



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01820216.0

[43] 公开日 2004 年 3 月 3 日

[11] 公开号 CN 1479576A

[22] 申请日 2001.10.2 [21] 申请号 01820216.0

[30] 优先权

[32] 2000.10.6 [33] US [31] 60/238,406

[32] 2001.10.1 [33] US [31] 09/968,174

[86] 国际申请 PCT/US01/42461 2001.10.2

[87] 国际公布 WO02/28185 英 2002.4.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.6

[71] 申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 J·阿斯拉尔 F·C·科赫恩

E·F·桑德斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘元金 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 24 页

[54] 发明名称 通过使用硫甲沙姆杀虫剂处理转基因玉米种子以减少害虫对玉米的损害的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种保护玉米抵抗一种或多种害虫摄食损害的方法,包括用有效抗这一种或多种害虫中的一种或者另一种害虫的硫甲沙姆处理具有定向抗至少一种害虫的转基因事件的玉米种子。

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

1. 一种保护转基因玉米植物抵抗一种或多种害虫的摄食损害的方法,该方法包括

5 提供转基因玉米植物的种子,所述种子包括具有抵抗一种或多种害虫中的至少一种的活性的转基因事件;并且用有效量的硫甲沙姆杀虫剂处理种子。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述转基因事件包括表达Cry 3蛋白的能力。

10 3. 根据权利要求2的方法,其中所述转基因事件包括表达Cry3*蛋白的能力。

4. 根据权利要求3的方法,其中所述Cry3*蛋白包括Cry3B*蛋白。

5. 根据权利要求4的方法,其中所述Cry3B*蛋白选自Cry3Bb.11230, Cry3Bb.11231, Cry3Bb.11232, Cry3Bb.11233, 15 Cry3Bb.11234, Cry3Bb.11235, Cry3Bb.11236, Cry3Bb.11237, Cry3Bb.11238, Cry3Bb.11239, Cry3Bb.11241, Cry3Bb.11242, 和Cry3Bb.11098。

6. 根据权利要求5的方法,其中所述Cry3B*蛋白包括Cry3Bb.11231。

20 7. 根据权利要求5的方法,其中所述Cry3B*蛋白包括Cry3Bb.11098。

8. 根据权利要求2的方法,其中所述转基因事件能减小玉米根蠕虫引起的损害,使得当这种损害表示为根据衣阿华玉米根蠕虫1-6分级测定具有4-6分的玉米植物的百分比时,对转基因玉米的损害是相 25 同条件下对非转基因玉米的损害的大约5%至大约50%。

9. 根据权利要求8的方法,其中所述转基因事件能减小玉米根蠕虫引起的损害,使得当这种损害表示为根据衣阿华玉米根蠕虫1-6分级测定具有4-6分的玉米植物的百分比时,对转基因玉米的损害是相 同条件下对非转基因玉米的损害的大约10%至大约40%。

30 10. 根据权利要求9的方法,其中所述转基因事件能减小玉米根蠕虫引起的损害,使得当这种损害表示为根据衣阿华玉米根蠕虫1-6分级测定具有4-6分的玉米植物的百分比时,对转基因玉米的损害是

相同条件下对非转基因玉米的损害的大约 15%至大约 30%。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述转基因事件能减小玉米根
蠕虫引起的损害，使得当这种损害表示为根据衣阿华玉米根蠕虫 1-6
分级测定具有 4-6 分的玉米植物的百分比时，对转基因玉米的损害是
5 相同条件下对非转基因玉米的损害的大约 20%至大约 30%。

12. 根据权利要求 2 的方法，其中所述具有表达 Cry 3 蛋白能力
的种子也具有表达至少一种不同于 Cry 3 蛋白的另外的杀昆虫蛋白的
能力。

13. 根据权利要求 2 的方法，其中所述具有表达 Cry 3 蛋白能力
10 的种子也具有提供除草剂耐受性的转基因事件。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中提供除草剂耐受性的所述转基
因事件抗草甘膦。

15. 根据权利要求 2 的方法，其中所述转基因事件具有抗昆虫活
性。

16. 根据权利要求 15 的方法，其中所述昆虫选自鳞翅目，鞘翅目
和半翅目。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中所述昆虫是鞘翅目昆虫。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中所述昆虫是叶甲。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述昆虫包括选自玉米幼芽根
20 叶甲，*Diabrotica barberi* 和十一星瓜叶甲中的至少一种。

20. 根据权利要求 2 的方法，其中所述硫甲沙姆的有效量是每 100
kg 重量的种子至少大约 10 克至大约 2000 克杀虫剂活性成分。

21. 根据权利要求 20 方法，其中所述硫甲沙姆的有效量是每 100
kg 重量的种子至少大约 70 克至大约 1000 克杀虫剂活性成分。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述硫甲沙姆的有效量是每 100
25 kg 重量的种子至少大约 100 克至大约 600 克杀虫剂活性成分。

23. 根据权利要求 22 方法，其中所述杀虫剂的有效量是每 100 kg
重量的种子至少大约 200 克至大约 500 克杀虫剂活性成分。

24. 一种给产生的玉米植物提供提高的抵抗一种或多种害虫引起
30 的摄食损害的抗性的种子，该种子包括具有抵抗一种或多种害虫的至
少一种的活性的转基因事件；所述种子已经用有效量的硫甲沙姆处理
过。

25. 根据权利要求 24 的种子, 其中所述转基因事件包括表达来自苏云金芽孢杆菌的 Cry3 蛋白的能力。

26. 根据权利要求 25 的种子, 其中所述转基因事件包括表达来自苏云金芽孢杆菌的 Cry3Bb 蛋白的能力。

5 27. 根据权利要求 26 的种子, 其中所述转基因事件是表达来自苏云金芽孢杆菌的 Cry3Bb.11230, Cry3Bb.11231, Cry3Bb.11232, Cry3Bb. 11233, Cry3Bb. 11234 ,Cry3Bb. 11235, Cry3Bb. 11236, Cry3Bb. 11237, Cry3Bb. 11238, Cry3Bb. 11239, Cry3Bb.11241, Cry3Bb.11242, 或 Cry3Bb.11098 蛋白的能力。

10 28. 用权利要求 20 的方法处理过的转基因玉米种子。

通过使用硫甲沙姆杀虫剂处理转基因玉米种子
以减少害虫对玉米的损害的方法

5 相关申请的交叉参考

本申请是 2000 年 10 月 6 日提交的美国临时专利申请登记号 No. 60/238,406 的非临时申请, 并且要求了它的优先权。

发明背景

(1) 发明领域

10 一般来说, 本发明涉及防治通过摄食活动引起对玉米植物损害的害虫, 特别是涉及通过具有转基因事件的玉米种子和在播种之前用硫甲沙姆 (thiamethoxam) 杀虫剂处理这样的种子的联合来防治这样的玉米植物害虫。

相关领域的描述

15 昆虫和有节肢动物每年都在美国破坏估计 15% 的农作物, 在发展中国家更甚。另外, 竞争性杂草和寄生和腐生植物带来更大的产量降低。

当植物病原体, 昆虫和其他这样的土壤生害虫在播种之后损害种子时就发生一些这样的损伤。在玉米生产中, 其他大部分损害由以植物根部为食或者损害植物根部的昆虫害虫即根部蠕虫引起; 或者由切根虫, 欧洲玉米钻孔虫, 和以植物的地上部分为食或者损害植物的地上部分的其他害虫引起。害虫对农作物损害的类型和机理的一般性描述参见, 例如 Metcalf, Destructive and Useful Insects, (1962); 和 Agrios, Plant Pathology, 第三版, Academic Press (1988)。

25 玉米是美国中西部最重要的谷类作物。该地区最严重的玉米昆虫害虫是叶甲 (Diabrotica) 甲虫三个种的幼虫形式。包括西部玉米根蠕虫, 玉米幼芽根叶甲 (Diabrotica vergifera vergifera LeConte), 北部玉米根蠕虫, Diabrotica berberi Smith 和 Diabrotica berberi Lawrence, 和南部玉米根蠕虫, 十一星瓜叶甲
30 (Diabrotica undecimpunctata howardi Barber)。事实上, 与对于任何其他玉米害虫相比有更多的杀虫剂被用于防治玉米根蠕虫, 被处理的土地总面积大于在美国对于所有其他害虫处理的面积。

玉米根蠕虫 (CRW) 在虫卵期在前一季生长过玉米的大田中过冬。从 5 月底至 6 月卵孵化。如果不在播种玉米作物的下一年接着播种另一批玉米作物, 那么幼虫会死亡, 因此, 在系统播种一茬又一茬玉米的大田里最直接发现玉米根蠕虫的损害, 这在美国中西部很典型。

5 孵化之后, 幼虫经过三个幼虫或龄虫期, 期间它们以玉米根系为食。幼虫期的完成需要大约三个星期。幼虫摄食引起的对玉米根系的损伤是玉米由于玉米根蠕虫导致的收量减少的主要原因。根系主要部分疲软或遭破坏之后大田中倒伏的玉米植物是损失主要部分的致因, 因为该倒伏的玉米不能通过常规机械化机器收获因此留在大田中。

10 幼虫发育完成之后, 幼虫转化为不动的蛹, 并且从那以后转化为成体甲虫, 整个夏天不断从土壤中出现, 出现时间取决于成长地点。出现之后, 成体甲虫在雌性开始产卵之前摄食大约两周。最初, 成虫主要以它们出现的那块地为食, 但是随后会迁移到其他大田中。成虫最大活性一般在 7 月底或 8 月初发生在美国玉米地带中连续种植玉米的大田
15 中, 但是可能在第一年较晚时候或者晚熟玉米大田中活性达到最大。在它们出现大约两星期之后在玉米大田中根蠕虫甲虫开始产卵。(更多信息参见, 例如, Corn Rootworms, Field Crops Pest Management Circular #16, Ohio Pest Management & Survey Program, The Ohio State University, Extension Division, Columbus, Ohio; 在
20 www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/icm-fact/fc-16.html 可在线获得, 2000 年 9 月 13 日; 和 McGahen 等, Corn Insect Control: Corn Rootworm, PEN 页数 08801502, 从 Pennsylvania State University, State College, PA, 1989 可以获得字幕)。

在目前常规农业操作中, 在玉米接玉米的情况下, 施用杀虫剂来保护玉米根系使得不受根蠕虫幼虫的严重摄食是正常的。传统操作是处理成体甲虫或者处理幼虫。用于成体甲虫的常规处理制剂包括用甲萘威杀虫剂 (例如, SEVIN® 80S, 1.0-2.0 lbs 活性成分/英亩); 氰戊菊酯或 S-氰戊菊酯 (例如, PYDRIN® 2.4EC, 0.1 至 0.2 lbs 活性成分/英亩, 或者 ASANA® 0.66EC, 0.03 至 0.05 lbs 活性成分/英亩);
30 马拉硫磷 (57% E, 0.9 lbs 活性成分/英亩); 苄氯菊酯 (例如, AMBUSH®, 2.0EC, 0.1 至 0.2 lbs 活性成分/英亩, 或者 POUNCE® 3.2EC, 0.1 至 0.2 lbs 活性成分/英亩); 或者 PENNCAP-M®, 0.25-

0.5 1 bs 活性成分/英亩。

为了防治 CRW 幼虫,常规操作是在种植之时或者之后施用土壤杀虫剂,但是优选尽可能接近卵孵化期。常规处理包括克百威杀虫剂(例如, FURADAN®15G, 8 oz/1000 英尺行);毒死蜱(例如, LORSBAN®15G, 8
5 oz/1000 英尺行);地虫硫磷(例如, DYFONATE®, 20G, 4.5 - 6.0 oz/1000 英尺行);甲拌磷(例如, THIMET®, 20G, 6 oz/1000 英尺行);特丁磷(例如, COUNTER®, 15G, 8 oz/1000 英尺行);七氟菊酯(例如, FORCE®, 3G, 4 - 5 oz/1 000 英尺行)。

已知上面列出的化学杀虫剂中很多一般对人体和对动物有害。这些杀虫剂引起的环境污染经常由于通过对叶子喷雾或者直接对土壤表面施用来使用杀虫剂而更加恶化。随风漂移,浸析,和径流能够引起杀虫剂大部分迁移出期望的作用地带并且进入表面水和直接接触鸟类,动物和人。

因为关注化学杀虫剂对公共健康和环境健康的影响,人们尽了很大努力来寻找减少使用化学杀虫剂量的途径。最近,这样的努力有很多集中在开发转基因作物,这些作物经工程处理而表达来自微生物的昆虫毒素。例如,美国专利 No. 5,877,012, Estruch 等,公开了在植物中克隆和表达来自芽孢杆菌属,假单胞菌属,棍状杆菌属和根瘤菌等微生物的蛋白质,获得对黑切根虫,粘虫,一些钻孔虫和其他昆虫害
20 虫有抗性的转基因植物。Privalle 等公开的 WO/EP97/07089 教导了用编码过氧化物酶的重组 DNA 序列转化单子叶植物例如玉米来保护植株不受玉米钻孔虫、螟蛉和切根虫的摄食。Jansens 等, Crop Sci., 37(5):1616-1624 (1997),报道了包含编码来自苏云金芽孢杆菌(Bt)的晶体蛋白的基因的转基因玉米的生产,所述晶体蛋白防止欧洲玉米
25 钻孔虫的产生。Kozziel 等人的美国专利 No. 5,625,136 和 5,859,336 报道用来自苏云金芽孢杆菌的编码 δ -内毒素的基因转化玉米,得到对欧洲玉米钻孔虫有改良的抗性的转基因玉米。Armstrong 等人, Crop Science, 35(2):550-557 (1995)中提供了表达来自苏云金芽孢杆菌的杀虫蛋白的转基因玉米大田试验的综合报道。

已知野生型 Bt δ -内毒素具有低的抗鞘翅目昆虫活性, Kreig 等, 1983,报道第一次分离鞘翅目-毒性苏云金芽孢杆菌菌株。(参见美国专利 No. 4,766,203)。美国专利 No. 4,797,279 和 4,910,016 还公开

了产生具有一定鞘翅目活性的蛋白质的野生型和杂交苏云金芽孢杆菌菌株。然而更近些时候,更精确的遗传工程方法显示有希望开发修饰的苏云金芽孢杆菌蛋白质,其具有比野生型亲代产生的蛋白质的玉米根蠕虫活性高得多水平的玉米根蠕虫活性。(参见,例如,WO 99/31248 ,
5 Ecogen, Inc. and Monsanto Company)。

但是,迄今为止还不知道在严重侵染的连续种植玉米的大田中是不是任何单独的转基因事件足够有效来保护玉米不受玉米根蠕虫的损害。事实上,并不长期期望任何一种转基因事件全部防治玉米根蠕虫损害,因为有可能产生目标害虫的抗性株。

10 另一种杀虫剂应用的常规形式是用杀虫剂处理植物种子。有时使用杀真菌剂保护种子播种之后不受损害,使用低水平的杀虫剂例如保护玉米种子不受金针虫的损害已经应用了一段时间了。用杀虫剂处理种子是有好处的,提供了对种子的保护,同时减少了需要的杀虫剂的量,并且限制了接触杀虫剂的量和需要的不同大田施用的数目。

15 例如美国专利 No. 5,696,144 提供了对植物种子直接施用杀虫剂防治害虫的一个例子,它公开了与从未处理种子生长的对照植物相比,以每公担种子 500g 的比例用 1-芳基吡唑处理的种子长成玉米植株较小受到欧洲玉米钻孔虫的摄食损害。另外,Turnblad 等人的美国专利 No. 5,876,739 (及其母专利美国专利 No. 5,849,320) 公开了防
20 治土壤生昆虫的方法,包括用含有一种或几种聚合物粘合剂和一种杀虫剂的包衣处理种子。该篇文献提供了鉴定为可以用于这种包衣的候选的杀虫剂名单,还有很多可能的目标昆虫名单。母专利美国专利 No. 5,876,739 阐明用含有特殊杀虫剂的包衣处理玉米种子保护玉米根系不受玉米根蠕虫的损害,但是它并没有指明或者提示这样的处理用于
25 具有转基因事件的种子。

有人提出过用硝基亚氮化合物或硝基胍化合物杀虫剂处理具有转基因事件的种子(参见,例如,WO 99/35913),但是,没有发现有关这样的处理的潜在应用或有效性的指示,或者有关这样的处理如何实现等方面的详细描述-例如每单位量的种子需要的活性成分的量,并且没有
30 给出使人相信提出的处理方法实际上提供合适的保护作用的证据的实施例。

因此,尽管近来植物遗传工程的发展提高了保护植株不受害虫损

害的能力而且不用使用化学杀虫剂，并且与用杀虫剂处理种子这样的技术相比减少了杀虫剂对环境的有害作用，还存在很多问题限制实际大田条件下成功施用这些方法。因此，提供改进的保护植株的方法，特别是保护玉米植株不受害虫摄食损害的方法是有用的。如果这样的方法减少需要的常规化学杀虫剂的施用比例，以及如果其限制对于作物播种和耕作所要求的独立的大田操作的数目，将是特别有用的。

本发明概述

因此简要地说，本发明涉及保护转基因玉米植物不受一种或多种害虫摄食损害的一种新的方法，该方法包括提供转基因玉米植物种子，其中所述种子包括具有抵抗一种或多种害虫中的至少一种害虫的活性的转基因事件；和用有效量硫甲沙姆杀虫剂处理种子。

本发明还涉及新的转基因玉米植物种子，其提供了获得的玉米植物抵抗一种或多种害虫摄食损害的提高了的抗性，包括具有抵抗一种或多种害虫中的至少一种害虫的活性的转基因事件，该种子用有效量硫甲沙姆处理过。

本发明还涉及用本发明的方法处理过的新的转基因玉米种子。

发现通过本发明方法实现的几个好处中，可以注意到提供一种保护作物特别是玉米植物不受害虫摄食损害的改进的方法；提供这样一种方法，其减少了需要的常规化学杀虫剂的施用比例；还提供了这样一种方法，其限制了农作物种植和耕作所要求的独立的大田操作次数。

发明详述

根据本发明，发现通过一种方法能够保护玉米植物不受一种或多种害虫的摄食损害，所述方法包括提供具有抵抗至少一种害虫的活性的转基因事件的玉米种子，然后用有效量的硫甲沙姆杀虫剂处理该转基因玉米种子。例如，在优选的实施方案中，发现具有抗玉米根蠕虫活性的转基因事件与用硫甲沙姆处理种子的联合出人意料地提供了保护玉米植物不受玉米根蠕虫损害的卓越效益。特别地，相信具有引起产生CryBb. 11231 内毒素的转基因事件的玉米种子与用硫甲沙姆处理这样的种子的联合在保护得到的玉米植物抵抗已知降低玉米产量的更严重水平的玉米根蠕虫的损害方面出人意料地比单独的转基因事件或者比单独的用硫甲沙姆处理更优越。

经工程处理而包括来自苏云金芽孢杆菌的编码表达具有抗鞘翅目

害虫的活性的 Cry3 δ -内毒素的外源基因的玉米植物和种子是已知的，用杀虫剂处理种子（甚至是一些转基因种子）的方法也是已知的。但是，在本发明之前没有人意识到一些有效量的硫甲沙姆会被用来处理具有这样的 Cry3 事件的玉米种子，结果该项联合出人意料地在提高杀虫剂药效和转基因事件两方面都卓越，并且会提供另外的好处，即提高与害虫压力相竞争的杀虫活性的能力，降低处理和/或应用成本，提高种子处理的安全性，和降低转基因事件或杀虫剂或者两者对环境的影响。

特别地，相信在优选的实施方案中对每 100 kg 的种子用大约 100 克至大约 400 克的硫甲沙姆处理能表达某些被修饰的 Cry3Bb 蛋白的转基因玉米种子能出人意料地提供抗玉米根蠕虫的卓越保护作用。另外，相信这样的联合对于保护出芽的玉米植物抵抗黑切根虫的损害也是有效的。还相信本发明的种子具有降低杀虫剂使用成本的性质，因为与不使用创新的方法相比，可以使用更少的杀虫剂来获得需要量的保护作用。此外，因为使用较少的杀虫剂而且因为在播种前使用而不是独立的大田施用，相信本发明方法因此对于操作者和对环境是安全的，可能比常规方法更节省。

当说某些作用是“协同的”时，意思是包括转基因事件和杀虫剂联合的杀虫活性（或效力）的联合的增效作用。但是，不是意指将这样的协同作用限于杀虫活性，而是应该还包括这样的意料之外的好处，如扩大活性范围，与损害降低的类型和量有关的有益的活性曲线，降低杀虫剂和应用成本，降低杀虫剂在环境中的分布，减少生产，操作和种植玉米种子的人对杀虫剂的接触，和对本领域技术人员公知的其它好处。

本发明还提供了提高杀虫活性与害虫压力相竞争的能力的好处。这是指设计转基因事件和杀虫剂处理的联合使得在目标害虫对种子或植株的摄食压力达到最大时的时期对种子和得到的植株提供有效的杀虫活性。作为举例，当对具有玉米根蠕虫转基因事件的玉米种子施用杀虫剂例如硫甲沙姆时，可以在设计提供杀虫剂受控释放的包衣中施用杀虫剂。选择释放速度使得杀虫剂提供在抵抗玉米萌芽期之后受硫甲沙姆控制的这样的其它害虫的保护作用，而转基因事件在植株发育的更晚期—当需要这样的保护作用时，提供玉米根蠕虫保护作用。

如这里使用的, 术语"杀虫作用" 和"杀虫活性", 或"活性"指抗害虫毒性的作用。术语 "抗(一种或多种)害虫的活性", 也具有相同的意义。当说一种种子或植株"受到保护以抵抗一种或多种害虫的摄食损害"时, 意思是这样的种子或植株拥有这样的特征, 即对一种或多种害虫具有直接或间接作用, 与处于相同条件下对没有这样的特征的植物引起的摄食损害相比, 导致所述害虫对具有所述特征的植物的种子, 根, 芽和叶产生减轻的摄食损害。这样的直接或间接作用包括诱导害虫死亡, 从植物种子, 根, 芽和/或叶排斥害虫, 抑制害虫在植物种子, 根, 芽和/或叶上摄食, 产卵, 抑制或防止害虫繁殖。

- 5 术语"杀昆虫活性"和杀虫活性具有相同的意义, 除非它限于其中所述害虫是昆虫的那些例子。除非具体指明, 当这里使用术语"杀虫剂"时, 该术语指对种子外部施用的化学杀虫剂, 而不是指包括特定种子或者该特定种子长成的植株产生的活性物质。然而, 术语"杀虫活性"和"杀昆虫活性"可以指单独的外部施用的杀虫剂和/或种子或植物产生的物质, 或者两者的活性。

本发明的一个特征是转基因玉米植物的种子。如这里所使用的, 术语"转基因玉米植物" 意思是从转化的玉米植物细胞或原生质体产生的玉米植株或其后代, 其中植物DNA 包含原来相同品种天然的非转基因植物中不存在的导入的外源 DNA 分子。

- 20 转基因玉米种子是包含编码杀虫蛋白的外源基因的种子。这种类型的杀虫蛋白描述于 Schnepf 等, Microbiology & Molecular Biology Reviews, 62:775-806 (1998), 和 French-Constant 和 Bowen, CMLS Cell. Mol. Life Sci., 57:828-833 (2000)。在本发明的一个实施方案中, 所述杀虫蛋白是一种杀昆虫蛋白。

- 25 优选的是种子包含来自苏云金芽孢杆菌菌株的外源基因, 特别地, 优选所述外源基因是来自苏云金芽孢杆菌的编码杀虫 δ -内毒素的基因。这样的 δ -内毒素描述于 WO 99/31248 和美国专利 No. 6, 063, 597, 并且包括 Cry3 毒素。本发明中有用的编码修饰的苏云金芽孢杆菌对鞘翅目有毒性的结晶蛋白的核酸片段描述于美国专利 No. 6, 060, 594, 而美国专利 No. 6, 023, 013 中讨论了包括编码这样的杀昆虫蛋白的核酸序列的昆虫抗性转基因植物。优选的是本发明的 δ -内毒素包括 Cry3B 蛋白, 更优选的是所述 δ -内毒素包括对鞘翅目有活性的 Cry3B

蛋白。Höfte 和 Whitely, Microbiol. Rev., 53:242-255, 1989 中提出了苏云金芽孢杆菌杀昆虫晶体蛋白的命名原则。修订了该命名原则, 并且在 <http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/index.html> 可以找到该修订的命名原则。这里使用该修订的命名原则描述转基因事件特征和该转基因事件编码的 δ -内毒素蛋白质。

当这里使用术语"转基因事件"时, 这样的术语意指上文描述的遗传工程 DNA, 但是也包括修饰的基因编码的蛋白质。因此玉米种子或玉米植物中的转基因事件包括表达蛋白质的能力。当说"转基因事件具有抗害虫活性"时, 理解是当蛋白质被表达并且接触害虫时实际上具有这样的活性的基因编码的蛋白质。

WO 99/31248 和美国专利 No. 6, 063, 597 描述了遗传工程方法处理苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因使得能够表达修饰的 δ -内毒素的方法。修饰的 δ -内毒素与野生型蛋白质的不同之处在于与野生型生物体产生的蛋白质相比具有特定的氨基酸取代, 添加或缺失。这里使用星号(*)鉴定这样的修饰的 δ -内毒素, 或者参照通过其鉴定号表示的特定蛋白质。因此, 遗传工程修饰的 Cry3 δ -内毒素可以表示为 Cry3*, 其例子包括但不限于: Cry3Bb.11230, Cry3Bb.11231, Cry3Bb.11232, Cry3Bb.11233, Cry3Bb.11234, Cry3Bb.11235, Cry3Bb.11236, Cry3Bb.11237, Cry3Bb.11238, Cry3Bb.11239, Cry3Bb.11241, Cry3Bb.11242, 和 Cry3Bb.11098。

发现 WO 99/31248 和美国专利 No. 6, 063, 597 中描述的修饰的 δ -内毒素中的一些具有增强的抗鞘翅目昆虫活性, 特别是叶甲, 包括玉米根蠕虫。如这里使用的, 术语"增强的活性"指与没有氨基酸修饰的相同毒素的活性相比, 两者都在相同的条件下测试时修饰的毒素具有增强的杀昆虫活性。特别地, 发现 Cry3* δ -内毒素具有增强的抗玉米根蠕虫活性, 因此在本发明中优选使用。更优选的是 Cry3B* δ -内毒素, 甚至更优选的是 Cry3Bb* δ -内毒素。甚至更优选的转基因事件是包括表达下表中列出的修饰的 δ -内毒素能力的那些。表中还给出了包含新的内毒素表达基因的各个转基因苏云金芽孢杆菌菌株, 和它们在农业研究机构保藏中心(NRRL) at 1815 N. University Street, Peoria, Ill. 91904 的保藏日期和保藏号。

菌株	保藏日期	蛋白质	保藏号 (NRRL号)
EG11230	5/27/97	Cry3Bb.11230	B-21768
EG11231	5/27/97	Cry3Bb.11231	B-21769
EG11232	5/27/97	Cry3Bb.11232	B-21770
EG11233	5/27/97	Cry3Bb.11233	B-21771
EG11234	5/27/97	Cry3Bb.11234	B-21772
EG11235	5/27/97	Cry3Bb.11235	B-21773
EG11236	5/27/97	Cry3Bb.11236	B-21774
EG11237	5/27/97	Cry3Bb.11237	B-21775
EG11238	5/27/97	Cry3Bb.11238	B-21776
EG11239	5/27/97	Cry3Bb.11239	B-21777
EG11241	5/27/97	Cry3Bb.11241	B-21778
EG11242	5/27/97	Cry3Bb.11242	B-21779
EG11098	11/28/97	Cry3Bb.11098	B-21903

还发现当与含有具有一定水平抗所述害虫的效力的转基因事件的种子联合应用时降低害虫摄食损害是本发明的优选的应用。为了详细说明什么水平的效力是优选的,下面的实施例将使用衣阿华根分级方法(Iowa Root Rating Method)(Hills 和 Peters, J. Econ. Entomol, 64: 764-765, 1971), 其按 1-6 个等级测定玉米根蠕虫对玉米根的摄食损害。分级是, 1=没有损害或者只有极少的摄食疤痕; 2=摄食疤痕明显但是植株的 1.5 英寸内没有根被吃掉; 3=植株的 1.5 英寸内几处根被吃掉,但是从来没有相当于根的整个结节被破坏; 4=一个根结节 (root node) 被完全破坏; 5=两个根结节被完全破坏; 和 6=三个或多个根结节被破坏。被破坏的根定义为已经被吃掉至基部的 1.5 英寸内的根。被吃掉的根不一定从单一结节发出,但是所有的被吃掉的根必须等于计数为被破坏结节的完整结节等同物。

如这里使用的, 如果与没有该转基因事件的相同的农作物相比, 该事件在一定程度上降低了那种害虫带来的摄食损伤,但是没有防止该目标害虫带来的基本所有的损伤, 则该转基因事件在抵抗目标害虫优选效力水平之内。例如, 如果 10%的转基因玉米遭受衣阿华 1-6 级

的4级或更高级的玉米根蠕虫损害,而80%的非转基因玉米遭受4级或更高级损害,则可以说对转基因玉米的损害是对非转基因玉米的损害的 $(10/80) \times 100 = 12.5\%$ 。对于本发明的目的,如果在相同的条件下,由于相同的害虫,具有这样的转基因事件的玉米遭受的损害是非转基因玉米遭受的损害的大约5%至大约50%,则认为玉米中的转基因事件在效力水平的优选范围内。更优选的是具有这样的转基因事件的玉米遭受在相同的条件下相同的害虫对非转基因玉米的损害的大约10%至大约40%,更优选是相同的条件下相同的害虫对非转基因玉米的损害的大约15%至大约30%,更优选是相同的条件下相同的害虫对非转基因玉米的损害的大约20%至大约30%。如这里使用的,当使用术语"大约"来描述对玉米的损伤程度时,认为损伤程度可以高于或低于描述的界限值1%或2%,并且还认为是在描述的范围内。例如,4.5%损害水平被认为是"大约5%"。

没有期望受该理论或者其它任何理论的局限,相信当与提供抗目标害虫优选的效力范围内的保护作用的转基因事件联合时,杀虫种子处理能够提供显著的好处。另外,相信在本领域技术人员公知的情况,具有优选效力范围内的转基因事件是有益的。

本发明还包括具有一种以上转基因事件的种子和植物。这样的联合称之为"堆积的"转基因事件。这些堆积的转基因事件可以是针对相同的目标害虫的作用,或者它们可以针对不同的目标害虫。在一个优选的方法中,具有表达Cry 3蛋白能力的种子也具有表达至少一种不同于Cry 3蛋白的一种另外的杀昆虫蛋白的能力。

在另一个优选的方法中,具有表达Cry 3蛋白能力的种子还具有提供除草剂耐受性的转基因事件。更优选的是提供除草剂耐受性的转基因事件是提供对草甘膦, N-(膦酰基甲基)甘氨酸, 包括所述除草剂的异丙基胺盐形式的耐受性的作用,更优选的是提供除草剂耐受性的转基因事件是提供对草甘膦的耐受性的作用,更优选的是有效提供从圣路易斯孟山都公司获得的ROUNDUP READY®植物和种子的除草剂耐受性的转基因事件。

在本发明方法中,用硫甲沙姆(3-[(2-氯-5-噻唑基)甲基]四氢-5-甲基-N-硝基-4H-1,3,5-噁二嗪-4-亚胺; CAS RN 153719-23-4; 描述于EP 580553, 还描述于The Pesticide Manual, Id., 896)处理

具有转基因事件的玉米。

当这里描述的是杀昆虫剂时,要明白描述意指包括杀昆虫剂的盐形式以及表现出和描述的杀昆虫剂形式相同的具有杀昆虫活性的杀昆虫剂的所有同分异构体和/或互变异构体形式。

- 5 本发明方法中使用的杀昆虫剂可以是市场上销售的所述杀昆虫剂的任何级别和纯度。本发明方法和组合物还允许商售制剂中伴随杀昆虫剂的作为杂质的其它材料,只要这样的其它材料不破坏组合物的稳定性或者不明显降低或破坏任何杀昆虫剂成分或者抗目标害虫的转基因事件的活性。杀虫剂生产领域的技术人员能容易鉴定哪些杂质可以
10 允许哪些不允许。

发现本发明方法用来保护种子和植株抵抗宽范围的农业害虫,包括昆虫,螨,真菌,酵母,霉菌,细菌,线虫,杂草,寄生的和腐生的植物。

当一种昆虫是本发明的目标害虫时,这样的害虫包括但不限于:

- 15 来自鳞翅目(Lepidoptera),例如,
长翅卷蛾(Acleris spp.),褐带卷蛾(Adoxophyes spp.),透翅蛾(Aegeria spp.),夜蛾(Agrotis spp.),棉叶波纹夜蛾(Alabama argillaceae),Amylois spp.,黎豆夜蛾(Anticarsia gemmatalis),黄卷蛾(Archips spp.),带卷蛾(Argyrotaenia spp.),纹夜蛾
20 (Autographa spp.),玉米蛀茎褐夜蛾(Busseola fusca),干果斑螟(Cadra cautella),Carposina nipponensis,二化螟(Chilo spp.),色卷蛾(Choristoneura spp.),Clysia ambiguella,纵卷叶野螟(Cnaphalocrocis spp.),卷蛾(Cnephasia spp.),细卷蛾(Cochylis spp.),鞘蛾(Coleophora spp.),Crocidolomia binotalis,苹果
25 异形小卷蛾(Cryptophlebia leucotreta),小卷蛾(Cydia spp.),灰杆草螟(Diatraea spp.),展叶松夜蛾(Diparopsis castanea),实蛾(Earias spp.),干果斑螟(Ephestia spp.),白小卷蛾(Eucosma spp.),Eupoecilia ambiguella,茶黄毒蛾(Euproctis spp.),切根虫(Euxoa spp.),小食心虫(Grapholita spp.),Hedya nubiferana,
30 夜蛾(Heliothis spp.),菜心野螟(Hellula undalis),美国白蛾(Hyphantria cunea),茄茎麦蛾(Keiferia lycopersicella),旋纹潜蛾(Leucoptera scitella),细蛾(Lithocolletis spp.),

- Lobesia botrana, 毒蛾 (*Lymantria* spp.), 潜蛾 (*Lyonetia* spp.), 天幕毛虫 (*Malacosoma* spp.), 甘蓝夜蛾 (*Mamestra brassicae*), 烟草天蛾 (*Manduca sexta*), 尺蠖蛾 (*Operophtera* spp.), 玉米螟 (*Ostrinia Nubilalis*), 超小卷蛾 (*Pammene* spp.), 褐卷蛾
- 5 (*Pandemis* spp.), 小眼夜蛾 (*Panolis flammea*), 红铃麦蛾 (*Pectinophora gossypiella*), 马铃薯麦蛾 (*Phthorimaea operculella*), 小菜粉蝶日本亚种 (*Pieris rapae*), 毛连菜 (*Pieris* spp.), 菜蛾 (*Plutella xylostella*), 巢蛾 (*Prays* spp.), 白螟 (*Scirpophaga* spp.), 大螟 (*Sesamia* spp.), 长须卷蛾
- 10 (*Sparganothis* spp.), 夜蛾 (*Spodoptera* spp.), 猛透翅蛾 (*Synanthedon* spp.), 带蛾 (*Thaumetopoea* spp.), 卷叶蛾 (*Tortrix* spp.), 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 和巢蛾 (*Yponomeuta* spp.);
- 来自鞘翅目 (*Coleoptera*), 例如,
- 金针虫 (*Agriotes* spp.), 花象甲 (*Anthonomus* spp.), 甜菜隐食
- 15 甲 (*Atomaria linearis*), 甜菜茎跳甲 (*Chaetocnema tibialis*), 象甲 (*Cosmopolites* spp.), 栗象 (*Curculio* spp.), 皮 (*Dermestes* spp.), 叶甲 (*Diabrotica* spp.), 豆瓢虫 (*Epilachna* spp.), *Eremnus* spp., 马铃薯叶甲 (*Leptinotarsa decemlineata*), 稻象 (*Lissorhoptrus* spp.), 鳃角金龟 (*Melolontha* spp.),
- 20 *Orycaephilus* spp., 草莓根象甲 (*Otiorhynchus* spp.), *Phlyctinus* spp., 弧丽拔 (*Popillia* spp.), 跳甲 (*Psylliodes* spp.), 谷蠹 (*Rhizopertha* spp.), 金龟甲科 (*Scarabeidae*), 米象 (*Sitophilus* spp.), 麦蛾 (*Sitotroga* spp.), 粉虫 (*Tenebrio* spp.), 拟古谷 (*Tribolium* spp.) 和皮蠹 (*Trogoderma* spp.);
- 25 来自直翅目 (*Orthoptera*), 例如,
- 螞 (*Blatta* spp.), 小螞 (*Blattella* spp.), 蟋蟀 (*Gryllotalpa* spp.), 马德拉蜚螞 (*Leucophaea maderae*), 飞蝗 (*Locusta* spp.), 大螞 (*Periplaneta* spp.), 和蚱蜢 (*Schistocerca* spp.);
- 来自等翅目 (*Isoptera*), 例如,
- 30 犀白蚁 (*Reticulitermes* spp.);
- 来自啮虫目 (*Psocoptera*), 例如,
- 书虱 (*Liposcelis* spp.);

- 来自虱目 (Anoplura), 例如,
 血虱 (Haematopinus spp.), 长颚虱 (Linognathus spp.),
 虱 (Pediculus spp.), 天疱疮 (Pemphigus spp.) 和根瘤蚜
 (Phylloxera spp.);
- 5 来自食毛目 (Mallophaga), 例如
 Damalinae spp. 和啮毛虱 (Trichodectes spp.);
 来自缨翅目 (Thysanoptera), 例如,
 花蓟马 (Franklinella spp.), 条蓟马 (Hercinothrips spp.),
 带蓟马 (Taeniothrips spp.), 蓟马 (Thrips palmi), 烟蓟马 (Thrips
 10 tabaci) 和 非洲桔硬蓟马 (Scirtothrips aurantii);
 来自异翅亚目 (Heteroptera), 例如,
 臭虫 (Cimex spp.), 可可瘤盲蝽 (Distantiella theobroma),
 蛇莓 (Dysdercus spp.), Euchistus spp., 扁盾蝽 (Eurygaster
 spp.), 稻缘蝽 (Leptocorisa spp.), 绿蝽 (Nezara spp.), 网
 15 蝽 (Piesma spp.), 长红猎蝽 (Rhodnius spp.), 可可褐盲蝽
 (Sahlbergella singularis), 黑蝽 (Scotinophara spp.) 和 锥
 蝽 (Triatoma spp.);
 来自同翅目 (Homoptera), 例如,
 绵粉虱 (Aleurothrixus floccosus), Aleyrodes brassicae,
 20 圆盾蚧 (Aonidiella spp.), 蚜科 (Aphididae), 蚜 (Aphis spp.),
 圆盾蚧 (Aspidiotus spp.), 团扇芥 (Bemisia tabaci), 蜡蚧
 (Ceroplaster spp.), 茶褐圆蚧 (Chrysomphalus aonidium),
 蔷薇软蚧 (Chrysomphalus dictyospermi), 褐软蚧 (Coccus
 hesperidum), 微叶蝉 (Empoasca spp.), 苹果绵蚜 (Eriosoma
 25 larigerum), 斑叶蝉 (Erythroneura spp.), Gascardia spp., 飞
 虱 (Laodelphax spp.), Lacanium comi, 牡蛎盾蚧 (Lepidosaphes
 spp.), 长管蚜 (Macrosiphus spp.), 瘤蚜 (Myzus spp.), Nehoteftix
 spp., 飞虱 (Nilaparvata spp.), Paratoria spp., 瘦绵蚜
 (Pemphigus spp.), 粉蚧 (Planococcus spp.), 白蚧
 30 (Pseudaulacaspis spp.), 粉蚧 (Pseudococcus spp.), 木虱
 (Psylla spp.), Pulvinaria aethiopica, 圆盾蚧
 (Quadraspidiotus spp.), 缢管蚜 (Rhopalosiphum spp.), 盎

蚧 (*Saissetia* spp.), 叶蝉 (*Scaphoideus* spp.), 二叉蚧 (*Schizaphis* spp.), *Sitobion* spp., 温室粉虱 (*Trialeurodes vaporariorum*), *Trioza erytreae* 和桔盾蚧 (*Unaspis citri*);

来自膜翅目 (*Hymenoptera*), 例如,

- 5 *Acromyrmex*, 切叶蚁 (*Atta* spp.), 茎锯蜂 (*Cephus* spp.), 叶蜂 (*Diprion* spp.), 锯节叶蜂科 (*Diprionidae*), 云杉叶蜂 (*Gilpinia polytoma*), 实蜂 (*Hoplocampa* spp.), 黑蚁 (*Lasius* spp.), *Monomorium pharaonis*, 锯角叶蜂 (*Neodiprion* spp.), 水蚁 (*Solenopsis* spp.) 和胡蜂 (*Vespa* spp.);

- 10 来自双翅目 (*Diptera*), 例如,

- 伊蚊 (*Aedes* spp.), *Antherigona soccata*, *Bibio hortulanus*, 红头丽蝇 (*Calliphora erythrocephala*), 蜡实蝇 (*Ceratitis* spp.), 金蝇 (*Chrysomya* spp.), 库蚊 (*Culex* spp.), 黄蝇 (*Cuterebra* spp.), 大实蝇 (*Dacus* spp.), 果蝇 (*Drosophila melanogaster*), 15 厕蝇 (*Fannia* spp.), 胃蝇 (*Gastrophilus* spp.), 舌蝇 (*Glossina* spp.), 皮蝇 (*Hypoderma* spp.), *Hyppobosca* spp., 潜叶蝇 (*Liriomyza* spp.), 绿蝇 (*Lucilia* spp.), 潜蝇 (*Melanagromyza* spp.), 舍蝇 (*Musca* spp.), 狂蝇 (*Oestrus* spp.), *Orseolia* spp., 瑞典麦秆蝇 (*Oscinella frit*), 黎泉蝇 (*Pegomyia hyoscyami*), 麦 20 蝇 (*Phorbia* spp.), 苹果实蝇 (*Rhagoletis pomonella*), 潭蝇 (*Sciara* spp.), 螫蝇 (*Stomoxys* spp.), 虻 (*Tabanus* spp.), *Tannia* spp. 稻大蚊 (*Tipula* spp.),

来自蚤目 (*Siphonaptera*), 例如,

- 角叶蚤 (*Ceratophyllus* spp.) 和东方鼠蚤 (*Xenopsylla cheopis*) 和来自婴尾目 (*Thysanura*), 例如,

西洋衣鱼 (*Lepisma saccharina*).

- 发现当昆虫害虫是叶甲 (*Diabrotica* spp.), 特别是当害虫是玉米幼芽根叶甲 (*Diabrotica virgifera*), *Diabrotica barberi*, 或十一星瓜叶甲 (*Diabrotica undecimpunctata*) 时, 本发明是特别有 30 效的。

相信本发明特别有效的另一个应用是当杀虫剂具有抗杂草或寄生或腐生植物活性并且转基因事件具有抗选自玉米幼芽根叶甲

(*Diabrotica virgifera*), *Diabrotica barberi* 和十一星瓜叶甲 (*Diabrotica undecimpunctata*) 的活性的时候。当所述杂草或寄生或腐生植物是已知非洲植物"Striga"时相信更加优选有用,甚至当杀虫剂是 ROUNDUP® (从孟山都公司获得) 甚至更优选。

5 在本发明方法中,对转基因玉米种子施加硫甲沙姆。尽管相信本发明方法可以适用任何生理状态的转基因玉米种子,但是优选种子处于一个足够耐受的状态,在处理过程中不蒙受损害。典型地,所述种子是从大田收获的种子;离开植物的;和离开玉米穗、茎、外壳、和包围的果肉,或者其它非种子植物材料。种子还优选生物学稳定性达到处理对种子不引起生物学损伤的程度。在一个实施方案中,例如,对收
10 获的经清理的干燥后含湿量低于大约 15 重量%的玉米种子施加处理。在另一个实施方案中,种子可以是干燥之后用水和/或其它材料处理,然后在用杀虫剂处理之前或期间再次干燥的种子。在上述限度之内,相信处理适用于种子收获和种子播种期间任何时间的种子。如这里使用的,术语"没有播种的种子"意在包括种子收获和为植物的发芽和生长
15 而在地中播种期间任何时间的种子。当说到用杀虫剂"处理"没有播种的种子时,这样的处理不包括对土壤而不是对种子施用杀虫剂的那些操作。例如,在播种种子的同时在区域,"T"-区,或者犁沟中施用杀虫剂这样的处理不认为是包括在本发明中。

20 杀虫剂,或者杀虫剂的组合物可以以其本身施用,即,没有任何稀释成分或附加成分存在。但是,杀虫剂一般以杀虫剂制剂形式对种子施用。这种制剂可以含有一种或多种其它期望的成分,包括但不限于液体稀释剂,作为杀虫剂的基质的粘合剂,在应激条件下保护种子的填料,提高包衣的柔性,粘合力 and/或扩散能力的增塑剂。另外,对于含
25 有极少或者不含填料的油性杀虫剂制剂,可能会期望向制剂加入干燥剂,例如碳酸钙,高岭土或膨润土粘土,珍珠岩,硅藻土或者任何其它吸附材料。在种子处理中使用这样的成分是本领域公知的。参见,例如美国专利 No. 5,876,739。技术人员根据要处理的种子的类型和选择的特殊杀虫剂,容易选择在杀虫剂制剂中使用的期望的成分。另
30 外,可以使用已知杀虫剂的容易购得的商售制剂,如下面实施例中证明的。

可以用下面成分的一种或多种处理种子:其它杀虫剂,包括只在地

下作用的化合物；杀真菌剂，例如克菌丹，福美双，甲霜灵，(methoxam=拆分的甲霜灵异构体)，咯菌腈，恶霜灵，和各种所述物质的异构体等，除草剂，包括选自氨基甲酸酯类，硫代氨基甲酸酯类，乙酰胺类，三嗪类，二硝基苯胺类，甘油醚类，吡啶酮类，尿嘧啶类，苯氧基化合物类，脲类，和苯甲酸类的化合物；除草安全剂，例如氧氮杂萘，二苯甲基衍生物，N,N-二丙烯基二氯乙酰胺，各种二卤代酰基，恶唑烷基和噻唑烷基化合物，乙烷酮(ethanone)，萘二甲酸酐化合物，和脲衍生物；肥料；和生物控制剂，例如天然存在的或重组细菌和来自根瘤菌属，芽孢杆菌属，假单胞菌属，沙雷氏菌属，木霉属，球菌属，胶球菌属和菌根真菌的真菌。这些成分可以作为分开的层加到种子上或者可以作为杀虫剂组合物的一部分加入。

优选地，种子处理中使用的新的成分或其它成分的量应该不抑制种子的发芽，或者对种子引起抑制植物生长的损害。

用来在本发明中处理转基因玉米种子的杀虫剂制剂可以是下面的形式：混悬剂；乳剂；含水介质(例如水)中颗粒浆液；可湿润粉末剂；可湿润颗粒剂(干燥可流动的)；和干燥颗粒。如果配制成混悬剂或浆液，制剂中活性成分的浓度优选是大约0.5重量%至大约99重量%(w/w)，优选5-40%。

如上所述，可以向制剂中掺入其它常规无活性或惰性成分。这样的惰性成分包括但不限于：常规粘着剂，分散剂例如甲基纤维素(Methocel A15LV或Methocel A15C,例如,作为用于种子处理的混合的分散剂/粘着剂)，聚乙烯醇(例如，Elvanol 51-05)，卵磷脂(例如，Yelkinol P)，聚合物分散剂(例如，聚乙烯吡咯烷酮/乙酸乙烯酯PVP/VA S-630)，增稠剂(例如，提高粘度并且减少颗粒悬浮液的沉积的粘土增稠剂例如Van Gel B)，乳液稳定剂，表面活性剂，抗冻化合物(例如，尿素)，颜料，着色剂，等等。本发明中使用的其它惰性成分可以参见 McCutcheon's, vol. 1, "Emulsifiers and Detergents," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996。本发明中使用的附加惰性成分可以参见 McCutcheon's, vol. 2, "Functional Materials," MC Publishing Company, Glen Rock, N.J., U.S.A., 1996。

通过任何标准的种子处理方法可以对种子施用本发明的杀虫剂和

杀虫剂制剂,包括但不限于在容器(例如瓶子或袋)中混合,机械施用,鼓转,喷雾,和浸渍。任何常规活性或惰性材料可以用于使本发明的杀虫剂与种子接触,例如常规包膜材料,包括但不限于例如 Sepiret (Seppic, Inc., Fairfield, N.J.)和 Opacoat (Berwind Pharm.

5 Services, Westpoint, Pa.)这样的水基包膜材料。

本发明的杀虫剂可以作为种子包衣的成分对种子施用。当通过加入本发明的杀虫剂的混合物的实施方案之一予以改变时,本领域公知的种子包被方法和组合物是有用的。用于其应用的所述包被方法和设备公开于,例如,美国专利 Nos. 5,918,413, 5,891,246, 5,554,445,
10 5,389,399, 5,107,787, 5,080,925, 4,759,945 和 4,465,017。种子包被组合物公开于,例如,美国专利 Nos. 5,939,356, 5,882,713, 5,876,739, 5,849,320, 5,834,447, 5,791,084, 5,661,103, 5,622,003, 5,580,544, 5,328,942, 5,300,127, 4,735,015, 4,634,587, 4,383,391, 4,372,080, 4,339,456, 4,272,417 和
15 4,245,432。

有用的种子包衣含有一种或多种粘合剂和至少一种本发明的杀虫剂混合物。

本发明中使用的粘合剂优选包括可以是天然的或合成的并且对要包被的种子没有抑制植物生长作用的粘合剂聚合物。粘合剂可以选自
20 聚乙酸乙烯酯;聚乙酸乙烯酯共聚物; 乙烯乙酸乙烯酯共聚物(EVA); 聚乙烯醇; 聚乙烯醇共聚物; 纤维素,包括乙基纤维素, 甲基纤维素, 羟甲基纤维素,羟丙基纤维素和羧甲基纤维素; 聚乙烯吡咯烷酮; 多糖, 包括淀粉,改性的淀粉, 糊精, 麦芽糊精,藻酸盐和壳多糖; 脂肪; 油; 蛋白质,包括明胶和玉米醇溶蛋白; 阿拉伯胶; 虫胶; 亚乙烯基氯和亚
25 乙烯基氯共聚物; 木素磺化钙; 丙烯酸共聚物; 聚丙烯酸乙酯; 聚环氧乙烷; 丙烯酰胺聚合物和共聚物; 聚丙烯酸羟乙酯, 甲基丙烯酰胺单体; 和聚氯丁烯。

优选选择粘合剂使得其可以作为本发明杀虫剂的基质。上面公开的粘合剂都可以用作基质, 具体的粘合剂取决于杀虫剂组合的性质。
30 这里使用的术语 "基质"意思是一种或几种粘合剂化合物的连续固相, 本发明一种或多种杀虫剂通过该连续固相分布为不连续相。任选地, 基质中也可以存在填料和/或其它成分。术语基质理解是包括可以

被看作是基质体系，贮存体系或微胶囊体系。一般情况下，基质体系由本发明的杀虫剂和不均匀分布在聚合物中的填料组成，而贮存体系由包括本发明杀虫剂的分开的相。（其物分散在周围环境中，限速。）和聚合物相组成。微胶囊包括小颗粒或液滴包衣，还有固相基质中的分散物。

包衣中粘合剂的量可以变化，但是在种子重量的大约 0.01 至大约 25% 范围内，更优选大约 0.05 至大约 15%，甚至更优选大约 0.1% 至大约 10%。

如上所述，基质可以任选地包括填料。填料可以是吸收剂或惰性填料，例如本领域公知的，并且可以包括木屑，粘土，活性炭，糖，硅藻土，谷粉，细谷粒无机固体，碳酸钙，等。可以使用的粘土和无机固体包括膨润土钙，高岭土，中国粘土，滑石，珍珠岩，云母，蛭石，硅酸盐，石英粉，蒙脱石及其混合物。可以使用的糖包括糊精和麦芽糊精。谷粉包括小麦粉，燕麦粉和大麦粉。

选择填料使得其为种子提供合适的微环境，例如使用填料提高活性成分装载比例和调节活性成分的控制释放。填料有助于包被种子的生产和对种子包被的过程。填料的量可以不同，但一般填料成分的重量是在种子重量的大约 0.05 至大约 75% 的范围内，更优选大约 0.1 至大约 50%，甚至更优选大约 0.5% 至 15%。

包衣中使用的杀虫剂是这里描述的那些杀虫剂。用于处理种子的杀虫剂的量根据种子的类型和活性成分的类型而不同，但是处理包括使种子接触杀虫有效量的杀虫剂。当昆虫是目标害虫时，该量是杀昆虫有效量的杀昆虫剂的量。如这里使用的，杀昆虫有效量意思是杀死生长的幼虫或蛹状态的昆虫害虫，或者持续降低或延迟昆虫害虫产生的损害的量的杀昆虫剂的量。

一般情况下，在处理中对种子施用的硫甲沙姆的量的范围是每 100 kg 重量的种子大约 10 克至大约 2000 克杀虫剂活性成分。优选地，杀虫剂的量在每 100 kg 种子大约 50 克至大约 1000 克活性成分范围内。更优选地，杀虫剂的量在每 100 kg 种子大约 100 克至大约 600 克活性成分范围内。甚至更优选地在每 100 kg 种子重量大约 200 克至大约 500 克活性成分范围内。或者，发现优选的是杀虫剂的量是每 100 kg 种子超过大约 60 克杀虫剂活性成分的量，更优选每 100 kg 种子超

过大约 80 克。

在本发明优选的实施方案中，所述转基因事件包括表达 Cry3Bb.11231 蛋白或 Cry3Bb.11098 蛋白的能力，并且杀虫剂是硫甲沙姆。

- 5 处理中使用的杀虫剂一定要不抑制种子发芽，并且应该在目标昆虫对种子或植株引起损害的目标昆虫生长周期的那段时间内对保护种子和/或植物是有效的。一般情况下，播种之后大约 0-120 天包衣是有效的。

- 10 在本发明中，杀虫剂以包衣形式对种子施用。在允许高杀虫剂负荷的条件下施用包衣是特别有效的，这种条件一般是处理顽固性害虫，例如玉米根蠕虫所要求的，而且同时防止了由于提高的杀虫剂负荷量带来的不可接受的植物毒性。

- 15 任选地，在包衣制剂中可以使用增塑剂。一般使用增塑剂使包衣层形成的膜更有柔顺性，来提高粘着性和扩散性，来提高加工速度。提高的膜的柔顺性对于将，贮存、处理或播种过程期间的破碎、破坏或剥落最小化是重要的。可以使用很多增塑剂，但是有用的增塑剂包括聚乙二醇，甘油，邻苯二甲酸丁基苄酯，苯甲酸乙二醇酯和相关的化合物。包衣层中增塑剂的范围在大约 0.1 至大约 20%重量比范围内。

- 20 当包衣中使用的杀虫剂是油型制剂并且存在极少或不存在填料时，通过将制剂干燥来加快干燥过程是有用的。任选的步骤可以通过本领域公知的方法来完成，并且可以包括添加碳酸钙，高岭土或膨润土粘土，珍珠岩，硅藻土，或者优选与杀虫剂包衣层一起加入的吸收油或过量湿度的吸收材料。有效提供干燥包衣所需要的碳酸钙或相关化合物的量在种子重量的大约 0.5 至大约 10% 范围内。

- 25 杀虫剂形成的包衣优选是能通过从基质扩散或移动到周围介质中而有效延缓杀虫剂释放速度的类型。

除了包衣层之外，可以用下面成分的一种或几种处理种子：其它杀虫剂，包括杀真菌剂和除草剂；除草安全剂；肥料和/或生物控制剂。这些成分可以作为分开的层加入，或者可以在杀虫剂包衣层中加入。

- 30 应用常规包被技术和机器可以对种子施用杀虫剂制剂，例如流化床技术，滚轴研磨方法，旋转式种子处理机，和转筒包被机。也可以使用其它方法，例如喷射床。可以在包被之前将种子按大小分开。包被

之后，一般将种子干燥后转移到用于筛分的筛分机。这样的过程是本领域公知的。

也可以用一层膜在双重包被杀虫剂处理过的种子以保护杀虫剂包衣。这样的双重包被是本领域公知的并且可以应用流化床和转筒膜包被技术来实施。

在本发明的另一个实施方案中，利用固体基质填充可以将杀虫剂加到种子上或导入种子中。例如，一定量的杀虫剂可以与固体基质材料混合，然后使种子接触固体基质材料一段时间对种子引入杀虫剂。然后任选地将种子与固体基质材料分开并且贮存或使用，或者固体基质材料加种子的混合物可以被贮存或者直接播种。本发明中使用的固体基质材料包括聚丙烯酰胺，淀粉，粘土，二氧化硅，矾土，土壤，沙子，聚脲，聚丙烯酸酯，或者能吸收或吸附杀虫剂一段时间并且将杀虫剂释放到种子中或种子上的任何其它材料。确定杀虫剂与所述固体基质材料彼此兼容是有用的。例如，应该选择固体基质材料 使得其能够以合理的速度释放杀虫剂，例如经过几分钟，几小时或几天。

本发明进一步实施了作为用杀虫剂处理种子的另一种方法的抑制。例如，植物种子可以与在溶剂例如水中含有大约 1 重量%至大约 75 重量%的杀虫剂的溶液混合一段时间。优选地，该溶液浓度是大约 5 重量%至大约 50 重量%，更优选大约 10 重量%至大约 25 重量%。种子与溶液混合期间，种子吸收（浸渗）了一部分杀虫剂。任选地，可以例如通过振荡，旋转，上下颠倒或其它方式搅拌植物种子和溶液的混合物。浸渗之后，从溶液中分出种子并且任选地干燥，例如通过轻拍或风干。

在另一个实施方案中，粉末化杀虫剂可以直接与种子混合。任选地，可以使用粘着剂让粉末粘附种子表面。例如，一定量的种子可以混合粘着剂，并且任选地剧烈搅拌以利于用粘着剂对种子均匀涂层。然后将粘着剂包被的种子与粉末杀虫剂混合。可以例如通过上下颠倒来搅拌混合物，以利于粘着剂接触粉末杀虫剂，从而使得粉末杀虫剂粘附于种子。

本发明还提供了通过上述方法用杀虫剂处理过的转基因玉米种子。

本发明的处理过的种子可以以和常规处理过的玉米种子一样的方式用于玉米植株的繁殖。可以以和任何其它杀虫剂处理过的种子一样

的方式保存，处理，播种和耕种处理过的种子。采用合适的安全性量度来限制处理过的种子接触人，食物或饲料，水和鸟以及野生或家养动物。

5 下面的实施例描述了本发明的优选实施方案。考虑到这里公开的本发明的说明书或实施方案，权利要求书范围内的其它实施方案对于本领域技术人员是显而易见的。说明书和实施例的目的只是举例说明性的，实施例后面的权利要求书指明本发明的范围和精神。

10 下面的实施例描述了本发明的优选实施方案。考虑到这里公开的本发明的说明书或实施方案，权利要求书范围内的其它实施方案对于本领域技术人员是显而易见的。说明书和实施例的目的只是举例说明性的，实施例后面的权利要求书指明本发明的范围和精神。除非另有说明，实施例中所有的百分含量以重量为基础。

实施例 1

15 具有有效抗玉米根蠕虫的转基因事件的玉米种子的产生以及用硫甲沙姆 (Cruiser®) 处理该种子。

通过 W0 99131248，或者美国专利 No. 6, 023, 013 中对于这些各自事件描述的方法制备表达苏云金芽孢杆菌内毒素 Cry3Bb.11231 或 Cry3Bb.11098 的玉米种子。

20 如下用硫甲沙姆 (CRUISER®, 从 Novartis 获得) 处理有或没有各自的转基因事件的相同杂交物种的玉米种子：

25 通过将测定量的杀虫剂在作为载体的水中混合来制备期望的杀虫剂的种子处理制剂，并且在旋转种子处理机中室温下对测定重量的玉米种子施加一分钟的该制剂。计算杀虫剂制剂和玉米种子各自重量，得到杀虫剂对种子处理的期望比例。将杀虫剂混合到足够的水中使得制剂有效分布到该批量的所有的种子，同时将由于种子对制剂的吸收不足导致的处理制剂的损失最小化。在播种之前使处理过的种子敞开放置至少 4 小时。

30 当用硫甲沙姆处理种子时，将足够量的 CRUISER® 充分混合到水中，形成种子处理制剂，对一定重量的玉米种子施加该制剂，对每 100 kg 种子提供 300 克硫甲沙姆 的处理水平 (.75 mg 硫甲沙姆/种子)，或者对每 100 kg 种子提供 400 克硫甲沙姆 (1.0 mg 硫甲沙姆/种子)。

实施例 2

玉米种子中转基因事件 Cry3Bb.11231 与玉米根蠕虫杀虫剂种子处理联合抵抗西部和北部玉米根蠕虫的功效测定的大田试验。

- 根据有关程序并且满足 USDA 通知要求进行大田试验。试验目的是
- 5 测定玉米种子中转基因事件 Cry3Bb.11231 与玉米根蠕虫杀虫剂种子处理联合抵抗西部和北部玉米根蠕虫的功效。

对于每一个选择的耕种点,小块地设计包括如下:

	行间距:	30 英寸
	小块地大小:	4 行 x 20
10	植株密度:	2.0 种子/英尺
	使用的杂交:	LH198 x LH185 或 RX670
	重复:	4 次
	设计:	随机完全区组

- 15 地点: 4

幼虫来源: 补充玉米根蠕虫卵人工感染的天然感染, 400 个卵/ft (V2 生长期)

对于各生长区域可以使用下面的种子处理组合:

序号	玉米种子类型	杀虫剂和量
20		(活性成分克数/100kg 种子或者活性成分毫克数/种子)
1	同型杂交体 (Isohybrid)	没有, 除了低水平的对线蠕虫的防止
2	Cry3Bb.11231	没有, 除了低水平的对线蠕虫的防止
25	3	Cry3Bb.11231
		CRUISER® @ 300 克活性成分/100 千克或.75 毫克活性成分/种子
30	4	Cry3Bb.11231
		CRUISER® @ 400 克活性成分/100 千克或 1.0 毫克活性成分/种子

- 5 同型杂交体 (Isohybrid) Force®3G @ 0.014 克活性成分/m, 或者 0.15 oz 活性成分/1000 英尺行, 在播种时在土壤表面上以 5'' 带施用
- 5 6 同型杂交体 (Isohybrid) Lorsban ®15G (毒死蜱; 从 DowElanco 获得) @ 0.11 克活性成分/m, 或者 1.2 oz 活性成分/1000 英尺行, 在播种时在土壤表面上以 5'' 带施用
- 10 如实施例 1 所述进行所有的杀虫剂种子处理。在编号 1 和 2 的种子处理中, Gaucho® (imidacloprid) 可以用于防止线蠕虫, 但是水平足够低, 预期对玉米根蠕虫没有作用 (即, 处理水平是大约 60 克活性成分/100 kg 种子或 0.16 毫克活性成分/种子), 另外, 接受序号 2 处理的种子应该只具有转基因事件 Cry3Bb.11231 并且没有预期抗玉米根蠕虫有效的杀虫剂处理。
- 15 对于序号 3 和 4 处理的种子, 通过实施例 1 描述的方法施用杀虫剂。对于序号 5 和 6 处理的种子, 在播种时在 5'' 带对土壤施用商售的 Force® 3G 和 Lorsban® 15G, 提供与标准操作的比较。给出了施用水平, 并且是在标准商业操作推荐的范围内。
- 20 应该根据上面描述的方法在几个不同的地点播种和使要试验的玉米种子生长。
- 25 根据下面的方法进行玉米根蠕虫损害测定。在 V4-V6 阶段, 通过计数每英亩植株数进行早期状态评估。VT-R1 阶段, 通过工业上公知的方法进行玉米根蠕虫损害的评估, 根据衣阿华 1-6 分级体系报道玉米根蠕虫的损害。在该体系中, 每小块土地回收 10 株玉米植株的根系, 并且使用 1-6 分级规格评分, 其中: 1=没有损害或者只有几处小的摄食疤痕, 2=摄食损害明显, 但是没有根被吃到植株的 1.5 英寸内; 3=至少一个根被吃掉至植株的 1.5 英寸内, 但是从来没有根的整体结节被破坏; 4=一个根结节被吃掉至植株的 1.5 英寸内; 5=两个根结节 (环)
- 30 被吃掉至植株的 1.5 英寸内; 6=三个根结节 (环) 被吃掉至植株的 1.5 英寸内。

相信从这些技术获得的数据表明用硫甲沙姆处理过的转基因种子

与没有这样的杀虫剂处理的转基因种子相比对玉米根蠕虫损害更具有抵抗力。此外,相信这样的试验表明所述联合处理(转基因事件加杀虫剂处理)比 FORCE®或 LORSBAN®的常规表面带更有效。

5 这里参考的讨论只是为了总结作者作出的主张,没有承认任何参考文献构成现有技术。申请人保留对引述的参考文献的准确性和相关性表示异议的权利。

综上所述,可以看到实现了本发明的几个优点并且获得其他优点。

10 可以对上述方法和组合物进行各种改变而不超出本发明范围,上面描述中包含的所有的事物只是详细说明而不是限制的意思。