys Asp Ser Ile Phe Met Gln Lys Phe Cys Ser Phe Arg Ile

50                   55                   60

Ser Ala Ser Val Ala Thr Ala Cys

65                   70

&lt;210&gt;26

&lt;211&gt;69

&lt;212&gt;PRT

<213> 小麦

<400>26

Met Ala Ala Leu Val Thr Ser Gln Leu Ala Thr Ser Gly Thr Val Leu  
 1                  5                  10                  15  
 Ser Val Thr Asp Arg Phe Arg Arg Pro Gly Phe Gln Gly Leu Arg Pro  
                  20                  25                  30  
 Arg Asn Pro Ala Asp Ala Ala Leu Gly Met Arg Thr Val Gly Ala Ser  
                  35                  40                  45  
 Ala Ala Pro Lys Gln Ser Arg Lys Pro His Arg Phe Asp Arg Arg Cys  
                  50                  55                  60  
 Leu Ser Met Val Val  
 65

<210>27

<211>171

<212>DNA

<213> 豌豆

<400>27

atggcttcta tgatatectc ttcgctgtg acaacagtca gccgtgcctc tagggggcaa 60  
 tccgccgcaa tggctccatt cggcggcctc aatccatga ctggattccc agtgaggaag 120  
 gtcaacactg acattacttc cattacaagc aatggtggaa gagtaaagtg c 171

<210>28

<211>255

<212>DNA

<213> 拟南芥

<400>28

atggcttctt ctatgctctc ttcgctact atggttgcct ctccggctca ggccactatg 60  
 gtcgctcctt tcaacggact taagtcctcc gctgccttcc cagccacccg caaggetaac 120  
 aacgacatta cttccatcac aagcaacggc ggaagagtta actgtatgca ggtgtggcct 180  
 ccgattgaaa agaagaagtt tgagactctc tcttaccttc ctgaccttac cgattccgggt 240  
 ggtcgcgtca actgc 255

<210>29

<211>228

<212>DNA

<213> 拟南芥

<400>29

atggcgcaag ttagcagaat ctgcaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc	60
tcgaaatcca gtcaacgcaa atctccetta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca	120
cgagcttate cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaattggc	180
tctgagcttc gtcctcttaa ggteatgtct tctgtttcca cggcgtgc	228

<210>30

<211>228

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物

<400>30

atggcgcaag ttagcagaat ctgcaatggt gtgcagaacc catctcttat ctccaatctc	60
tcgaaatcca gtcaacgcaa atctccetta tcggtttctc tgaagacgca gcagcatcca	120
cgagcttate cgatttcgtc gtcgtgggga ttgaagaaga gtgggatgac gttaattggc	180
tctgagcttc gtcctcttaa ggteatgtct tctgtttcca cggcgtgc	228

<210>31

<211>216

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物

<400>31

atggcccaga tcaacaacat ggcccagggc atccagaccc tgaaccctaa ctctaacttc	60
cacaagccgc aagtgcccaa gtctagctcc ttctctgtgt tcggctccaa gaagctcaag	120
aatagcgcca attccatgct ggctctgaag aaagactcga tcttcatgca gaagtctctgc	180
tcctttcgca tcagtgttc ggttgcgact gcctgc	216

<210>32

<211>207

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工引物

<400>32

atggcggcac	tggtgacctc	ccagctcgcg	acaagcggca	ccgtcctgtc	ggtgacggac	60
cgcttcggc	gtcccggctt	ccagggactg	aggccacgga	accagccga	tgccgtctc	120
gggatgagga	cggtgggcgc	gtccgcggt	ccaagcaga	gcaggaagcc	acaccgttc	180
gaccgccggt	gcttgagcat	ggtcgtc				207