

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/82

A01H 5/00 A01H 5/10

//C12N15/53

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 99804930.1

[43] 公开日 2001 年 5 月 23 日

[11] 公开号 CN 1296526A

[22] 申请日 1999.4.7 [21] 申请号 99804930.1

[30] 优先权

[32] 1998.4.9 [33] GB [31] 9807818.1

[86] 国际申请 PCT/GB99/01059 1999.4.7

[87] 国际公布 WO99/53081 英 1999.10.21

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.9

[71] 申请人 曾尼卡有限公司

地址 英国英格兰伦敦

[72] 发明人 C·A·施普顿

I·B·布赖安

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 钟守期

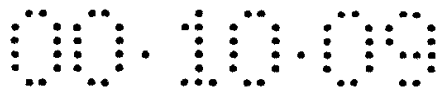
权利要求书 3 页 说明书 12 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 生产耐受或抗除草剂的植物的方法

[57] 摘要

一种生产抗或耐受可体外抑制 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶(4HPPD)的除草剂的植物的方法,该方法包括下列步骤:(i)用一种包括编码八氢番茄红素去饱和酶的多核苷酸来转化植物材料;(ii)将由此转化的材料再生成形态正常的植物。在一个优选的实施方案中,由所述多核苷酸包含的区是 SEQ ID No. 1 所描述的序列或是与在 55℃—60℃ 的温度下和含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水中培养、随后在相同温度下用含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水冲洗时仍然与 SEQ ID No. 1 所描述的序列杂交的一种序列互补的序列。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种生产抗或耐受可体外抑制 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶 (4HPPD) 的除草剂的植物的方法, 该方法包括下列步骤:

5 (i) 用一种包括编码八氢番茄红素去饱和酶 (PDS) 的区的多核苷酸来转化植物材料;

(ii) 将由此转化的材料再生成形态正常的植物, 并从可抗或耐受体外抑制 4HPPD 的除草剂的那些再生植物群体中进行选择。

2. 一种根据权利要求 1 所述的方法, 其中由所述多核苷酸包含的区是 SEQ ID No. 1 所描述的序列或是与在 55°C - 60°C 的温度下和含有 0.1% SDS 的强度为 0.3X 的柠檬酸缓冲盐水中温孵、随后在相同温度下用含有 0.1% SDS 的强度为 0.3X 的柠檬酸缓冲盐水冲洗时仍然与 SEQ ID No. 1 所描述的序列杂交的一种序列互补的序列。

3. 一种根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述的八氢番茄红素去饱和酶来源于植物。

15 4. 一种根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述的八氢番茄红素去饱和酶来源于细菌。

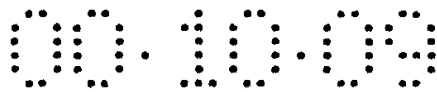
5. 一种根据权利要求 4 所述的方法, 其中所述的八氢番茄红素去饱和酶是从噬夏孢欧文氏杆菌中分离的。

20 6. 一种根据权利要求 1-5 中任意一项所述的方法, 其中所述的多核苷酸进一步包括一种选择标记基因。

7. 一种根据权利要求 6 所述的方法, 其中所述的选择标记基因选自下列物质组成的组: 赋予抗生素抗性的标记基因、赋予除草剂抗性的标记基因、赋予毒素抗性的标记基因、营养标记、视觉标记和在基于激素的选择系统中所用的标记基因。

25 8. 一种根据权利要求 1-7 中任意一项所述的方法, 其中已经或进一步用下列多核苷酸将所述的植物物质进行了转化: 包括编码能够产生具有抗或耐受除草剂、昆虫、脱水和/或真菌、细菌或病毒感染的蛋白质的区的多核苷酸; 能够编码可产生改进质量的性状诸如提高的产量、改变的淀粉质量和/或提高的营养含量的蛋白质的多核苷酸。

30 9. 一种根据权利要求 1-8 中任意一项所述的方法, 其中所述多核苷酸内所述蛋白质的编码序列两侧是植物可操作启动子和终止



子。

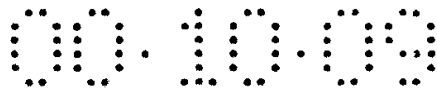
10. 一种根据权利要求 8 或 9 中之一所述的方法，其中所述的能够产生除草剂抗性的蛋白质选自下列物质组成的组：草甘膦氧化-还原酶 (GOX)、5-烯醇-丙酮基-3-磷酸莽草酸合成酶 (EPSPS)、磷丝菌素乙酰转移酶 (PAT)、羟苯基丙酮酸双加氧酶 (HPPD)、谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)、细胞色素 P450、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACCase)、乙酰乳酸合酶 (ALS)、原叶啉原氧化酶 (PROTOX)、二氢蝶酸合酶、多胺转运蛋白、超氧化物歧化酶 (SOD)、溴草腈腈水解酶、获自真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*) 的 *tfdA* 基因的产物、法尼基焦磷酸合酶和所述蛋白质的已知诱变的或其它修饰的变体。

11. 一种根据权利要求 1-10 中任意一项所述的方法，其中所述多核苷酸的蛋白质编码序列包括 5' 区，该区可编码：(i) 能够将该区翻译产物定向至质粒诸如叶绿体、线粒体、其它细胞器或植物细胞壁的肽；和/或 (ii) 非翻译的翻译增强序列。

12. 一种根据权利要求 1-11 中任意一项所述的方法，其中对用于转化所述材料的所述多核苷酸进行修饰，因而除去 mRNA 不稳定性编码基元和/或不规则剪接区；或使用植物优选的密码子以便由此修饰的多核苷酸在植物中的表达产生基本上类似的蛋白质，该蛋白质具有基本上与通过表达编码未修饰多核苷酸区的蛋白质是内源性的生物体中未修饰的多核苷酸而获得的活性/功能类似的活性/功能，条件是如果 - 就除草剂抗性授予区而言 - 由此修饰的多核苷酸包括植物优选的密码子，那么编码所述修饰的多核苷酸内区的蛋白质与编码所述植物内内源性包含的区和基本上编码相同蛋白质的类似的蛋白质之间的同一性程度低于约 70%。

13. 一种根据权利要求 1-12 中任意一项所述的方法，其中抑制 4-HPPD 的除草剂选自下列物质组成的组：isoxaflutole；二酮腈类诸如 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-苯基)丙烷-1,3-二酮和 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂苯基)丙烷-1,3-二酮；三酮类诸如磺草酮和 mesotrione (BSI-申请的)、pyrazolynate 和 苄草啞。

14. 一种根据权利要求 1-13 中任意一项所述的方法，其中将所述的除草剂在发芽后施用。



15. 一种获自权利要求 1-14 中任意一项方法的形态正常的可育（或雄性不育）的完整植物、这类植物的子代、这类植物和子代的种子以及这类植物和子代的部分。

5 16. 一种根据权利要求 15 的植物，它选自香蕉、棉花、玉米、番茄、藤本植物组成的组。

17. 包括编码八氢番茄红素去饱和酶的区的多核苷酸在生产抗或耐受体外抑制酶 4-HPPD 的除草剂的植物材料的用途。

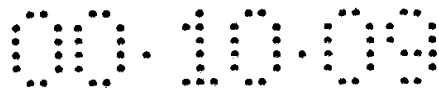
10 18. 一种选择性控制大田中杂草的方法，所述的大田中包括杂草和农作物植物，该方法包括给所述大田施用体外能够抑制酶 4-HPPD 的除草剂的步骤，其特征在于已经用包括可编码八氢番茄红素去饱和酶的序列的多核苷酸编码区将所述植物进行了转化并表达了包括可编码八氢番茄红素去饱和酶的序列的多核苷酸编码区。

19. 一种根据权利要求 18 所述的方法，其中所述的多核苷酸是在权利要求 2-12 中任意一项所述的多核苷酸。

15 20. 一种根据权利要求 18 或 19 中之一所述的方法，其中所述的除草剂选自下列物质组成的组：isoxaflutole；二酮腈类诸如 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-苯基)丙烷-1,3-二酮和 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂苯基)丙烷-1,3-二酮；三酮类诸如磺草酮、和 mesotrione (BSI-申请的)、pyrazolynate 和 苜草啞。

20 21. 一种根据权利要求 18-20 中任意一项所述的方法，其中在给所述大田施用除草剂之前或之后，用一种杀虫剂处理所述的大田，所述的杀虫剂选自下列物质组成的组：杀真菌剂、杀昆虫剂和杀线虫剂。

25



说明书

生产耐受或抗除草剂的植物的方法

5 本发明涉及一种生产耐受或抗除草剂的植物的方法，尤其涉及与非转基因的类似植物比较时表现出基本上抗或基本上耐受除草剂的转基因植物的生产。

10 当给基本上“耐受”除草剂的植物施用除草剂时，它们可产生一种与由类似进行的非耐受性类似植物产生的剂量/反应曲线相比时向右偏移的剂量/反应曲线。这类剂量/反应曲线具有绘制在 x 轴上的“剂量”和绘制在 y 轴上的“杀死百分比”、“除草作用”等。耐受性植物需要的除草剂多于非耐受性类似植物以便产生特定的除草作用。当以一般由农用化学品协会使用的浓度和比例给植物施用除草剂以杀死土壤中的杂草时，基本上“抗”除草剂的植物很少（如果有的话）表现出坏死、裂解、萎黄病或其它病变。抗除草剂的植物也耐受除草剂。将术语“抗”和“耐受”在本申请的上下文中解释为“耐受和/或抗”。

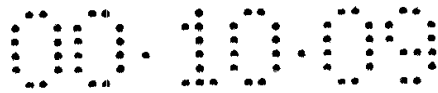
20 特别与本发明相关的除草剂是那些能够在体外抑制 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶（HPPD 或 4HPPD）的酶类的物质。这类除草剂已经被公开：诸如在法国专利申请 9506800 和 95 13570 中特别描述的异噁唑类，且特别是 isoxaflutole（一种选择性的玉米除草剂）；二酮腈类诸如那些在欧洲专利申请 0496 630、0496 631 中所述的物质、特别是 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-苯基)丙烷-1,3-二酮和 2-氟基-3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2,3Cl₂苯基)丙烷-1,3-二酮；在欧洲专利申请 0 625 505 和 0625 508 中所述的三酮类、特别是磺草酮、mesotrione（BSI-申请的）、pyrazolynate 和 苜草唑。能够提供耐受这些除草剂的公知基因是那些编码 HPPD 酶类的基因。

25 本发明提供了生产抗或耐受体外抑制 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶（4HPPD）的除草剂的植物的方法，该方法包括下列步骤：

30 (i) 用一种包括编码八氢番茄红素去饱和酶（PDS）的区的多核苷酸来转化植物材料；

(ii) 将由此转化的材料再生成形态正常的植物。

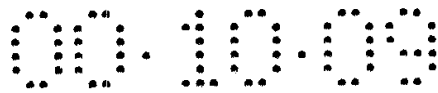
由所述多核苷酸包含的区可以具有 SEQ ID No. 1 所描述的序列



或可以是与在 55°C - 60°C 的温度下和含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水中培养、随后在相同温度下用含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水冲洗时仍然与 SEQ ID No. 1 所描述的序列杂交的一种序列互补的序列。优选八氢番茄红素去饱和酶来源于细菌，如 SEQ ID No. 1 所述，并来源于噬夏孢欧文氏杆菌和/或特别是不需质体醌 9 作为辅因子的一种细菌。然而，该去饱和酶可以来源于植物，诸如特别是单子叶植物或双子叶植物、特别是拟南芥属或伞形科植物，例如胡萝卜。它可以是天然的或可能是突变的，同时基本上保持对 HPPD 抑制剂诸如异噁唑类除草剂诸如 Balance™ 除草剂或三酮类的耐除草剂的特性。由上述方法生产的除草剂抗性植物可以通过其对体外抑制 4HPPD 的除草剂的抗性来选择。然而，可以进一步优选的情况是编码八氢番茄红素去饱和酶的多核苷酸进一步包括有利于选择再生转化体 (transformants) 的选择标记基因。合适的选择标记基因包括诸如卡那霉素、潮霉素和庆大霉素这样的抗生素抗性基因；诸如含草甘膦除草剂这样的另外的除草剂抗性基因；诸如 eutypine 这样的毒素抗性基因。其它的选择形式也是可使用的，诸如以激素为基础的选择系统诸如 Hiroyrasu Ebinuma 等在 1997 PNAS 第 94 卷 2117-2121 页中所述的 Multi Auto Transformation (MAT) 系统；使用公知绿色荧光蛋白质、 β -葡糖醛酸糖苷酶 (glucoronidase)、甘露糖异构酶、木糖异构酶和 2-DOG 的目视选择系统。

可以 (或已经可以) 进一步用下列多核苷酸对所述的植物材料进行转化：包括编码能够产生具有抗或耐受除草剂、昆虫、脱水和/或真菌、细菌或病毒感染的蛋白质的区的多核苷酸；能够编码可产生改进质量的性状诸如提高的产量、改变的淀粉质量和/或提高的营养含量的蛋白质的多核苷酸。

多核苷酸内的蛋白质编码序列两侧是植物可操作的启动子和终止子。这类启动子和终止子本身与本发明没有密切关系，对于本领域技术人员来说是众所周知的，且包括例如 CaMV35S、FMV35S、NOS、OCS 和 E9 (来源于 RUBISCO 的小亚基) 启动子和终止子或 α -微管蛋白基因的启动子和终止子 (EP-A 652, 286)。优选的情况是，以有利于诸如 (例如) 包括至少一种诸如 EP-A-507, 698 中所述的组蛋白启动子的编码序列超表达的启动子调节序列为基础。



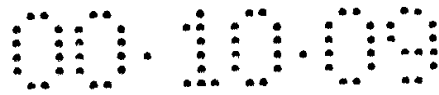
根据本发明，同样能够使用与启动子调节序列相关的位于启动子和编码序列之间的其它调节序列，诸如转录或翻译增强子，诸如（例如）国际专利申请（引入本文作为参考的 PCT 公开号 W087/07644）中所述的烟草蚀刻病毒（TEV）翻译激活剂；或转运肽类（单或双）
5 且在这种情况下它可能由中间体序列分离、即它在转录方向上包括编码可编码质粒定位酶的植物基因转运肽的序列、编码质粒定位酶的 N-末端成熟部分植物基因的部分序列、然后是编码可编码质粒定位酶的植物基因的第二种转运肽的序列，它由可编码质粒定位酶的植物基因的 N-末端成熟部分的部分序列形成，诸如 EP-A-508, 909 中所述。

10 可以已经或可以随后 - 进一步用下列多核苷酸对所述的植物材料进行转化：包括可编码能够产生具有抗或耐受除草剂、昆虫、脱水和/或真菌、细菌或病毒感染的蛋白质的区的多核苷酸；能够编码可产生改进质量的性状诸如提高的产率、改变的淀粉质量和/或提高的营养含量的蛋白质的多核苷酸。

15 能够产生除草剂抗性的蛋白质选自下列物质组成的组：草甘膦氧化-还原酶（GOX）、5-烯醇-丙酮基-3-磷酸莽草酸合成酶（EPSPS）、膦丝菌素乙酰转移酶（PAT）、羟苯基丙酮酸双加氧酶（HPPD）、谷胱甘肽 S-转移酶（GST）、细胞色素 P450、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACCase）、乙酰乳酸合酶（ALS）、原卟啉原氧化酶（PROTOX）、二氢蝶酸合酶、
20 多胺转运蛋白、超氧化物歧化酶（SOD）、溴草腈腈水解酶、获自真养产碱杆菌的 *tfdA* 基因的产物、和所述蛋白质的已知诱变的其它修饰的变体。

如上所述，可以转化所述植物材料的多核苷酸可以包括 5' 蛋白质编码区，该区编码：（i）能够将该区翻译产物定向至质粒诸如叶绿体、线粒体、其它细胞器或植物细胞壁的肽；和/或（ii）非翻译翻译增强序列。
25

一旦将所述的多核苷酸引入植物材料就可以使所述的多核苷酸密码子最佳化、或将其改变以至少促进转录。由此将用于转化所述材料的所述多核苷酸进行修饰即可以除去 mRNA 不稳定性编码基元和/或不规则剪接区；或可以使用植物优选的密码子，以便在植物中由此修饰的多核苷酸的表达产生基本上类似的蛋白质，该蛋白质具有基本上与通过表达编码未修饰多核苷酸区的蛋白质是内源性的生物体中未
30



修饰的多核苷酸而获得的活性/功能类似的活性/功能，条件是如果—
就除草剂抗性授予区而言—由此修饰的多核苷酸包括植物优选的密
码子，那么编码所述修饰的多核苷酸内区的蛋白质与编码所述植物内
内源性包含的区和基本上编码相同蛋白质的类似的蛋白质之间的同
5 一性程度低于约 70%。

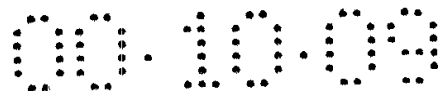
转化技术是众所周知的，且包括粒子介导的生物分解
(biolistic) 转化、土壤杆菌属介导的转化、原生质体转化（任意
在有聚乙二醇存在的情况下）；在含有所述多核苷酸或载体的培养基
中对植物组织、细胞或原生质体进行超声处理；将所述多核苷酸或载
10 体显微插入全能植物材料（任意使用公知的碳化硅“针状单晶”技
术）、电穿孔等。

本发明进一步提供了从上一段落最后部分中所述的材料再生的
形态正常的可育（或雄性不育）的完整植物和这类植物的子代、这类
植物和子代的种子以及这类植物和子代的部分。经转化的本发明植物
15 包括小谷类、含油种子作物、纤维植物、果实、蔬菜、栽培作物和树。
特别优选的这类植物包括大豆、棉花、烟草、甜菜、油菜、canola、
亚麻、向日葵、马铃薯、番茄、苜蓿、莴苣、玉米、小麦、高粱、黑
麦、香蕉、大麦、燕麦、草坪草、牧草、甘蔗、豌豆、蚕豆、稻、松、
杨、苹果、葡萄、柑桔和坚果类植物。

本发明的转化植物对某些除草剂具有耐受性或抗性，所述的除草
20 剂诸如在法国专利申请 9506800 和 95 13570 中特别描述的异噁唑类，
且特别是 4-[4-CF₃-2-(甲磺酰基)苯甲酰基]-5-环丙基异噁唑、且尤
其是 isoxaflutole（一种选择性的玉米除草剂）；二酮腈类诸如那
些在 EP-A-496, 630 和 EP-A-496, 631 中所述的物质、特别是 2-氟基
25 -3-环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-CF₃-苯基)丙烷-1, 3-二酮和 2-氟基-3-
环丙基-1-(2-SO₂CH₃-4-2, 3Cl₂-苯基)丙烷-1, 3-二酮；以及在 EP-
A- 625, 505 和 EP-A-625, 508 中所述的三酮类、特别是磺草酮、
mesotrione（BSI-申请的）、pyrazolynate 和苄草唑。

本发明进一步包括从本发明方法中得到的形态正常的可育（或雄
30 性不育）的完整植物、这类植物的子代、这类植物和子代的种子以及
这类植物和子代的部分。

本发明进一步提供了包括编码八氢番茄红素去饱和酶的多



核苷酸在生产抗或耐受可体外抑制酶 4-HPPD 的除草剂的植物材料中的用途。

5 本发明进一步提供了一种在大田中选择性控制杂草的方法，所述的大田中包括杂草和农作物植物，该方法包括给所述大田施用体外能够抑制酶 4-HPPD 的除草剂的步骤，其特征在于已经用包括编码八氢番茄红素去饱和酶的序列的多核苷酸编码区对所述植物进行了转化并表达了包括编码八氢番茄红素去饱和酶的序列的多核苷酸编码区。

10 特别优选的情况是八氢番茄红素去饱和酶编码序列是 SEQ ID No. 1 所描述的序列或是与在 55°C - 60°C 的温度下和含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水中温孵、随后在相同温度下用含有 0.1% SDS 的强度为 0.3 的柠檬酸缓冲盐水冲洗时仍然与 SEQ ID No. 1 所描述的序列杂交的一种序列互补的序列。所述的除草剂可以选自下列物质组成的组：mesotrione (BSI-申请的)、pyrazolynate 和苜草唑、Balance™、磺草酮等。在给所述大田施用除草剂之前或之后可以用一种杀虫剂处理所述的大田，所述的杀虫剂选自下列物质组成的组：杀真菌剂、杀昆虫剂和杀线虫剂。

现在通过下列非限定性实施例、附图和序列列表来描述本发明，其中：

20 SEQ ID No. 1 是分离自噬夏孢欧文氏杆菌 (*Erwinia aedovora*) 的八氢番茄红素去饱和酶 (脱氢酶) 基因的序列。本领域技术人员会认识到可以将任何八氢番茄红素去饱和酶用于生产对上述除草剂具有抗性/耐受性的植物。

SEQ ID No. 2 是由 SEQ ID No. 1 编码的蛋白质。

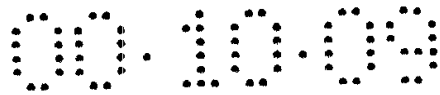
25 SEQ ID No. 3 是编码豌豆核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基转运肽的多核苷酸序列。

SEQ ID No. 4 是由 SEQ ID No. 3 编码的氨基酸序列。

30 图 1 是携带噬夏孢欧文氏杆菌 *crtI* 基因的质粒 pYPEIT4 的结构，所述的基因带有豌豆核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基的转运肽序列 (描述为 TP)。

实施例

耐受能够在体外抑制酶 4-HPPD 的除草剂的植物的生产



从噬夏孢欧文氏杆菌(一种非绿色致植物腐烂的细菌)中克隆 PDS 基因(*crtI*), 并使用含有 CaMV35S 启动子和叶绿体转运肽(*pYPEIT4*) 的质粒将其在转基因烟草和番茄中进行超表达(Misawa 等, 1993)。获得超表达 *crtI* 基因的纯合番茄品系, 和含有相同构建体的烟草植物。

携带 *tp-crtI* 基因的质粒 *pYPEIT4* 的构建

使用标准方法实施重组 DNA 技术。以 204 bp 的 *HindIII-SphI* 片段形式从质粒 *pSNIF83* (Schreier 等, 1985) 中分离编码豌豆的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶)小亚基前体中的转运肽(*TP*)的 DNA 序列, 其 *SphI* 位点含有 *tp* 加工位点。用 *BamHI* 和 *HindIII* 消化携带噬夏孢欧文氏杆菌完整八氢番茄红素去饱和酶基因(*crtI*)的质粒 *pCRT-1* (Fraser 等(1992)《生物化学杂志》(J. Bio. Chem.) 267 19891-19895), 并分离携带截短的 *crtI* 基因的 1.57 kb 的 *HindIII-SphI* *TP* 片段。将上述 204 bp 的 *HindIII-SphI* *TP* 片段与携带从含有 *crtI* 起始密码子的 *SphI* 位点的粘端至 *BamHI* 位点的粘端的读框的 76 bp 的合成片段连接, 并与 1.57 kb 的 *BamHI-HindIII* 片段连接。分离携带 *tp-crtI* 嵌合基因的所需 1.84 kb 的 *HindIII* 片段, 用克列诺酶补平, 并连入从二元载体 *bB/121* (商购自 Clontech laboratories) 中除去 β -葡糖醛酸糖苷酶基因的 10.9 kb 片段的 *SmaI-SacI* 位点。由此生成所需的质粒 *pYPEIT4*, 正如附图 1 中所示。在转运肽和完整 *CrtI* 的起始密码子下划线。这种携带 *tp-crtI* 基因的 *HindIII* 片段被二元载体 *pB1121* 中的 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子包围, 以便在转基因烟草和番茄植物的组织中产生充分的表达。作为对照, 构建携带完整 *crtI* 基因而没有被的 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子包围的 *tp* 的质粒 *pBICAR4*。通过公知技术将质粒 *pYPEIT4* 引入烟草和番茄材料, 然后再通过公知技术将所述材料再生成完整植物。

用 *crtI* 基因转化的番茄植物对 mesotrione 和 isoxaflutole 的耐受性

将来源于‘野生型’(即未转化的)番茄植物 *cv. Ailsa Craig* 的纯合种子和用来自噬夏孢欧文氏杆菌的 *crtI* 基因转化的植物(参见上文)播种在 3 英寸罐内以泥炭为主的堆肥中, 并转入温室。在 3

叶期，用 mesotrione 或 isoxaflutole (Balance™ Herbicide) 进行出苗后重复处理 4 次之前到之后，使植物在 20/16 度的日/夜温度下和 16 小时的光照期中生长约 4 周。将化合物悬浮在水中并通过轨道喷雾器按每公顷 200 升的喷洒体积，以每公顷 1 - 500 克活性组分 (g a. i./ha) 的比例施用，正如表 1 中所示。

使所述植物进一步生长 25 天，然后与未处理的‘对照’植物相比，对除草剂的破坏情况进行目视评估。所观察到的典型植物毒性症状是严重的退绿症/漂白和叶坏死以及新的生长。将来自该试验的结果列在表 1 中，其中‘%破坏/植物毒性’评分代表来自 4 次重复处理中每一次的目视评估结果的平均值。

表 1

化合物	比例 (g a. i./ha)	%破坏/植物毒性 (处理后 25 天)	
		野生型 (未转化的)	转化的 (crtI)
mesotrione	1	25	0
	3	29	0
	11	50	9
	33	81	49
isoxaflutole (Balance™)	1	11	2
	5	15	4
	15	19	6
	50	21	8
	150	34	19
	500	65	31

正如可以观察到的，用表达来自噬夏孢欧文氏杆菌的细菌 PDS 的 crtI 基因转化的植物表现出高于野生型未转化番茄的对 mesotrione 和 isoxaflutole 的耐受性。例如，11 g a. i./ha 的 mesotrione 可对野生型番茄产生 50% 的植物毒性，而在转化的植物中仅观察到 9% 的损伤。类似地，野生型植物受到 500 g a. i./ha isoxaflutole 的破坏程度明显高于那些含有 crtI 基因的植物。

本领域技术人员会认识到本发明并不限于上述技术内容。例如，可以用编码 PDS 酶的基因转化非番茄和烟草的植物，无论所述基因是来源于细菌还是其它来源。

序列表

<110> ZENECA LIMITED

<120> 生产耐受或抗除草剂的植物的方法

<130> PPD50336WO

<140>

<141>

<150> 9807818.1

<151> 1998-04-09

<160> 4

<170> PatentIn2.0版

<210> 1

<211> 1493

<212> DNA

<213> 噬夏孢欧文氏杆菌

<220>

<221> CDS

<222> (15)..(1493)

<400> 1

```

taaagagcga ctac atg aaa cca act acg gta att ggt gca ggc ttc ggt 50
                Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly
                1                               5                10

ggc ctg gca ctg gca att cgt cta caa gct gcg ggg atc ccc gtc tta 98
Gly Leu Ala Leu Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu
                15                               20                25

ctg ctt gaa caa cgt gat aaa ccc ggc ggt cgg gct tat gtc tac gag 146
Leu Leu Glu Gln Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu
                30                               35                40

gat cag ggg ttt acc ttt gat gca ggc ccg acg gtt atc acc gat ccc 194
Asp Gln Gly Phe Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro
                45                               50                55                60

agt gcc att gaa gaa ctg ttt gca ctg gca gga aaa cag tta aaa gag 242
Ser Ala Ile Glu Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu
                65                               70                75

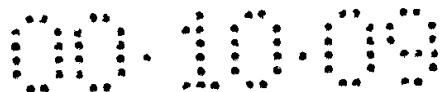
tat gtc gaa ctg ctg ccg gtt acg ccg ttt tac cgc ctg tgt tgg gag 290
Tyr Val Glu Leu Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu
                80                               85                90

tca ggg aag gtc ttt aat tac gat aac gat caa acc cgg ctc gaa gcg 338
Ser Gly Lys Val Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala
                95                               100                105

cag att cag cag ttt aat ccc cgc gat gtc gaa ggt tat cgt cag ttt 386
Gln Ile Gln Gln Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe
                110                               115                120

ctg gac tat tca cgc gcg gtg ttt aaa gaa ggc tat cta aag ctc ggt 434
Leu Asp Tyr Ser Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly
                125                               130                135                140

```



act gtc cct ttt tta tcg ttc aga gac atg ctt cgc gcc gca cct caa 482
Thr Val Pro Phe Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln
145 150 155

ctg gcg aaa ctg cag gca tgg aga agc gtt tac agt aag gtt gcc agt 530
Leu Ala Lys Leu Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser
160 165 170

tac atc gaa gat gaa cat ctg cgc cag gcg ttt tct ttc cac tcg ctg 578
Tyr Ile Glu Asp Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu
175 180 185

ttg gtg ggc ggc aat ccc ttc gcc acc tca tcc att tat acg ttg ata 626
Leu Val Gly Gly Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile
190 195 200

cac gcg ctg gag cgt gag tgg ggc gtc tgg ttt ccg cgt ggc ggc acc 674
His Ala Leu Glu Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr
205 210 215 220

ggc gca tta gtt cag ggg atg ata aag ctg ttt cag gat ctg ggt ggc 722
Gly Ala Leu Val Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly
225 230 235

gaa gtc gtg tta aac gcc aga gtc agc cat atg gaa acg aca gga aac 770
Glu Val Val Leu Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn
240 245 250

aag att gaa gcc gtg cat tta gag gac ggt cgc agg ttc ctg acg caa 818
Lys Ile Glu Ala Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln
255 260 265

gcc gtc gcg tca aat gca gat gtg gtt cat acc tat cgc gac ctg tta 866
Ala Val Ala Ser Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu
270 275 280

agc cag cac cct gcc gcg gtt aag cag tcc aac aaa ctg cag act aag 914
Ser Gln His Pro Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys
285 290 295 300

cgc atg agt aac tct ctg ttt gtg ctc tat ttt ggt ttg aat cac cat 962
Arg Met Ser Asn Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His
305 310 315

cat gat cag ctc gcg cat cac acg gtt tgt ttc gcc ccg cgt tac cgc 1010
His Asp Gln Leu Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg
320 325 330

gag ctg att gac gaa att ttt aat cat gat ggc ctc gca gag gac ttc 1058
Glu Leu Ile Asp Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe
335 340 345

tca ctt tat ctg cac gcg ccc tgt gtc acg gat tcg tca ctg gcg cct 1106
Ser Leu Tyr Leu His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro
350 355 360

gaa ggt tgc ggc agt tac tat gtg ttg gcg ccg gtg ccg cat tta ggc 1154
Glu Gly Cys Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly
365 370 375 380

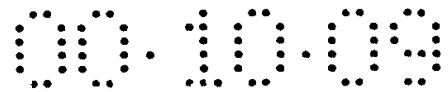
acc gcg aac ctc gac tgg acg gtt gag ggg cca aaa cta cgc gac cgt 1202
Thr Ala Asn Leu Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg
385 390 395

att ttt gcg tac ctt gag cag cat tac atg cct gcc tta cgg agt cag 1250
Ile Phe Ala Tyr Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln

	400		405		410	
ctg gtc acg cac cgg atg ttt acg ccg ttt gat ttt cgc gac cag ctt						1298
Leu Val Thr His Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu	415		420		425	
aat gcc tat cat ggc tca gcc ttt tct gtg gag ccc gtt ctt acc cag						1346
Asn Ala Tyr His Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln	430		435		440	
agc gcc tgg ttt cgg ccg cat aac cgc gat aaa acc att act aat ctc						1394
Ser Ala Trp Phe Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu	445		450		455	460
tac ctg gtc ggc gca ggc acg cat ccc ggc gca ggc att cct ggc gtc						1442
Tyr Leu Val Gly Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val		465		470		475
atc ggc tcc gca aaa gcg aca gca ggt ttg atg ctg gag gat ctg att						1490
Ile Gly Ser Ala Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile		480		485		490
tga						1493

<210> 2
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> 噬夏孢欧文氏杆菌

<400> 2
 Met Lys Pro Thr Thr Val Ile Gly Ala Gly Phe Gly Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ile Arg Leu Gln Ala Ala Gly Ile Pro Val Leu Leu Leu Glu Gln
 20 25 30
 Arg Asp Lys Pro Gly Gly Arg Ala Tyr Val Tyr Glu Asp Gln Gly Phe
 35 40 45
 Thr Phe Asp Ala Gly Pro Thr Val Ile Thr Asp Pro Ser Ala Ile Glu
 50 55 60
 Glu Leu Phe Ala Leu Ala Gly Lys Gln Leu Lys Glu Tyr Val Glu Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Val Thr Pro Phe Tyr Arg Leu Cys Trp Glu Ser Gly Lys Val
 85 90 95
 Phe Asn Tyr Asp Asn Asp Gln Thr Arg Leu Glu Ala Gln Ile Gln Gln
 100 105 110
 Phe Asn Pro Arg Asp Val Glu Gly Tyr Arg Gln Phe Leu Asp Tyr Ser
 115 120 125
 Arg Ala Val Phe Lys Glu Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Thr Val Pro Phe
 130 135 140
 Leu Ser Phe Arg Asp Met Leu Arg Ala Ala Pro Gln Leu Ala Lys Leu
 145 150 155 160
 Gln Ala Trp Arg Ser Val Tyr Ser Lys Val Ala Ser Tyr Ile Glu Asp
 165 170 175
 Glu His Leu Arg Gln Ala Phe Ser Phe His Ser Leu Leu Val Gly Gly



180 185 190
Asn Pro Phe Ala Thr Ser Ser Ile Tyr Thr Leu Ile His Ala Leu Glu
195 200 205
Arg Glu Trp Gly Val Trp Phe Pro Arg Gly Gly Thr Gly Ala Leu Val
210 215 220
Gln Gly Met Ile Lys Leu Phe Gln Asp Leu Gly Gly Glu Val Val Leu
225 230 235 240
Asn Ala Arg Val Ser His Met Glu Thr Thr Gly Asn Lys Ile Glu Ala
245 250 255
Val His Leu Glu Asp Gly Arg Arg Phe Leu Thr Gln Ala Val Ala Ser
260 265 270
Asn Ala Asp Val Val His Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Ser Gln His Pro
275 280 285
Ala Ala Val Lys Gln Ser Asn Lys Leu Gln Thr Lys Arg Met Ser Asn
290 295 300
Ser Leu Phe Val Leu Tyr Phe Gly Leu Asn His His His Asp Gln Leu
305 310 315 320
Ala His His Thr Val Cys Phe Gly Pro Arg Tyr Arg Glu Leu Ile Asp
325 330 335
Glu Ile Phe Asn His Asp Gly Leu Ala Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Leu
340 345 350
His Ala Pro Cys Val Thr Asp Ser Ser Leu Ala Pro Glu Gly Cys Gly
355 360 365
Ser Tyr Tyr Val Leu Ala Pro Val Pro His Leu Gly Thr Ala Asn Leu
370 375 380
Asp Trp Thr Val Glu Gly Pro Lys Leu Arg Asp Arg Ile Phe Ala Tyr
385 390 395 400
Leu Glu Gln His Tyr Met Pro Gly Leu Arg Ser Gln Leu Val Thr His
405 410 415
Arg Met Phe Thr Pro Phe Asp Phe Arg Asp Gln Leu Asn Ala Tyr His
420 425 430
Gly Ser Ala Phe Ser Val Glu Pro Val Leu Thr Gln Ser Ala Trp Phe
435 440 445
Arg Pro His Asn Arg Asp Lys Thr Ile Thr Asn Leu Tyr Leu Val Gly
450 455 460
Ala Gly Thr His Pro Gly Ala Gly Ile Pro Gly Val Ile Gly Ser Ala
465 470 475 480
Lys Ala Thr Ala Gly Leu Met Leu Glu Asp Leu Ile
485 490

<210> 3
<211> 204
<212> DNA
<213> 豌豆

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(204)

<400> 3

```

atg gct tct atg ata tcc tct tcg gct gtg aca aca gtc agc cgt gcc 48
Met Ala Ser Met Ile Ser Ser Ser Ala Val Thr Thr Val Ser Arg Ala
  1                    5                    10                15

tct agg ggg caa tcc gcc gca gtg gct cca ttc ggc ggc ctc aaa tcc 96
Ser Arg Gly Gln Ser Ala Ala Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
                20                    25                30

atg act gga ttc cca gtg aag aag gtc aac act gac att act tcc att 144
Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
                35                    40                45

aca agc aat ggt gga aga gta aag tgc atg aaa cca act acg gta att 192
Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met Lys Pro Thr Thr Val Ile
                50                    55                60

ggt gca ggc ttc 204
Gly Ala Gly Phe
65

```

<210> 4

<211> 68

<212> PRT

<213> 豌豆

<400> 4

```

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 Val Ala Pro Phe Gly Gly Leu Lys Ser
                20                    25                30

Met Thr Gly Phe Pro Val Lys Lys Val Asn Thr Asp Ile Thr Ser Ile
                35                    40                45

Thr Ser Asn Gly Gly Arg Val Lys Cys Met Lys Pro Thr Thr Val Ile
                50                    55                60

Gly Ala Gly Phe
65

```

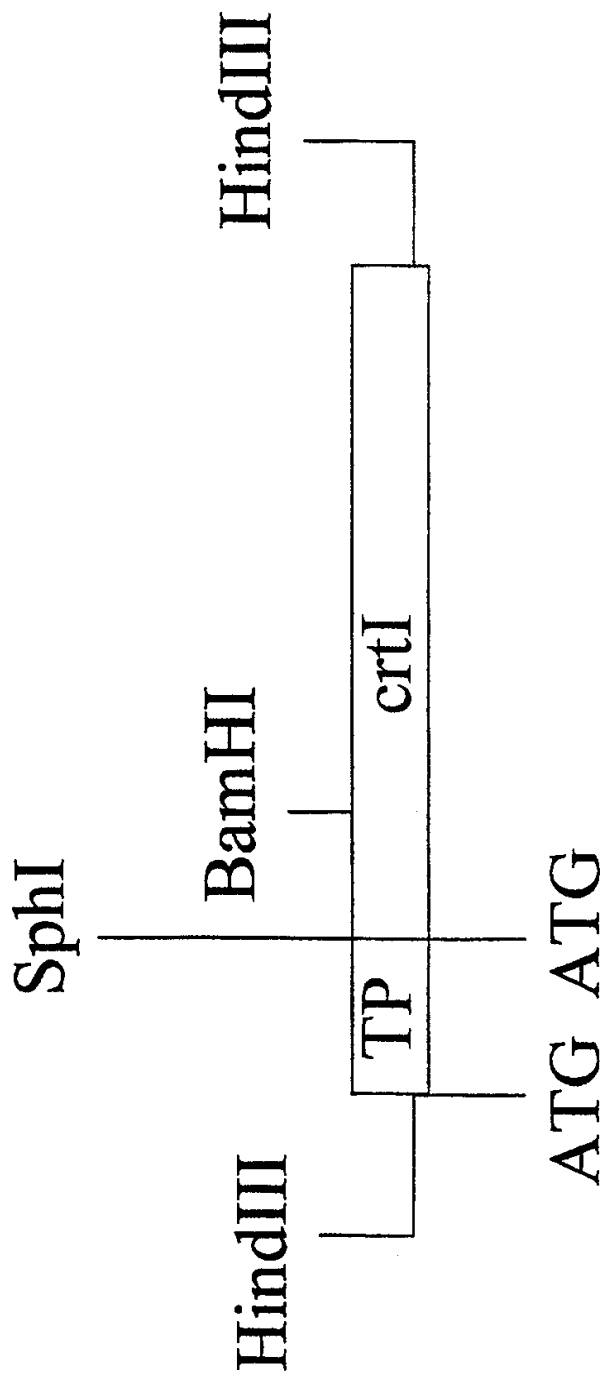


图 1