

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年11月17日(17.11.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/237541 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2018.01)
C12N 9/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/089519
- (22) 国际申请日: 2022年4月27日(27.04.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202110514749.8 2021年5月12日(12.05.2021) CN
- (71) 申请人: 北京大北农生物技术有限公司(BEIJING DABEINONG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院原子能利用研究所49号楼, Beijing 100193 (CN)。
- (72) 发明人: 肖翔(XIAO, Xiang); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。 宋庆芳(SONG, Qingfang); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。 陶青(TAO, Qing); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。 于彩虹(YU, Caihong); 中国北京市海淀区圆明园西路2号院中国农业科学院北区加工10号楼, Beijing 100193 (CN)。
- (74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司(PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路30号科大天工大厦B座16层01室, Beijing 100083 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: USE OF PROTOPORPHYRINOGEN OXIDASE

(54) 发明名称: 原卟啉原氧化酶的用途

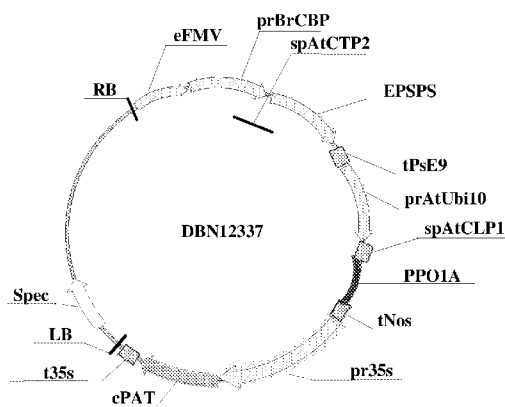


图 1

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a protoporphyrinogen oxidase. A method for controlling weeds comprises applying a herbicide containing an effective dose of a PPO inhibitor to a field in which at least one transgenic plant is present, wherein the transgenic plant comprises, in the genome thereof, a polynucleotide sequence encoding protoporphyrinogen oxidase, and the transgenic plant has reduced plant damage and/or has an increased plant yield compared with other plants that do not have a polynucleotide sequence encoding protoporphyrinogen oxidase. The protoporphyrinogen oxidase PPO1-PPO14 of the present invention has a high tolerance to a PPO inhibitor herbicide. In addition, the plants containing the polynucleotide sequence encoding protoporphyrinogen oxidase have a strong tolerance to the PPO inhibitor herbicide, and show high-resistance tolerance to almost all of 4-fold field concentration of oxyfluorfen, saflufenacil and flumioxazin and 2-fold field concentration of sulfentrazone. Therefore, the protoporphyrinogen oxidase has broad application prospects in plants.

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要：本发明涉及一种原卟啉原氧化酶的用途，所述控制杂草的方法包括将含有有效剂量PPO抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量。本发明原卟啉原氧化酶PPO1-PPO14对PPO抑制剂除草剂具有较高的耐受性，且含有编码原卟啉原氧化酶多核苷酸序列的植物对PPO抑制剂除草剂的耐受性强，其对4倍大田浓度的乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺和丙炔氟草胺以及2倍大田浓度的甲磺草胺几乎全部表现出高抗的耐受性。因此在植物上应用前景广阔。

原卟啉原氧化酶的用途

技术领域

5 本发明涉及一种原卟啉原氧化酶的用途，特别是涉及一种来源于原核生物的原卟啉原氧化酶赋予植物对 PPO 抑制剂除草剂具有耐受性的方法及用途。

背景技术

10 卟啉生物合成途径用于合成在植物代谢中起重要作用的叶绿素和血红素，并且该途径发生在叶绿体中。在该途径中，原卟啉原氧化酶（简称 PPO）催化原卟啉原 IX 氧化成原卟啉 IX。在原卟啉 IX 产生之后，原卟啉 IX 通过镁整合酶与镁结合来合成叶绿素，或通过铁整合酶与铁结合来合成血红素。

15 通过抑制 PPO 而发挥作用的除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂以及其他类型 PPO 抑制剂除草剂。在植物中，PPO 抑制剂抑制了 PPO 的酶活性，导致叶绿素和血红素的合成受到抑制，并且导致底物原卟啉原 IX 的积累，所积累的原卟啉原 IX 从叶绿体快速输出到细胞
20 质，细胞质中的原卟啉原 IX 在非酶促反应下转化为原卟啉 IX 并进一步在光和氧分子的存在下生成高反应性的单线态氧 (1O_2)，它们会破坏细胞膜并迅速导致植物细胞的死亡。

用于提供耐受 PPO 抑制剂除草剂植物的方法主要包括：1) 使用可以将除草剂或其活性代谢物转化成无毒产物的酶，将除草剂脱毒。2) 过表达敏感性
25 PPO，使得鉴于此酶的动力学常数，在植物中产生相对于除草剂足够的靶酶量，以致尽管存在 PPO 抑制剂除草剂，但这些敏感性 PPO 与该 PPO 抑制剂除草剂是充分作用的，从而具有足够的可供使用的功能性酶。3) 提供一种功能性 PPO，该功能性 PPO 对于除草剂或其活性代谢物是较不敏感的，但其保留了催化原卟啉原 IX 氧化为原卟啉 IX 的性质。关于功能性 PPO 类，虽然一种给
30 定的功能性 PPO 可以提供一個有用水平的对于一些 PPO 抑制剂除草剂的耐受性，但是相同的功能性 PPO 可能不足以提供一个商业化水平的对于一种不同的、更希望的 PPO 抑制剂除草剂的耐受性；例如，PPO 抑制剂除草剂可以在它们控制的杂草范围、它们的制造成本、以及它们的环境友好性方面是不同的。因此，需要用于向不同的作物和作物品种赋予 PPO 抑制剂除草剂耐受性
35 的新方法。

发明内容

5 本发明的目的是提供一种原卟啉原氧化酶的用途，所述原卟啉原氧化酶来源于原核生物，且转入编码本发明所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物对 PPO 抑制剂除草剂具有较好的耐受性。

为实现上述目的，本发明提供了一种控制杂草的方法，包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

15 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

20 优选地，所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；进一步优选地，所述转基因植物为草甘膦耐受性植物，所述杂草为草甘膦抗性杂草；

25 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

30 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

优选地，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

(a) 编码与选自自由 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

35 (b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序

列。

进一步地，所述转基因植物还包括至少一种不同于编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的编码第二种除草剂耐受性蛋白质的第二种多核苷酸。

所述第二种多核苷酸编码选择标记蛋白质、合成活性蛋白质、分解活性蛋白质、抗生物胁迫蛋白质、抗非生物胁迫蛋白质、雄性不育蛋白质、影响植物产量的蛋白质和/或影响植物品质的蛋白质。

具体地，所述第二种多核苷酸编码 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、草甘膦脱羧酶、草铵膦乙酰转移酶、 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶、麦草畏单加氧酶、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶和/或细胞色素类蛋白质。

可选择地，所述含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂还包括草甘膦除草剂、草铵膦除草剂、植物生长素类除草剂、禾本科除草剂、发芽前选择性除草剂和/或发芽后选择性除草剂。

为实现上述目的，本发明还提供了一种控制杂草生长的种植组合，包括 PPO 抑制剂除草剂和至少一种转基因植物，将含有有效剂量的所述 PPO 抑制剂除草剂施加到存在所述至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

优选地，所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；进一步优选地，所述转基因植物为草甘膦耐受性植物，所述杂草为草甘膦抗性杂草；

优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉

酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

5 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

优选地，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

(a) 编码与选自 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

10 (b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序列。

进一步地，所述转基因植物还包括至少一种不同于编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的编码第二种除草剂耐受性蛋白质的第二种多核苷酸。

15 所述第二种多核苷酸编码选择标记蛋白质、合成活性蛋白质、分解活性蛋白质、抗生物胁迫蛋白质、抗非生物胁迫蛋白质、雄性不育蛋白质、影响植物产量的蛋白质和/或影响植物品质的蛋白质。

具体地，所述第二种多核苷酸编码 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、草甘膦脱羧酶、草铵膦乙酰转移酶、 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶、麦草畏单加氧酶、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶和/或细胞色素类蛋白质。

20 可选择地，所述含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂还包括草甘膦除草剂、草铵膦除草剂、植物生长素类除草剂、禾本科除草剂、发芽前选择性除草剂和/或发芽后选择性除草剂。

为实现上述目的，本发明还提供了一种产生耐受 PPO 抑制剂除草剂的植物的方法，包括向植物的基因组中引入编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，当含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到至少存在所述植物的田地中，所述植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

25 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

35 进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的

氨基酸序列；

优选地，所述引入的方法包括遗传转化方法、基因组编辑方法或基因突变方法；

5 优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

10 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

15 为实现上述目的，本发明还提供了一种培养耐受 PPO 抑制剂除草剂植物的方法，包括：

种植至少一个植物繁殖体，所述植物繁殖体的基因组中包括编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

20 使所述植物繁殖体长成植株；

将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到至少包含所述植株的田地中，收获与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株；

25 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

30 进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

35 优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

5 优选地, 所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂;

进一步优选地, 所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

10 为实现上述目的, 本发明还提供了一种用于保护植物免受由 PPO 抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性的方法, 包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中, 所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列, 所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量, 其中所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性;

15 优选地, 所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性;

优选地, 所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性;

20 更优选地, 所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性;

进一步优选地, 所述原卟啉原氧化酶选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列;

25 优选地, 所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物; 更优选地, 所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥;

30 优选地, 所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂;

进一步优选地, 所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

35 为实现上述目的, 本发明还提供了一种原卟啉原氧化酶在赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性中的用途, 所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1

-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

5 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

10 优选地，所述原卟啉原氧化酶在赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性中的用途包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量；

15 优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

20 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、咪唑啉类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

25 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

优选地，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

(a) 编码与选自由 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

30 (b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序列。

作为具体的实施方式，PPO 抑制剂除草剂也即“PPO 抑制剂类除草剂”可以是选自由以下组成的组中的一种或多种，但不限于此：二苯醚类（草枯醚、甲氧除草醚（chlomethoxyfen）、甲羧除草醚（Bifenox）、乙氧氟草醚（oxyfluorfen）、三氟羧草醚及其盐和酯、氟磺胺草醚（Fomesafen）、乳氟禾草灵（lactofen）、乙羧氟草醚（fluoroglycofen-ethyl）、氯氟苯醚、苯草醚

(aclonifen)、治草醚(bifenox)、氯乳醚(ethoxyfen)、氯除草醚(chlorintrofen)、氟硝磺酰胺(halosafen)；噁二唑酮类(噁草酮(oxadiazon)、丙炔噁草酮(oxadiargyl)；N-苯基酰胺酰胺亚胺类(丙炔氟草胺(flumioxazin)、氟烯草酸(flumiclorac-pentyl)、吲哚酮草酯(cinidon-ethyl)；噁唑啉酮类(环戊噁草酮(pentoxazone)；苯基吡唑类(异丙吡草酯(fluzolate)、吡草醚)；脲嘧啶类(双苯嘧草酮、氟丙嘧草酯、苯嘧磺草胺(saflufenacil)；噻二唑类(噻二唑草胺(thidiazimin)、噻草酸甲酯(fluthiacet)；三唑啉酮类(唑啉草酮(azafenidin)、甲磺草胺(sulfentrazone)、唑啉草酯(carfentrazone)；三嗪酮类(Trifludimoxazin)；其他类(氟吡啶草酯(flufenpyr-ethyl)、双唑草腈(pyraclonil)。

本发明中使用的冠词“一种”和“一个”是指一个(种)或多于一个(种)(即至少一个)。例如,“一种要素”表示一种或多种要素(元件)。此外,术语“包括”或其变体例如“包括了”或“包含”应被理解为是指包括一种所述要素、整数或步骤,或一组要素、整数或步骤,但是不排除任何其他要素、整数或步骤,或者成组的要素、整数或步骤。

本发明中术语“除草剂不敏感的”是指在一种或多种 PPO 抑制剂除草剂的存在下,原卟啉原氧化酶维持其酶活性中的至少一部分的能力。原卟啉原氧化酶的酶活性可通过本领域已知的任何手段来测量,例如在一种或多种 PPO 抑制剂除草剂的存在下通过荧光、高效液相色谱法(HPLC)或质谱法(MS)测量原卟啉原氧化酶产物的生成量或原卟啉原氧化酶底物的消耗量来测定酶活性。“除草剂不敏感的”可以是对于特定除草剂的完全或部分不敏感性,并且可表达为对于特定 PPO 抑制剂除草剂的耐受性或不敏感性百分比。

本发明中术语“植物、种子、植物组织或细胞的除草剂耐受性”或“耐除草剂的植物、种子、植物组织或细胞”是指施用除草剂时,植物、种子、植物组织或细胞抵抗除草剂作用的能力。例如,耐除草剂的植物可以在除草剂的存在下存活或继续生长。植物、种子、植物组织或细胞的除草剂耐受性可以通过将植物、种子、植物组织或细胞与合适的对照进行比较来测量。例如,可以通过将除草剂施用于包含编码能够赋予除草剂耐受性的蛋白质的 DNA 分子的植物(试验植物)和不包含编码能够赋予除草剂耐受性的蛋白质的 DNA 分子的植物(对照植物),然后比较两种植物的植物损伤来测量或评估除草剂耐受性,其中试验植物的除草剂耐受性由损伤率与对照植物的损伤率相比降低来指示。与对照植物、种子、植物组织或细胞相比,耐除草剂的植物、种子、植物组织或细胞对除草剂毒性作用表现出的反应降低。术语“除草剂耐受性性状”是指与野生型植物相比赋予植物改善的除草剂耐受性的转基因性状。可以产生的具有本发明的除草剂耐受性性状的植物包括,例如任何植

物，包括作物植物，诸如燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄和拟南芥。

5 本发明的 DNA 分子可以完全或部分通过本领域已知的方法合成和修饰，特别是在需要提供用于 DNA 操作的序列（诸如限制酶识别位点或基于重组的克隆位点）、植物优选序列（诸如植物密码子使用或 Kozak 共有序列）或用于 DNA 构建体设计的序列（诸如间隔区或接头序列）的情况下。本发明包括编码选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性、至少 90% 序列同一性，至少 91% 序列同一性，至少 92% 序列同一性，至少 93% 序列同一性，至少 94% 序列同一性，至少 95% 序列同一性，至少 96% 序列同一性，至少 97% 序列同一性，至少 98% 序列同一性和至少 99% 序列同一性的蛋白质的 DNA 分子，优选蛋白。术语“序列同一性百分比”或“序列同一性%”是指在两个序列进行比对时，与试验序列（或其互补链）相比，参考序列或查询序列（或其互补链）的蛋白质序列中相同氨基酸的百分比。用于序列对比的方法在本领域中是熟知的并且可以使用数学算法来完成，这些数学算法如 Myers and Miller(1988)CABIOS 4:11-17 的算法；Smith et al.(1981) Adv.Appl.Math.2:482 的局部比对算法；Need eman and Wunsch(1970)J.Mol.Biol.48:443-453 的全局比对算法；以及 Karlin and Altschul (1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 872264 的算法，如在 Karlin and Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877 中的修改。对于序列比较可以利用这些数学算法的电脑实现方式以确定序列的同源性，此类实现方式包括但不限于：PC/Gene 程序中的 CLUSTAL(从 Intelligenetics,Mountain View,California 可获得)；ALLGN 程序（版本 2.0）以及 GCG Wisconsin Genetics Software Package 版本 10 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 以及 TFASTA(从 Accelrys Inc.,9685 Scranton Road,San Diego,California,USA 获得)。序列同一性百分比表示为同一性分数乘以 100。

30 本发明中所述乙氧氟草醚（oxyfluorfen），是指 2-氯-1-(3-乙氧基-4-硝基苯氧基)-4-三氟甲基苯，为无色结晶固体。属于二苯醚类超低用量选择性、芽前芽后触杀型 PPO 抑制剂除草剂，可制成乳油使用。杂草主要通过胚芽鞘、中胚轴吸收药剂致死。乙氧氟草醚可以有效防治水稻、大豆、玉米、棉花、蔬菜、葡萄、果树等作物田间的杂草，可防止的杂草包括但不限于，稗草、田菁、旱雀麦、狗尾草、曼陀罗、匍匐冰草、豚草、刺黄花捻、苘麻、田芥菜单子叶和阔叶杂草。

35 本发明中所述有效剂量乙氧氟草醚是指 180-720 g ai/ha 使用，包括 190-700 g ai/ha、250-650 g ai/ha、300-600 g ai/ha 或 400-500 g ai/ha。

本发明中所述苯嘧磺草胺(saflufenacil),是指 N'-[2-氯-4-氟-5-(3-甲基-2,6-二氧-4-(三氟甲基)-3,6-二氢-1(2H)-嘧啶)苯甲酰]-N-异丙基-N-甲基硫酰胺,为浅褐色挤条颗粒状固体。属于脲嘧啶类灭生性 PPO 抑制剂除草剂,可制成 70% 水分散颗粒剂型。苯嘧磺草胺可有效防治多种阔叶杂草,包括对草甘膦、ALS 和三嗪类产生抗性的杂草,其具有很快的灭生作用且土壤残留会降解迅速。

本发明中所述有效剂量苯嘧磺草胺是指以 25-100 g ai/ha 使用,包括 30-95 g ai/ha、40-90 g ai/ha、50-85 g ai/ha 或 60-80 g ai/ha。

本发明中所述丙炔氟草胺(Flumioxazin),是指 2-[7-氟代-3,4-二氢-3-氧代-4-(2-丙炔基)-2H-1,4-苯并噻-6-基]-4,5,6,7-四氢-1H-异吲哚-1,3(2H)-二酮。属于 N-苯基酞酰胺亚胺类幼芽和叶片吸收型 PPO 抑制剂除草剂,常用剂型为 50%可湿性粉剂和 48%悬浮剂。丙炔氟草胺可有效防治 1 年生阔叶杂草和部分禾本科杂草。其在环境中易降解,对后茬作物安全。

本发明中所述有效剂量丙炔氟草胺是指以 60-240 g ai/ha 使用,包括 70-220 g ai/ha、85-200 g ai/ha、90-185 g ai/ha 或 100-150 g ai/ha。

本发明中所述甲磺草胺(Sulfentrazone),是指 N-(2,4-二氯-5-(4-二氟甲基-4,5-二氢-3-甲基-5-氧代-1H-1,2,4-三唑-1-基)苯基)甲磺酰胺,为棕黄色固体。属于三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂,常用剂型为 38.9%、44.5%悬浮剂。甲磺草胺可用于防治玉米、高粱、大豆、花生等田中牵牛、反枝苋、藜、曼陀罗、马唐、狗尾草、苍耳、牛筋草、香附子等 1 年生阔叶杂草、禾本科杂草和莎草等。

本发明中所述有效剂量甲磺草胺是指以 450-900 g ai/ha 使用,包括 500-850g ai/ha、550-700 g ai/ha、500-685 g ai/ha 或 550-650 g ai/ha。

本发明中,术语“抗性”是可遗传的,并允许植物在除草剂对给定植物进行一般除草剂有效处理的情况下生长和繁殖。正如本领域技术人员所认可的,即使给定植物受到除草剂处理的一定程度损伤,如很少的坏死、溶解、萎黄或其它损伤,但至少没有在产量上有显著影响,植物仍可被认为“抗性”,也即给定植物具有的抵抗除草剂诱导的各种程度损伤的提高了的能力,而在同样的除草剂剂量下一般导致相同基因型野生型植物损伤。本发明中术语“耐性”或“耐受性”比术语“抗性”更广泛,并包括“抗性”。

本发明中所述抗生物胁迫蛋白质是指抵抗由其他生物所施加的胁迫的蛋白质,如昆虫抗性蛋白质、(病毒、细菌、真菌、线虫)疾病抗性蛋白质等。

本发明中所述抗非生物胁迫蛋白质是指抵抗外界环境所施加的胁迫的蛋白质,如对除草剂、干旱、热、寒冷、冰冻、盐胁迫、氧化胁迫等具有耐性的蛋白质。

本发明中所述影响植物品质的蛋白质是指影响植物输出性状的蛋白质,

如改进淀粉、油、维生素等质量和含量的蛋白质、提高纤维品质的蛋白质等。

此外，包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的表达盒在植物中还可以与至少一种编码除草剂耐受性基因的蛋白质一起表达，所述除草剂耐受性基因包括但不限于，5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS)、草甘膦氧化还原酶 (GOX)、草甘膦-N-乙酰转移酶 (GAT)、草甘膦脱羧酶、草铵膦乙酰转移酶 (PAT)、 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶 (AAD)、麦草畏单加氧酶 (DMO)、4-羟苯基丙酮酸双加氧酶 (HPPD)、乙酰乳酸合酶 (ALS) 和/或细胞色素类蛋白质 (P450)。

本发明中所述“草甘膦”是指 N-膦酰甲基甘氨酸和它的盐，用“草甘膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草甘膦的除草剂制剂进行处理。草甘膦的商业制剂包括但不限于，ROUNDUP® (作为异丙胺盐的草甘膦)、ROUNDUP®WEATHERMAX (作为钾盐的草甘膦)、ROUNDUP®DRY 和 RIVAL® (作为胺盐的草甘膦)、ROUNDUP®GEOFORCE (作为钠盐的草甘膦) 和 TOUCHDOWN® (作为三甲基硫盐的草甘膦)。

本发明中所述有效剂量草甘膦是指以 200-1600 g ae/ha 使用，包括 250-1600 g ae/ha、300-1600 g ae/ha、500-1600 g ae/ha、800-1500 g ae/ha、1000-1500 g ae/ha 或 1200-1500 g ae/ha。

本发明中所述“草铵膦”又名草丁膦，是指 2-氨基-4-[羟基(甲基)膦酰基]丁酸铵，用“草铵膦除草剂”处理是指使用任何一种含有草铵膦的除草剂制剂进行处理。

本发明中所述有效剂量草铵膦是指以 200-800 g ae/ha 使用，包括 200-750 g ae/ha、250-700 g ae/ha、300-700g ae/ha、350-650 g ae/ha 或 400-600 g ae/ha。

本发明中植物生长素类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，其影响细胞壁可塑性和核酸代谢，从而导致不受控制的细胞分裂和生长。由植物生长素类除草剂引起的损伤症状包括茎和柄的偏上性弯曲或扭曲、叶成杯形或卷曲、以及异常的叶形状和叶脉。植物生长素类除草剂包括但不限于，苯氧基羧酸化合物、苯甲酸化合物、吡啶羧酸化合物、喹啉羧酸化合物或草除灵乙酯化合物。典型地，植物生长素类除草剂为麦草畏、2,4-二氯苯氧基乙酸 (2,4-D)、(4-氯-2-甲基苯氧基) 乙酸 (MCPA) 和/或 4-(2,4-二氯苯氧基) 丁酸 (2,4-DB)。

本发明中所述“麦草畏”(Dicamba) 是指 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。其盐包括异丙胺盐、二甘醇铵盐、二甲胺盐、钾盐和钠盐。麦草畏的商业制剂包括但不限于，Banvel®(作为 DMA 盐)、Clarity® (BASF, 作为 DGA 盐)、VEL-58-CS-11™ 和 Vanquish® (BASF, 作为 DGA 盐)。

本发明中所述 2,4-D 是广谱、相对便宜且强力的阔叶除草剂，其已经在农业和非作物条件下用于广谱阔叶杂草控制超过 65 年。2,4-D 对不同植物具有不同水平的选择性（如双子叶植物比禾本科植物更敏感）。通常植物缓慢代谢 2,4-D，因此靶位点的不同活性更可能解释植物对 2,4-D 不同的应答。2,4-D 的植物代谢一般通过两步代谢实现，一般是羟基化后接着与氨基酸或葡萄糖缀合。

本发明中所述发芽前选择性除草剂包括但不限于，乙酰苯胺、乙草胺、乙酰乳酸合酶抑制剂和二硝基苯胺。

本发明中所述发芽后选择性除草剂包括但不限于，烟嘧磺隆、砘嘧磺隆、和精喹禾灵。

本发明中除草剂的施用量随土壤结构、pH 值、有机物含量、耕作系统和杂草的大小而变化，并且通过查看除草剂标签上合适的除草剂施用量来确定。

本发明中术语“赋予”是指向植物提供特征或性状，如除草剂耐受性和/或其它所希望的性状。

本发明中术语“异源的”是指来自另一个来源。在 DNA 的背景下，“异源的”是指任何外来的“非自身”DNA，包括来自相同种类的另一个植物的 DNA。例如，在本发明中，可以利用转基因的方法在大豆植物中表达大豆 PPO 基因，该大豆 PPO 基因仍被认为“异源的”DNA。

本发明中术语“核酸”包括涉及到的单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物，并且除非另有限制，包括具有天然核苷酸的基本性质的已知类似物（例如肽核酸），因为它们以一种类似于天然存在的核苷酸的方式与单链核酸杂交。

本发明中，当术语“编码”或“编码的”用于一种特定核酸的上下文中时，其意指核酸包含必需的信息以指导多核苷酸序列翻译成一种特定蛋白质。用来编码蛋白质的信息通过使用密码子来详细说明。编码蛋白质的核酸可以包含在核酸的翻译区内的非翻译序列（例如内含子），或者可以缺少此类插入的非翻译序列（例如在 cDNA 中）。

编码本发明所述原卟啉原氧化酶的 DNA 序列用于提供本发明的植物、植物细胞以及种子，相比于不包含编码本发明所述原卟啉原氧化酶的 DNA 序列的相同植物（对照植物），它们提供了对于多种 PPO 抑制剂除草剂较好的耐受性。

编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因对于产生耐受 PPO 抑制剂除草剂的植物是有用的。编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因特别适合在植物中表达，以便向植物赋予除草剂耐受性。

术语“多肽”、“肽”以及“蛋白”在本发明中可互换地使用，指的是氨基酸残

基的聚合物。这些术语应用于氨基酸残基的聚合物，所述氨基酸残基的聚合物中的一个或多个氨基酸残基是一个相应的天然存在的氨基酸的一种人工化学类似物，以及天然存在的氨基酸聚合物。本发明的多肽可以从一种本发明披露的核酸或通过使用标准分子生物学技术来产生。例如，本发明的一种截短的蛋白可以通过在一种适当的宿主细胞中表达本发明的一种重组核酸，或者可选择地通过结合离体方法（如蛋白酶消化和纯化）来产生。

本发明还提供了包括编码所述原卟啉原氧化酶的核酸分子。总体上，本发明包括编码相对于所述原卟啉原氧化酶具有一个或多个保守性氨基酸替换的原卟啉原氧化酶的任何多核苷酸序列。提供功能上相似的氨基酸保守性取代是本领域技术人员所熟知的，以下五组各自包含彼此保守性取代的氨基酸：
10 脂肪族：甘氨酸（G）、丙氨酸（A）、缬氨酸（V）、亮氨酸（L）、异亮氨酸（I）；芳香族：苯丙氨酸（F）、酪氨酸（Y）、色氨酸（W）；含硫的：甲硫氨酸（M）、半胱氨酸（C）；碱性的：精氨酸（I）、赖氨酸（K）、组氨酸（H）；酸性的：天冬氨酸（D）、谷氨酸（E）、天冬酰胺（N）、谷氨酰胺（Q）。

因此，具有原卟啉原氧化酶抑制剂除草剂耐受性活性并在严格条件下与本发明编码所述原卟啉原氧化酶的基因杂交的序列包括在本发明中。示例性的，这些序列与本发明序列 SEQ ID NO:29-42 和 SEQ ID NO:62-64 至少大约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更大的序列同源性，本发明编码所述原卟啉原氧化酶的基因不包括 SEQ ID
20 NO:15-28。

任何常规的核酸杂交或扩增方法都可以用于鉴定本发明 PPO 基因的存在。核酸分子或其片段在一定情况下能够与其他核酸分子进行特异性杂交。本发明中，如果两个核酸分子能形成反平行的双链核酸结构，就可以说这两个核酸分子彼此间能够进行特异性杂交。如果两个核酸分子显示出完全的互补性，则称其中一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。本发明中，当一个核酸分子的每一个核苷酸都与另一个核酸分子的对应核苷酸互补时，则称这两个核酸分子显示出“完全互补性”。如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在至少常规的“低度严格”条件下退火且彼此结合，则称这两个核酸分子为“最低程度互补”。类似地，如果两个核酸分子能够以足够的稳定性相互杂交从而使它们在常规的“高度严格”条件下退火且彼此结合，则称这两个核酸分子具有“互补性”。从完全互补性中偏离是可以允许的，只要这种偏离不完全阻止两个分子形成双链结构。为了使一个核酸分子能够作为引物或探针，仅需保证其在序列上具有充分的互补性，以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

本发明中，基本同源的序列是一段核酸分子，该核酸分子在高度严格条件下能够和相匹配的另一段核酸分子的互补链发生特异性杂交。促进 DNA 杂交的适合的严格条件，例如，大约在 45°C 条件下用 6.0×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)处理，然后在 50°C 条件下用 2.0×SSC 洗涤，这些条件对本领域技术人员是公知的。例如，在洗涤步骤中的盐浓度可以选自低度严格条件的约 2.0×SSC、50°C 到高度严格条件的约 0.2×SSC、50°C。此外，洗涤步骤中的温度条件可以从低度严格条件的室温约 22°C，升高到高度严格条件的约 65°C。温度条件和盐浓度可以都发生改变，也可以其中一个保持不变而另一个变量发生改变。优选地，本发明所述严格条件可为在 6×SSC、0.5%SDS 溶液中，在 65°C 下与编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因发生特异性杂交，然后用 2×SSC、0.1%SDS 和 1×SSC、0.1%SDS 各洗膜 1 次。

本发明中，术语“杂交”或“特异性杂交”是指一种分子在严格条件下仅可与特定的多核苷酸序列结合、双链化或杂交，这是在该序列存在于一种复合混合物（例如，总细胞）DNA 或 RNA 中时进行的。

由于遗传密码子的冗余性，多种不同的 DNA 序列可以编码相同的氨基酸序列。产生这些编码相同或基本相同的蛋白的可替代 DNA 序列正在本领域技术人员的技术水平内。这些不同的 DNA 序列包括在本发明的范围内。所述“基本上相同的”序列是指有氨基酸取代、缺失、添加或插入但实质上不影响除草剂耐受性活性的序列，亦包括保留除草剂耐受性活性的片段。

术语“功能活性”或“活性”在本发明中指本发明用途的蛋白质/酶（单独或与其它蛋白质组合）具有降解或减弱除草剂活性的能力。产生本发明蛋白质的植物优选产生“有效量”的蛋白质，从而在用除草剂处理植物时，蛋白质表达的水平足以给予植物对除草剂（若无特别说明则为一般用量）完全或部分的耐受性。可以以通常杀死靶植物的用量、正常的大田用量和浓度使用除草剂。优选地，本发明的植物细胞和植物被保护免受除草剂处理引起的生长抑制或损伤。本发明的转化植物和植物细胞优选具有 PPO 抑制剂除草剂的耐受性，即转化的植物和植物细胞能在有效量的 PPO 抑制剂除草剂存在下生长。

本发明中所述的基因和蛋白质不但包括特定的示例序列，还包括保存了所述特定示例的蛋白质的活性特征的部分和/片段（包括与全长蛋白质相比在内和/或末端缺失）、变体、突变体、变体蛋白质、取代物（有替代氨基酸的蛋白质）、嵌合体和融合蛋白。

本发明术语“变体”意指实质上类似的序列。对于多核苷酸，一种变体包括在参比多核苷酸之内的一个或多个内部位点处的一个或多个核苷酸的缺失和/或添加和/或在除草剂耐受性基因中的一个或多个位点处的一个或多个核苷酸

的替换。本发明中术语“参比多核苷酸或多肽”对应地包括除草剂耐受性多核苷酸序列或氨基酸序列。本发明中术语“天然多核苷酸或多肽”对应地包括天然发生的多核苷酸序列或氨基酸序列。对于核酸分子，保守型变体包括编码本发明所述原卟啉原氧化酶之一的多核苷酸序列（由于遗传密码的简并性）。如
5 这些天然发生的等位基因变体可以使用熟知的分子生物学技术，例如使用以下概述的聚合酶链式反应（PCR）以及杂交技术来鉴定。变体核酸分子还包括合成衍生的核酸分子，例如通过使用定点诱变产生的但是仍然编码本发明的一种原卟啉原氧化酶的核酸序列。通常，本发明的一种特定的核酸分子的变体将具有与该特定的核酸分子至少大约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、
10 95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同源性，通过序列对比程序和参数来确定同源性。

本发明中“变体蛋白质”意指从一种参比蛋白通过在所述原卟啉原氧化酶中的一个或多个内部位点处的一个或多个氨基酸的缺失或添加和/或在所述原卟啉原氧化酶中的一个或多个位点处的一个或多个氨基酸的替换而衍生的一种
15 蛋白质。由本发明涵盖的变体蛋白是生物学活性的，即它们继续具有本发明所述原卟啉原氧化酶的所希望的活性，即，仍具有所述的原卟啉原氧化酶活性和/或除草剂耐受性。此类变体可以产生于例如遗传多态性或产生于人工操作。本发明的一种所述原卟啉原氧化酶的生物活性变体将具有与该所述原卟啉原氧化酶的氨基酸序列的全部的至少大约 88%、90%、91%、92%、93%、94%、
20 95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同源性，此同源性通过序列比对程序和参数所确定。本发明的一种蛋白质的一种生物活性变体可能不同于至少至 1-15 个氨基酸残基、少至 1-10 个（如 6-10 个）、少至 5 个（如 4、3、2 个、或甚至 1 个）氨基酸残基的蛋白质。

在某些实施例中，编码本发明所述原卟啉原氧化酶或它们的保留了原卟啉原氧化酶活性的变体的原卟啉原氧化酶的核酸序列可以与任何感兴趣的核酸序列的组合进行叠加从而产生具有一种所希望的性状的植物。术语“性状”是指从特定的序列或序列组得到的表型。例如，编码本发明所述原卟啉原氧化酶或保留原卟啉原氧化酶活性的变体的原卟啉原氧化酶的核酸序列可以与任何其他
25 的编码赋予一种所希望的性状的多肽的核酸进行叠加，所述性状包括但不限于：对于疾病、昆虫以及除草剂的抗性，对于热和干旱的耐受性，缩短作物成熟时间、改进工业加工（例如，用于将淀粉或生物质转化为可发酵的糖类）以及改进的农艺学品质（例如，高油含量和高蛋白含量）。

本领域技术人员所熟知的，两种或更多作用模式的组合在提高受控杂草谱和/或天然更具耐受性物种或抗性杂草物种上的益处还可扩展到通过人工
35 （转基因或非转基因）在作物中产生除 PPO 耐受性作物外的除草剂耐受性的

化学品。事实上，可以单独或以多重组合叠加编码以下抗性的性状以提供有效控制或防止杂草演替对除草剂产生抗性能力：草甘膦抗性（如抗性植物或细菌 EPSPS、GOX、GAT）、草铵膦抗性（如 PAT、Bar）、乙酰乳酸合酶（ALS）抑制性除草剂抗性（如咪唑啉酮、磺酰脲、三唑嘧啶、磺苯胺、嘧啶硫代苯甲酸和其它化学品抗性基因如 AHAS、Csr1、SurA 等）、苯氧基生长素类除草剂抗性（如芳氧基链烷酸酯双加氧酶-AAD）、麦草畏除草剂抗性（如麦草畏单加氧酶-DMO）、溴草腈抗性（如 Bxn）、对八氢番茄红素去饱和酶（PDS）抑制剂的抗性、对光系统 II 抑制性除草剂的抗性（如 psbA）、对光系统 I 抑制性除草剂的抗性、对 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶抑制性除草剂抗性（如 HPPD）、对苯腈除草剂的抗性（如 CYP76B1）、二氯甲氧苯酸降解酶等等。

草甘膦被广泛地使用，因为它控制非常广谱的阔叶和禾本科杂草物种。然而，在草甘膦耐性作物和非作物应用中重复使用草甘膦已经（而且仍将继续）选择使杂草演替为天然更具有耐性的物种或草甘膦抗性生物型。多数除草剂抗性管理策略建议使用有效用量的罐混除草剂伴侣作为延缓出现抗性杂草的方法，所述除草剂伴侣提供对同一物种的控制，但具有不同的作用模式。将编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因与草甘膦耐性性状（和/或其他除草剂耐性性状）叠加可通过允许对同一作物选择性使用草甘膦和 PPO 抑制剂除草剂（如乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺和丙炔氟草胺）而实现对草甘膦耐性作物中草甘膦抗性杂草物种（被一种或多种 PPO 抑制剂除草剂控制的阔叶杂草物种）的控制。这些除草剂的应用可以是在含有不同作用模式的两种或更多除草剂的罐混合物中同时使用、在连续使用（如种植前、出苗前或出苗后）中单个除草剂组合物的单独使用（使用的间隔时间范围从 2 小时到 3 个月），或者备选地，可以在任何时间（从种植作物 7 个月内到收获作物时（或对于单个除草剂为收获前间隔，取最短者））使用代表可应用每种化合类别的任意数目除草剂的组合。

在控制阔叶杂草中具有灵活性是很重要的，即使用时间、单个除草剂用量和控制顽固或抗性杂草的能力。作物中与草甘膦抗性基因/编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因叠加的草甘膦应用范围可以从 250 至 2500 g ae/ha；PPO 抑制剂除草剂（一种或多种）可按照从 10-1000 g ai/ha。这些应用的时间的最佳组合取决于具体的条件、物种和环境。

除草剂制剂（如酯、酸或盐配方或可溶浓缩剂、乳化浓缩剂或可溶液体）和罐混添加剂（如佐剂或相容剂）可显著影响给定的除草剂或一种或多种除草剂的组合的杂草控制。任意前述除草剂的任意化学组合均在本发明的范围内。

此外，可以将编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因单独或与其它除草

剂耐受作物特征叠加后再与一种或多种其它输入（如昆虫抗性、真菌抗性或胁迫耐受性等）或输出（如提高的产量、改进的油量、提高的纤维品质等）性状叠加。因此，本发明可用于提供以灵活且经济地控制任何数目的农学害虫的能力和提 高作物品质的完整农学解决方案。

5 这些叠加的组合可以通过任何方法来产生，这些方法包括但不限于：通过常规的或顶交方法的杂交育种植物或遗传转化。如果这些序列是通过遗传转化这些植物来进行叠加的，所感兴趣的多核苷酸序列可以在任何时间并且以任何次序进行组合。例如，包括一个或多个所希望的性状的转基因植物可以用做通过后续转化而引入另外性状的靶标。这些性状可以在一个共转化方案中与由表达盒的任何组合提供的感兴趣的多核苷酸同时引入。例如，如果
10 将引入两个序列，这两个序列可以包含在分开的表达盒（反式）中或包含在相同的表达盒（顺式）中。这些序列的表达可以通过相同的启动子或通过不同的启动子来驱动。在某些情况下，可能希望的是引入一个抑制所感兴趣的多核苷酸的表达的表 达盒。这可以与其他抑制表达盒或过量表达盒的任何
15 组合进行组合以在该植物中产生所希望的性状组合。进一步认识到的是，多核苷酸序列可以在一个所希望的基因组位置处使用位点特异性重组系统进行叠加。

本发明编码所述原卟啉原氧化酶的基因对 PPO 抑制剂除草剂具有较高的耐受性，是重要的除草剂耐受作物和选择标记物特征可能性的基础。

20 本发明中术语“表达盒”是指能够在适当的宿主细胞中指引一种特定多核苷酸序列表达的一种核酸分子，包括有效连接到感兴趣的多核苷酸序列（即，一种单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合而编码一种本发明所述原卟啉原氧化酶或保留了原卟啉原氧化酶活性的变体蛋白的多核苷酸）的启动子，该感兴趣的多核苷酸序列有效连接到终止信号。该编码区通常对一种感兴趣的蛋白质进行编码，但是还可以对一种
25 感兴趣的功能性 RNA 进行编码，例如在正义或反义方向上的反义 RNA 或一种非翻译 RNA。包含该感兴趣的多核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的，意味着至少一个它的组分相对于至少一个它的其他组分是异源的。该表达盒还可以是一种天然发生的表达盒，但一定是以在对异源表达有用的重组体形式而
30 获得的。然而，典型地，该表达盒对于宿主是异源的，即，该表达盒的特定 DNA 序列并不天然发生于该宿主细胞中，并且必须已通过转化事件而被引入新宿主细胞中。在该表达盒中多核苷酸序列的表达可以是在组成型启动子或诱导型启动子的控制之下，该启动子只有当该宿主细胞暴露于一些特殊的外界刺激时才引发转录。另外，该启动子对于一种特定的组织或器官或发育阶
35 段也是特异性的。

本发明涵盖了用能够表达一种感兴趣的多核苷酸（即一种单独地或与一种或多种编码赋予所希望的性状的多肽的额外的核酸分子相组合而编码一种本发明所述原卟啉原氧化酶或它的保留了原卟啉原氧化酶活性的变体蛋白的多核苷酸）的表达盒来转化植物。该表达盒在 5' -3' 的转录方向上包括转录和翻译的起始区（即启动子）和多核苷酸开放阅读框。该表达盒可以任选地包括在植物中起作用的转录和翻译终止区（即终止区）。在一些实施方案中，该表达盒包括一种选择标记基因从而允许选择稳定的转化体。本发明的表达构建体还可以包括前导序列和/或允许感兴趣的多核苷酸的诱导型表达的序列。

10 该表达盒的调控序列有效连接到感兴趣的多核苷酸。本发明中所述调控序列包括但不限于启动子、转运肽、终止子、增强子、前导序列、内含子以及其它可操作地连接到编码所述原卟啉原氧化酶基因的调节序列。

所述启动子为植物中可表达的启动子，所述的“植物中可表达的启动子”是指确保与其连接的编码序列在植物细胞内进行表达的启动子。植物中可表达的启动子可为组成型启动子。指导植物内组成型表达的启动子的示例包括但不限于，来源于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子、玉米 Ubi 启动子、水稻 GOS2 基因的启动子等。备选地，植物中可表达的启动子可为组织特异的启动子，即该启动子在植物的一些组织内如在绿色组织中指导编码序列的表达水平高于植物的其他组织（可通过常规 RNA 试验进行测定），如 PEP 羧化酶启动子。20 备选地，植物中可表达的启动子可为创伤诱导启动子。创伤诱导启动子或指导创伤诱导的表达模式的启动子是指当植物经受机械或由昆虫啃食引起的创伤时，启动子调控下的编码序列的表达较正常生长条件下有显著提高。创伤诱导启动子的示例包括但不限于，马铃薯和西红柿的蛋白酶抑制基因（pin I 和 pin II）和玉米蛋白酶抑制基因（MPI）的启动子。

25 所述转运肽（又称分泌信号序列或导向序列）是指导转基因产物到特定的细胞器或细胞区室，对受体蛋白质来说，所述转运肽可以是异源的，例如，利用编码叶绿体转运肽序列靶向叶绿体，或者利用‘KDEL’保留序列靶向内质网，或者利用大麦植物凝集素基因的 CTPP 靶向液泡。

所述前导序列包含但不限于，小 RNA 病毒前导序列，如 EMCV 前导序列（脑心肌炎病毒 5' 非编码区）；马铃薯 Y 病毒组前导序列，如 MDMV（玉米矮缩花叶病毒）前导序列；人类免疫球蛋白重链结合蛋白质（BiP）；苜蓿花叶病毒的外壳蛋白质 mRNA 的不翻译前导序列（AMV RNA4）；烟草花叶病毒（TMV）前导序列。

35 所述增强子包含但不限于，花椰菜花叶病毒（CaMV）增强子、玄参花叶病毒（FMV）增强子、康乃馨风环病毒（CERV）增强子、木薯脉花叶病毒

(CsVMV) 增强子、紫茉莉花叶病毒 (MMV) 增强子、夜香树黄化曲叶病毒 (CmYLCV) 增强子、木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMV)、鸭跖草黄斑驳病毒 (CoYMV) 和花生褪绿线条花叶病毒 (PCLSV) 增强子。

对于单子叶植物应用而言，所述内含子包含但不限于，玉米 hsp70 内含子、玉米泛素内含子、Adh 内含子 1、蔗糖合酶内含子或水稻 Act1 内含子。对于双子叶植物应用而言，所述内含子包含但不限于，CAT-1 内含子、pKANNIBAL 内含子、PIV2 内含子和“超级泛素”内含子。

所述终止子可以为在植物中起作用的适合多聚腺苷酸化信号序列，包括但不限于，来源于农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 胭脂碱合成酶 (NOS) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于蛋白酶抑制剂 II (pin II) 基因的多聚腺苷酸化信号序列、来源于豌豆 ssRUBISCO E9 基因的多聚腺苷酸化信号序列和来源于 α -微管蛋白 (α -tubulin) 基因的多聚腺苷酸化信号序列。

本发明中所述“有效连接”表示核酸序列的联结，所述联结使得一条序列可提供对相连序列来说需要的功能。在本发明中所述“有效连接”可以为将启动子与感兴趣的序列相连，使得该感兴趣的序列的转录受到该启动子控制和调控。当感兴趣的序列编码蛋白并且想要获得该蛋白的表达时“有效连接”表示：启动子与所述序列相连，相连的方式使得得到的转录物高效翻译。如果启动子与编码序列的连接是转录物融合并且想要实现编码的蛋白的表达时，制造这样的连接，使得得到的转录物中第一翻译起始密码子是编码序列的起始密码子。备选地，如果启动子与编码序列的连接是翻译融合并且想要实现编码的蛋白的表达时，制造这样的连接，使得 5' 非翻译序列中含有的第一翻译起始密码子与启动子相联结，并且连接方式使得得到的翻译产物与编码想要的蛋白的翻译开放读码框的关系是符合读码框的。可以“有效连接”的核酸序列包括但不限于：提供基因表达功能的序列（即基因表达元件，例如启动子、5' 非翻译区域、内含子、蛋白编码区域、3' 非翻译区域、聚腺苷酸化位点和/或转录终止子）、提供 DNA 转移和/或整合功能的序列（即 T-DNA 边界序列、位点特异性重组酶识别位点、整合酶识别位点）、提供选择性功能的序列（即抗生素抗性标记物、生物合成基因）、提供可计分标记物功能的序列、体外或体内协助序列操作的序列（即多接头序列、位点特异性重组序列）和提供复制功能的序列（即细菌的复制起点、自主复制序列、着丝粒序列）。

本发明中所述的植物、植物组织或植物细胞的基因组，是指植物、植物组织或植物细胞内的任何遗传物质，且包括细胞核和质体和线粒体基因组。

在本发明中，术语“植物部分”或“植物组织”包括植物细胞、植物原生质体、植物可以由之再生的植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物簇以及

在植物或以下植物的部分中完整的植物细胞，这些植物的部分是如胚、花粉、胚珠、种子、叶、花、枝、果实、核、穗、穗轴、外壳、茎、根、根尖、花药等等。

5 本发明所述 PPO 蛋白可应用于多种植物中，所述双子叶植物包括但不限于苜蓿、菜豆、花椰菜、甘蓝、胡萝卜、芹菜、棉花、黄瓜、茄子、莴苣、甜瓜、豌豆、胡椒、西葫芦、萝卜、油菜、菠菜、大豆、南瓜、番茄、拟南芥、花生或西瓜；优选地，所述双子叶植物是指黄瓜、大豆、拟南芥、烟草、棉花、花生或油菜。所述单子叶植物包括但不限于玉米、水稻、高粱、小麦、大麦、黑麦、粟、甘蔗、燕麦或草坪草；优选地，所述单子叶植物是指玉米、
10 水稻、高粱、小麦、大麦、粟、甘蔗或燕麦。

在本发明中术语“植物转化”是指将一种抗或耐受除草剂的编码本发明所述原卟啉原氧化酶的核酸分子单独地或与编码赋予所希望的性状的多肽的一种或多种额外的核酸分子结合而克隆到一个表达系统中，它就被转化到了一种植物细胞中。本发明的受体和目标表达盒可以以多种公知的方法被引入
15 到植物细胞中。在多核苷酸的背景下，术语“引入”（例如，感兴趣的核苷酸构建体）旨在表示以这样一种方式将多核苷酸提供给该植物，使得该多核苷酸获得对一种植物细胞的内部的接近或实现。其中有待引入一个以上的多核苷酸，这些多核苷酸可以作为单个核苷酸构建体的部分而进行组装，或者作为分开的核苷酸构建体，并且可以位于相同的或不同的转化载体上。因此，或
20 作为育种方案的一部分，例如在植物中的在一个单一的转化事件中、在分开的转化事件中可以将这些多核苷酸引入到感兴趣的宿主细胞中。本发明的这些方法并不取决于一种用于引入一个或多个多核苷酸到植物中的具体方法，仅仅是获得这个或这些多核苷酸对于植物的至少一个细胞的内部的接近或实现。在本领域中已知的用于将一个或多个多核苷酸引入到植物中的方法包括
25 但不限于瞬时转化方法、稳定转化方法、病毒介导的方法或基因组编辑技术。

术语“稳定转化”是指将外源基因导入植物基因组，且稳定地整合进该植物及其任何连续世代的基因组中，导致外源基因稳定遗传。

术语“瞬时转化”是指核酸分子或蛋白质导入植物细胞中，执行功能但不整合进植物基因组中，导致外源基因不能稳定遗传。

30 术语“基因组编辑技术”是指能够对基因组序列进行精确操作，实现基因定点突变、插入、删除等操作的基因组修饰技术。目前基因组编辑技术主要有 HE (homing endonuclease, 归巢核酸内切酶)、ZFN 技术 (Zinc-finger nuclease, 锌指核酸酶)、TALEN 技术 (transcription activator-like effector nuclease, 转录激活样效应因子核酸酶)、CRISPR 技术 (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat, 成簇规律间隔短回文重复)。
35

对本领域技术人员而言，用于植物转化的可获得的众多转化载体是已知的，并且与本发明有关的基因可以与任何上述载体结合使用。载体的选择将取决于优选的转化技术以及用于转化的目标种类。对于某些目标种类，可以优选不同的抗生素或除草剂选择标记。在转化中常规使用的选择标记包括赋予对卡那霉素以及相关抗生素或相关除草剂的抗性的 nptII 基因（此基因被 Bevan 等人于 1983 年发表在《自然科学》第 304 卷 184-187 页）、赋予对除草剂草丁膦（还被称作草铵膦；参见 White 等人于 1990 年发表于《Nucl. Acids Res》第 18 卷 1062 页、Spencer 等人于 1990 年发表于《Theor. Appl. Genet》第 79 卷 625-631 页以及美国专利 5561236 和 5276268）抗性的 pat 和 bar 基因，赋予对抗生素潮霉素的抗性的 hpn 基因（Blochinger & Diggelmann, Mol. Cell Biol. 4:2929-2931）以及赋予对甲氨基蝶呤的抗性的 dnfr 基因（Bourouis 等人 1983 年于《EMBO J.》第 2 卷 1099-1104 页）、赋予对草甘膦的抗性的 EPSPS 基因（美国专利 4940935 和 5188642）、也赋予对草甘膦的抗性的草甘膦 N-乙酰基转移酶(GAT)基因(Castle 等人于 2004 年在《Science》第 304 卷 1151-1154 页；美国申请公开专利 20070004912, 20050246798 和 20050060767 中有描述)以及提供代谢甘露糖的 6-磷酸甘露糖异构酶基因（美国专利 5767378 和 5994629 有描述）。

用于再生植物的方法在本领域也是熟知的。例如，已经利用 Ti 质粒载体用于传送外源 DNA，以及直接 DNA 摄入、脂质体、电穿孔、显微注射以及微弹。

本发明中，所述杂草是指在田地中与耕种的转基因植物竞争的植物。

本发明术语“控制”和/或“防治”是指至少将有效剂量的 PPO 抑制剂除草剂直接施用（例如通过喷雾）到田地中，使杂草发育最小化和/或停止生长。同时，耕种的转基因植物在形态上应是正常的，且可在常规方法下培养以用于产物的消耗和/或生成；优选地，与非转基因的野生型植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量。所述具有减弱的植物损伤，具体表现包括但不限于改善的茎秆抗性、和/或提高的籽粒重量等。所述原卟啉原氧化酶对杂草的“控制”和/或“防治”作用是可以独立存在的，不因其它可“控制”和/或“防治”杂草的物质的存在而减弱和/或消失。具体地，转基因植物（含有编码本发明所述原卟啉原氧化酶的基因）的任何组织同时和/或不同步地，存在和/或产生，所述原卟啉原氧化酶和/或可控制杂草的另一种物质，则所述另一种物质的存在既不影响所述原卟啉原氧化酶对杂草的“控制”和/或“防治”作用，也不能导致所述“控制”和/或“防治”作用完全和/或部分由所述另一种物质实现，而与所述原卟啉原氧化酶无关。

本发明中所述的“植物繁殖体”包括但不限于植物有性繁殖体和植物无性

繁殖体。所述植物有性繁殖体包括但不限于植物种子；所述植物无性繁殖体是指植物体的营养器官或某种特殊组织，其可以在离体条件下产生新植株；所述营养器官或某种特殊组织包括但不限于根、茎和叶，例如：以根为无性繁殖体的植物包括草莓和甘薯等；以茎为无性繁殖体的植物包括甘蔗和马铃薯（块茎）等；以叶为无性繁殖体的植物包括芦荟和秋海棠等。

本发明可赋予植物新除草剂抗性性状，并且未观察到对表型包括产量的不良影响。本发明中植物能耐受住如至少一种受试除草剂 2x、3x 或 4x 一般应用水平。这些耐性水平的提高在本发明的范围之内。例如可对本领域已知的多种技术进行可预见到的优化和进一步发展，以增加给定基因的表达。

本发明提供了一种原卟啉原氧化酶的用途，具有以下优点：

1、对除草剂耐受性广。本发明首次公开了原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 可以对 PPO 抑制剂除草剂表现出较高的耐受性，因此在植物上应用前景广阔。

2、对除草剂耐受性强。本发明所述原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 对 PPO 抑制剂除草剂的耐受性强，其对 4 倍大田浓度的乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺和丙炔氟草胺以及 2 倍大田浓度的甲磺草胺几乎全部表现出高抗的耐受性。

3、对产量影响小。植物对除草剂的耐受性与植物的产量有直接对应关系，高抗植物基本不会受除草剂的影响从而不会影响植物的产量，而中低抗植物的产量相对高抗植物会缩减很多。

下面通过附图和实施例，对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

附图说明

图 1 为本发明含有所述 PPO1A 核苷酸序列的拟南芥重组表达载体 DBN12337 结构示意图；

图 2 为本发明对照重组表达载体 DBN12337N 结构示意图；

图 3 为本发明含有所述 PPO1B 核苷酸序列的玉米重组表达载体 DBN12354 结构示意图；

图 4 为本发明对照重组表达载体 DBN12354N 结构示意图。

具体实施方式

下面通过具体实施例进一步说明本发明原卟啉原氧化酶的用途的技术方案。

第一实施例、转基因拟南芥植株的获得和验证

1、获得编码原卟啉原氧化酶的基因

微生物原卟啉原氧化酶 PPO1、PPO2、PPO3、PPO4、PPO5、PPO6、PPO7、PPO8、PPO9、PPO10、PPO11、PPO12、PPO13 和 PPO14 的氨基酸序列，如

序列表中 SEQ ID NO:1-14 所示, 编码相应于所述原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 的 PPO1-PPO14 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:15-28 所示; 依据拟南芥和大豆共同偏好性密码子获得编码相应于所述原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 的 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:29-42 所示; 依据玉米偏好性密码子获得编码相应于所述原卟啉原氧化酶 PPO1、PPO6 和 PPO12 的 PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:62-64 所示。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 原卟啉原氧化酶 PPO-EC 的氨基酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:43 所示; 编码相应于所述大肠杆菌原卟啉原氧化酶 PPO-EC 的 PPO-EC 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:44 所示; 依据拟南芥和大豆共同偏好性密码子获得编码相应于所述大肠杆菌原卟啉原氧化酶 PPO-EC 的 PPO-ECA 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:45 所示。

拟南芥原卟啉原氧化酶 PPO-AT 的氨基酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:46 所示; 编码相应于所述拟南芥原卟啉原氧化酶 PPO-AT 的 PPO-AT 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:47 所示; 依据拟南芥和大豆共同偏好性密码子获得编码相应于所述拟南芥原卟啉原氧化酶 PPO-AT 的 PPO-ATA 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:48 所示。

烟粉虱共生菌 (*Arsenophonus*) 原卟啉原氧化酶 PPO-AP 的氨基酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:65 所示; 编码相应于所述烟粉虱共生菌原卟啉原氧化酶 PPO-AP 的 PPO-AP 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:66 所示; 依据拟南芥和大豆共同偏好性密码子获得编码相应于所述烟粉虱共生菌原卟啉原氧化酶 PPO-AP 的 PPO-APA 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:67 所示; 依据玉米偏好性密码子获得编码相应于所述烟粉虱共生菌原卟啉原氧化酶 PPO-AP 的 PPO-APB 核苷酸序列, 如序列表中 SEQ ID NO:68 所示。

2、合成上述核苷酸序列

将所述 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和 PPO-APA 核苷酸序列 (SEQ ID NO:29-42、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:48 和 SEQ ID NO:67) 的 5' 和 3' 端分别连接通用接头引物 1:

5' 端通用接头引物 1: 5'-taagaaggagatatacatatg-3' 如序列表中 SEQ ID NO:49 所示;

3' 端通用接头引物 1: 5'-gtggtggtggtggtgctcgag-3' 如序列表中 SEQ ID NO:50 所示。

3、分别构建含有 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和 PPO-APA 核苷酸序列的拟南芥重组表达载体

利用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Asc* I 对植物表达载体 DBNBC-01 进行双酶切

反应，从而对植物表达载体线性化，酶切产物纯化得到线性化的 DBNBC-01 表达载体骨架（载体骨架：pCAMBIA2301（CAMBIA 机构可以提供）），将连接所述通用接头引物 1 的所述 PPO1A 核苷酸序列（SEQ ID NO:29）与所述线性化的 DBNBC-01 表达载体骨架进行重组反应，操作步骤按照 Takara 公司
5 In-Fusion 无缝连接产品试剂盒（Clontech, CA, USA, CAT: 121416）说明书进行，构建成重组表达载体 DBN12337，其结构示意图如图 1 所示（Spec: 壮观霉素基因；RB: 右边界；eFMV: 玄参花叶病毒的 34S 增强子（SEQ ID NO:51）；prBrCBP: 油菜真核延长因子基因 1 α （Tsf1）的启动子（SEQ ID NO:52）；spAtCTP2: 拟南芥叶绿体转运肽（SEQ ID NO:53）；EPSPS: 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因（SEQ ID NO:54）；tPsE9: 豌豆 RbcS 基因的终止子（SEQ ID NO:55）；prAtUbi10: 拟南芥泛素（Ubiquitin）10 基因的启动子（SEQ ID NO:56）；spAtCLP1: 拟南芥白化体或浅绿色体转运肽（SEQ ID NO:57）；PPO1A: PPO1A 核苷酸序列（SEQ ID NO:29）；tNos: 胭脂碱合成酶基因的终止子（SEQ ID NO:58）；pr35S: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子
15 （SEQ ID NO:59）；cPAT: 磷丝菌素 N-乙酰基转移酶基因（SEQ ID NO:60）；t35S: 花椰菜花叶病毒 35S 终止子（SEQ ID NO:61）；LB: 左边界）。

将重组表达载体 DBN12337 用热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞，其热激条件为：50 μ L 大肠杆菌 T1 感受态细胞、10 μ L 质粒 DNA（重组表达载体 DBN12337），42 $^{\circ}$ C 水浴 30 s；37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h（100 rpm 转速下摇床摇动）；
20 然后在含 50 mg/L 壮观霉素（Spectinomycin）的所述 LB 固体平板（胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂 15 g/L，用 NaOH 调 pH 至 7.5）上于温度 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 12 h，挑取白色菌落，在 LB 液体培养基（胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、NaCl 10 g/L、壮观霉素 50 mg/L，用 NaOH 调 pH 至 7.5）中于温度 37 $^{\circ}$ C 条件下培养过夜。碱法提取其质粒：将菌液在 12000
25 rpm 转速下离心 1 min，去上清液，沉淀菌体用 100 μ L 冰预冷的溶液 I（25 mM Tris-HCl、10 mM EDTA（乙二胺四乙酸）、50 mM 葡萄糖，pH8.0）悬浮；加入 200 μ L 新配制的溶液 II（0.2 M NaOH、1% SDS（十二烷基硫酸钠）），将管子颠倒 4 次，混合，置冰上 3-5 min；加入 150 μ L 冰冷的溶液 III（3 M 醋酸钾、5 M 醋酸），立即充分混匀，冰上放置 5-10 min；于温度 4 $^{\circ}$ C、转速
30 12000 rpm 条件下离心 5 min，在上清液中加入 2 倍体积无水乙醇，混匀后室温放置 5 min；于温度 4 $^{\circ}$ C、转速 12000 rpm 条件下离心 5 min，弃上清液，沉淀用浓度（V/V）为 70% 的乙醇洗涤后晾干；加入 30 μ L 含 RNase（20 μ g/mL）的 TE（10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA，pH8.0）溶解沉淀；于温度 37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min，消化 RNA；于温度 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。将提取的质粒进行测序鉴定，
35 结果表明重组表达载体 DBN12337 在 *Spe* I 和 *Asc* I 位点间的核苷酸序列为序

列表中 SEQ ID NO:29 所示的核苷酸序列, 即所述 PPO1A 核苷酸序列。

按照上述构建重组表达载体 DBN12337 的方法, 将分别连接所述通用接头引物 1 的所述 PPO2A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和 PPO-APA 核苷酸序列分别与上述线性化的 DBNBC-01 表达载体骨架进行重组反应, 依次得到重组表达载体 DBN12338 至 DBN12353。测序验证重组表达载体 DBN12338 至 DBN12353 中上述核苷酸序列正确插入。

按照上述构建重组表达载体 DBN12337 的方法, 构建对照重组表达载体 DBN12337N, 其载体结构如图 2 所示 (Spec: 壮观霉素基因; RB: 右边界; eFMV: 玄参花叶病毒的 34S 增强子 (SEQ ID NO:51); prBrCBP: 油菜真核延长因子基因 1 α (Tsf1) 的启动子 (SEQ ID NO:52); spAtCTP2: 拟南芥叶绿体转运肽 (SEQ ID NO:53); EPSPS: 5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因 (SEQ ID NO:54); tPsE9: 豌豆 RbcS 基因的终止子 (SEQ ID NO:55); pr35S: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (SEQ ID NO:59); cPAT: 磷丝菌素 N-乙酰基转移酶基因 (SEQ ID NO:60); t35S: 花椰菜花叶病毒 35S 终止子 (SEQ ID NO:61); LB: 左边界)。

4、拟南芥重组表达载体转化农杆菌

对已经构建正确的重组表达载体 DBN12337 至 DBN12350、DBN12352、DBN12353 和上述对照重组表达载体 DBN12337N 分别用液氮法转化到农杆菌 GV3101 中, 其转化条件为: 100 μ L 农杆菌 GV3101、3 μ L 质粒 DNA (重组表达载体 DBN12337 至 DBN12350、DBN12352、DBN12353、DBN12337N); 置于液氮中 10 min, 37 $^{\circ}$ C 温水浴 10 min; 将转化后的农杆菌 GV3101 接种于 LB 试管中于温度 28 $^{\circ}$ C、转速为 200 rpm 条件下培养 2 h, 涂于含 50 mg/L 的利福平 (Rifampicin) 和 50 mg/L 的壮观霉素的所述 LB 固体平板上直至长出阳性单克隆, 挑取单克隆培养并提取其质粒, 将提取的质粒进行测序鉴定, 结果表明重组表达载体 DBN12337 至 DBN12350、DBN12352、DBN12353、DBN12337N 结构完全正确。

5、转基因拟南芥植株的获得

将野生型拟南芥种子悬浮于 0.1% (w/v) 琼脂糖溶液中。将悬浮的种子在 4 $^{\circ}$ C 下保存 2 天以完成对休眠的需要以保证种子同步萌发。用蛭石混合马粪土并用水地下灌溉至湿润, 使土壤混合物排水 24 h。将预处理后的种子种在土壤混合物上并用保湿罩覆盖 7 天。使种子萌发并在恒温 (22 $^{\circ}$ C) 恒湿 (40-50%) 光强度为 120-150 μ mol/m 2 s $^{-1}$ 的长日照条件 (16 h 光照/8 h 黑暗) 下在温室中培养植物。开始用霍格兰营养液灌溉植物, 接着用去离子水灌溉, 保持土壤潮湿但不湿透。

使用花浸泡法转化拟南芥。用选取的农杆菌菌落接种一份或多份 15-30 mL 含壮观霉素 (50 mg/L) 和利福平 (10 mg/L) 的 LB 培养液的预培养物。以 220 rpm 转速将预培养物在温度 28°C 恒速摇动孵育过夜。每个预培养物用于接种两份 500 ml 含壮观霉素 (50 mg/L) 和利福平 (10 mg/L) 的所述 YEP 培养液的培养物并将培养物在温度 28°C 持续摇动孵育过夜。室温以转速约 4000 rpm 离心 20 min 沉淀细胞, 弃去得到的上清液。将细胞沉淀轻柔重悬于 500 mL 渗透培养基中, 所述渗透培养基含有 1/2×MS 盐/B5 维生素、10% (w/v) 蔗糖、0.044 μM 苜氨基嘌呤 (10 μL/L (1 mg/mL DMSO 中的原液)) 和 300 μL/L Silvet L-77。将约 1 月龄的拟南芥植物在含重悬细胞的渗透培养基中浸泡 5 min, 确保浸没最新的花序。接着将拟南芥植物侧面放倒并覆盖, 黑暗环境下保湿 24 h 后, 在温度 22°C 以 16 h 光照/8 h 黑暗的光周期正常培养拟南芥植物。约 4 周后收获种子。

将新收获的 (PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列和对照载体 DBN12337N) T₁ 种子在室温干燥 7 天。将种子种在 26.5 cm × 51 cm 萌发盘中, 每盘接受 200 mg T₁ 种子 (约 10000 个种子), 所述种子事先已悬浮于蒸馏水中并在温度 4°C 下保存 2 天以完成对休眠的需要以保证种子同步萌发。

用蛭石混合马粪土并用水底部灌溉至湿润, 利用重力排水。用移液管将预处理后的种子均匀地种在土壤混合物上, 并用保湿罩覆盖 4-5 天。在使用出苗后喷洒草铵膦 (选择共转化的 PAT 基因) 进行最初转化体选择的前 1 天移去罩。

在 7 个种植天数后 (DAP) 并于 11 DAP 再次使用 DeVilbiss 压缩空气喷嘴以 10 mL/盘 (703 L/ha) 的喷洒体积用 Liberty 除草剂 (200 g ai/L 的草铵膦) 的 0.2% 溶液喷洒 T₁ 植物 (分别为子叶期和 2-4 叶期), 以提供每次应用 280 g ai/ha 有效量的草铵膦。在最后喷洒后 4-7 天鉴定存活株 (生长活跃的植物), 并分别移植到用马粪土和蛭石制备的 7 cm × 7 cm 的方盆中 (每盘 3-5 棵)。用保湿罩覆盖移植的植物 3-4 天, 并如前置于温度 22°C 培养室中或直接移入温室。接着移去罩并在测试 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列和对照载体提供 PPO 抑制剂除草剂耐受性的能力之前至少 1 天将植物栽种到温室 (温度 22±5°C, 50±30%RH, 14 h 光照:10h 黑暗, 最小 500 μE/m²s⁻¹ 天然+补充光)。

6、转基因拟南芥植株的除草剂耐受性效果检测

首先使用草铵膦除草剂选择已转化的拟南芥 T₁ 植株。分别将转入 PPO1A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO1A)、转入 PPO2A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO2A)、转入 PPO3A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO3A)、

转入 PPO4A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO4A)、转入 PPO5A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO5A)、转入 PPO6A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO6A)、转入 PPO7A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO7A)、转入 PPO8A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO8A)、转入 PPO9A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO9A)、转入 PPO10A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO10A)、转入 PPO11A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO11A)、转入 PPO12A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO12A)、转入 PPO13A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO13A)、转入 PPO14A 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO14A)、转入 PPO-ATA 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO-ATA)、转入 PPO-APA 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株 (PPO-APA)、转入对照载体的拟南芥 T₁ 植株 (对照载体) 和野生型拟南芥植株 (CK) 各 24 株 (播种后 18 天) 分别用 3 种浓度的乙氧氟草醚 (180 g ai/ha (1 倍大田浓度, 1×)、720 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×))、3 种浓度的苯嘧磺草胺 (25 g ai/ha (1 倍大田浓度, 1×)、100 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×))、3 种浓度的丙炔氟草胺 (60 g ai/ha (1 倍大田浓度, 1×)、240 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 和 3 种浓度的甲磺草胺 (450 g ai/ha (1 倍大田浓度, 1×)、900 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 进行喷洒以检测拟南芥的除草剂耐受性。在喷施 7 天 (7 DAT) 后, 根据植株平均损伤百分比等级 (植株平均损伤百分比=叶片损伤面积/叶片总面积×100%) 来评价除草剂对每株植株的损伤程度, 即药害等级: 0 级为生长状况和喷施空白溶剂 (水) 基本一致, 1 级为植株平均损伤百分比小于 10%, 2 级为植株平均损伤百分比大于 10%, 3 级为植株平均损伤百分比为 100%。以植株生长状况划入 0 级和 1 级的为高抗植株, 以植株生长状况划入 2 级的为中低抗植株, 以植株生长状况划入 3 级的为不抗植株。实验结果如表 1-4 所示。

表 1、转入 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列和 PPO-ATA 核苷酸序列的拟南芥 T₁ 植株对乙氧氟草醚的耐受性实验结果

拟南芥基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株数			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	24	0	0	0
	180	0	0	0	24
	720	0	0	0	24
对照载体	0	24	0	0	0
	180	0	0	0	24
	720	0	0	0	24
PPO1A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0

	720	19	5	0	0
PPO2A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO3A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO4A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	22	2	0	0
PPO5A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	22	2	0	0
PPO6A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO7A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO8A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO9A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO10A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO11A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	21	3	0	0
PPO12A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO13A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	18	6	0	0
PPO14A	0	24	0	0	0
	180	24	0	0	0
	720	20	4	0	0
PPO-APA	0	24	0	0	0

	180	0	0	0	24
	720	0	0	0	24
PPO-ATA	0	24	0	0	0
	180	0	0	8	16
	720	0	0	0	24

对于拟南芥，180g ai/ha 乙氧氟草醚除草剂是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 1 的结果表明，对于不同浓度的乙氧氟草醚，相比于对照载体和 CK，PPO1A-PPO14A 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APA 和 PPO-ATA 基本不具有耐受性。

5 表 2、转入 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和对照载体的拟南芥 T₁ 植株对苯嘧磺草胺的耐受性实验结果

拟南芥基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	24	0	0	0
	25	0	0	0	24
	100	0	0	0	24
对照载体	0	24	0	0	0
	25	0	0	0	24
	100	0	0	0	24
PPO1A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	4	20	0	0
PPO2A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	6	18	0	0
PPO3A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	2	22	0	0
PPO4A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	4	20	0	0
PPO5A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO6A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	2	22	0	0
PPO7A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	4	20	0	0

PPO8A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	8	14	2	0
PPO9A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO10A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO11A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO12A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO13A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO14A	0	24	0	0	0
	25	24	0	0	0
	100	0	24	0	0
PPO-APA	0	24	0	0	0
	25	0	0	0	24
	100	0	0	0	24
PPO-ATA	0	24	0	0	0
	25	0	0	0	24
	100	0	0	0	24

对于拟南芥，25 g ai/ha 苯嘧磺草胺除草剂是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 2 的结果表明，相比于对照载体和 CK，

(1) 对于 1 倍大田浓度的苯嘧磺草胺，PPO1A-PPO14A 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APA 和 PPO-ATA 均不具有耐受性；

(2) 对于 4 倍大田浓度的苯嘧磺草胺，PPO1A-PPO7A 和 PPO9A-PPO14A 全部表现出高抗的耐受性（PPO8A 中仅有 2 株表现出中低抗的耐受性，其他 22 株植株全部表现出高抗的耐受性），而 PPO-APA 和 PPO-ATA 均不具有耐受性。

表 3、转入 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和对照载体的拟南芥 T₁ 植株对丙炔氟草胺的耐受性实验结果

拟南芥基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	24	0	0	0

	60	0	0	0	24
	240	0	0	0	24
对照载体	0	24	0	0	0
	60	0	0	0	24
	240	0	0	0	24
PPO1A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	23	1	0	0
PPO2A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0
PPO3A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0
PPO4A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	22	2	0	0
PPO5A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	21	3	0	0
PPO6A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	22	2	0	0
PPO7A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0
PPO8A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	23	1	0	0
PPO9A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0
PPO10A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0
PPO11A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	20	4	0	0
PPO12A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	24	0	0	0

PPO13A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	19	5	0	0
PPO14A	0	24	0	0	0
	60	24	0	0	0
	240	19	5	0	0
PPO-APA	0	24	0	0	0
	60	0	0	0	24
	240	0	0	0	24
PPO-ATA	0	24	0	0	0
	60	0	0	2	22
	240	0	0	0	24

对于拟南芥，60 g ai/ha 丙炔氟草胺除草剂是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 3 的结果表明，对于不同浓度的丙炔氟草胺，相比于对照载体和 CK，PPO1A-PPO14A 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APA 和 PPO-ATA 基本不具有耐受性。

5 表 4、转入 PPO1A-PPO14A 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列、PPO-ATA 核苷酸序列和对照载体的拟南芥 T₁ 植株对甲磺草胺的耐受性实验结果

拟南芥基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	24	0	0	0
	450	0	0	0	24
	900	0	0	0	24
对照载体	0	24	0	0	0
	450	0	0	0	24
	900	0	0	0	24
PPO1A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	20	4	0	0
PPO2A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	20	4	0	0
PPO3A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	20	4	0	0
PPO4A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	18	6	0	0
PPO5A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0

	900	20	4	0	0
PPO6A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	20	4	0	0
PPO7A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	22	2	0	0
PPO8A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	22	2	0	0
PPO9A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	18	6	0	0
PPO10A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	20	4	0	0
PPO11A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	19	5	0	0
PPO12A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	23	1	0	0
PPO13A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	23	1	0	0
PPO14A	0	24	0	0	0
	450	24	0	0	0
	900	19	5	0	0
PPO-APA	0	24	0	0	0
	450	0	0	0	24
	900	0	0	0	24
PPO-ATA	0	24	0	0	0
	450	0	0	0	24
	900	0	0	0	24

对于拟南芥, 450 g ai/ha 甲磺草胺除草剂是将敏感植物与具有平均抗性水平的植物区分开来的有效剂量。表 4 的结果表明, 对于不同浓度的甲磺草胺, 相比于对照载体和 CK, PPO1A-PPO14A 全部表现出高抗的耐受性, 而 PPO-APA 和 PPO-ATA 均不具有耐受性。

5 第二实施例、转基因大豆植株的获得和验证

1、重组表达载体转化农杆菌

将第一实施例 3 中含有所述 PPO1A 核苷酸序列、PPO6A 核苷酸序列、PPO12A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列和 PPO-APA 核苷酸序列的所述重组表达载体 DBN12337、DBN12342、DBN12348、DBN12351 和 DBN12353 以及第一实施例 3 中的对照重组表达载体 DBN12337N 分别用液氮法转化到农杆菌 LBA4404 (Invitrogen, Chicago, USA, CAT: 18313-015) 中, 其转化条件为: 100 μ L 农杆菌 LBA4404、3 μ L 质粒 DNA (重组表达载体); 置于液氮中 10 min, 37 $^{\circ}$ C 温水浴 10 min; 将转化后的农杆菌 LBA4404 接种于 LB 试管中于温度 28 $^{\circ}$ C、转速为 200 rpm 条件下培养 2 h, 涂于含 50 mg/L 的利福平 (Rifampicin) 和 50 mg/L 的壮观霉素的所述 LB 固体平板上直至长出阳性单克隆, 挑取单克隆培养并提取其质粒, 将提取的质粒进行测序鉴定, 结果表明重组表达载体 DBN12337、DBN12342、DBN12348、DBN12351、DBN12353 和对照重组表达载体 DBN12337N 结构完全正确。

2、获得转基因大豆植株

按照常规采用的农杆菌侵染法, 将无菌培养的大豆品种中黄 13 的子叶节组织与本实施例 1 中所述的农杆菌分别进行共培养, 以将本实施例 1 中重组表达载体 DBN12337、DBN12342、DBN12348、DBN12351、DBN12353 和对照重组表达载体 DBN12337N 中的 T-DNA (包括玄参花叶病毒的 34S 增强子序列、油菜真核延长因子基因 1 α (Tsf1) 启动子序列、拟南芥叶绿体转运肽序列、5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因、豌豆 RbcS 基因的终止子序列、拟南芥泛素 (Ubiquitin) 10 基因启动子序列、拟南芥白化体或浅绿色体转运肽、PPO1A 核苷酸序列、PPO6A 核苷酸序列、PPO12A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列、胭脂碱合成酶基因的终止子序列、花椰菜花叶病毒 35S 启动子序列、磷丝菌素 N-乙酰基转移酶基因、花椰菜花叶病毒 35S 终止子序列) 转入到大豆染色体组中, 分别获得了转入 PPO1A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO6A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO12A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-ECA 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-APA 核苷酸序列的大豆植株和转入对照载体 DBN12337N 的大豆植株。

对于农杆菌介导的大豆转化, 简要地, 将成熟的大豆种子在大豆萌发培养基 (B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、蔗糖 20 g/L、琼脂 8 g/L, pH5.6) 中进行萌发, 将种子接种于萌发培养基上, 按以下条件培养: 温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C; 光周期 (光/暗) 为 16/8 h。萌发 4-6 天后取鲜绿的子叶节处膨大的大豆无菌苗, 在子叶节下 3-4 mm 处切去下胚轴, 纵向切开子叶, 去顶芽、侧芽和种子根。用解剖刀的刀背在子叶节处进行创伤, 用农杆菌悬浮液接触创伤过的子叶节组织, 其中农杆菌能够将所述 PPO1A 核苷酸序列、PPO6A 核苷酸序列、PPO12A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列或 PPO-APA 核苷酸序列分别传递至创伤过的

子叶节组织（步骤 1：侵染步骤），在此步骤中，子叶节组织优选地浸入农杆菌悬浮液（ $OD_{660}=0.5-0.8$ ，侵染培养基（MS 盐 2.15 g/L、B5 维他命、蔗糖 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、乙酰丁香酮（AS）40 mg/L、2-吗啉乙磺酸（MES）4 g/L、玉米素（ZT）2 mg/L，pH5.3）中以启动接种。子叶节组织与农杆菌共培养一段时期（3 天）（步骤 2：共培养步骤）。优选地，子叶节组织在侵染步骤后在固体培养基（MS 盐 4.3 g/L、B5 维他命、蔗糖 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、MES 4 g/L、ZT 2 mg/L、琼脂 8g/L，pH5.6）上培养。在此共培养阶段后，可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中，恢复培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、MES 1 g/L、蔗糖 30 g/L、ZT 2 mg/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L、谷氨酸 100 mg/L、天冬氨酸 100 mg/L，pH5.6）中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素（头孢霉素 150-250 mg/L），不添加植物转化体的选择剂（步骤 3：恢复步骤）。优选地，子叶节再生的组织块在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养，以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着，子叶节再生的组织块在含选择剂（草甘膦）的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织（步骤 4：选择步骤）。优选地，子叶节再生的组织块在有选择剂的筛选固体培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、MES 1g/L、蔗糖 30 g/L、6-苄基腺嘌呤（6-BAP）1 mg/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L、谷氨酸 100 mg/L、天冬氨酸 100 mg/L、N-（膦羧甲基）甘氨酸 0.25 mol/L，pH5.6）上培养，导致转化的细胞选择性生长。然后，转化的细胞再生成植物（步骤 5：再生步骤），优选地，在含选择剂的培养基上生长的子叶节再生的组织块在固体培养基（B5 分化培养基和 B5 生根培养基）上培养以再生植物。

筛选得到的抗性组织块转移到所述 B5 分化培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、MES 1 g/L、蔗糖 30 g/L、ZT 1 mg/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L、谷氨酸 50 mg/L、天冬氨酸 50 mg/L、赤霉素 1 mg/L、生长素 1 mg/L、N-（膦羧甲基）甘氨酸 0.25 mol/L，pH5.6）上，25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述 B5 生根培养基（B5 盐 3.1 g/L、B5 维他命、MES 1 g/L、蔗糖 30 g/L、琼脂 8 g/L、头孢霉素 150 mg/L、吲哚-3-丁酸（IBA）1 mg/L），在生根培养上，25℃下培养至约 10 cm 高，移至温室培养至结实。在温室中，每天于 26℃下培养 16 h，再于 20℃下培养 8 h。

30 3、用 TaqMan 验证转基因大豆植株

取分别转入 PPO1A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO6A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO12A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-ECA 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-APA 核苷酸序列的大豆植株和转入对照载体 DBN12337N 的大豆植株的叶片约 100 mg 作为样品，用 Qiagen 的 DNeasy Plant
35 Maxi Kit 提取其基因组 DNA，通过 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法检测 EPSPS

基因拷贝数以确定 PPO 基因的拷贝数。同时以野生型大豆植株作为对照，按照上述方法进行检测分析。实验设 3 次重复，取平均值。

检测 EPSPS 基因拷贝数的具体方法如下：

5 步骤 11、分别取转入 PPO1A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO6A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO12A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-ECA 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-APA 核苷酸序列的大豆植株、转入对照载体 DBN12337N 的大豆植株和野生型大豆植株的叶片各 100 mg，分别在研钵中用液氮研成匀浆，每个样品取 3 个重复；

10 步骤 12、使用 Qiagen 的 DNeasy Plant Mini Kit 提取上述样品的基因组 DNA，具体方法参考其产品说明书；

步骤 13、用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) 测定上述样品的基因组 DNA 浓度；

步骤 14、调整上述样品的基因组 DNA 浓度至同一浓度值，所述浓度值的范围为 80-100 ng/ μ L；

15 步骤 15、采用 Taqman 探针荧光定量 PCR 方法鉴定样品的拷贝数，以经过鉴定已知拷贝数的样品作为标准品，以野生型大豆植株的样品作为对照，每个样品 3 个重复，取其平均值；荧光定量 PCR 引物和探针序列分别是：

以下引物和探针用来检测 EPSPS 基因序列：

引物 1：ctggaaggcgaggacgtcatcaata 如序列表中 SEQ ID NO:69 所示；

20 引物 2：tgcgggcattgccgaaatcgag 如序列表中 SEQ ID NO:70 所示；

探针 1：atgcaggcgatggggcgcccgcacccgta 如序列表中 SEQ ID NO:71 所示；

PCR 反应体系为：

	JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma)	10 μ L
	50 \times 引物/探针混合物	1 μ L
25	基因组 DNA	3 μ L
	水 (ddH ₂ O)	6 μ L

所述 50 \times 引物/探针混合物包含 1 mM 浓度的每种引物各 45 μ L，100 μ M 浓度的探针 50 μ L 和 860 μ L 1 \times TE 缓冲液，并且在 4 $^{\circ}$ C，贮藏在琥珀试管中。

PCR 反应条件为：

30	步骤	温度	时间
	21	95 $^{\circ}$ C	5 min
	22	95 $^{\circ}$ C	30 s
	23	60 $^{\circ}$ C	1 min
	24	回到步骤 22，重复 40 次	

35 利用 SDS2.3 软件 (Applied Biosystems) 分析数据。

通过分析 EPSPS 基因拷贝数的实验结果，进而证实 PPO1A 核苷酸序列、PPO6A 核苷酸序列、PPO12A 核苷酸序列、PPO-ECA 核苷酸序列、PPO-APA 核苷酸序列和对照载体 DBN12337N 均已整合到所检测的大豆植株的染色体组中，而且分别转入 PPO1A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO6A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO12A 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-ECA 核苷酸序列的大豆植株、转入 PPO-APA 核苷酸序列的大豆植株和转入对照载体 DBN12337N 的大豆植株均获得了单拷贝的转基因大豆植株。

4、转基因大豆植株的除草剂耐受性效果检测

取转入 PPO1A 核苷酸序列的大豆植株 (PPO1A)、转入 PPO6A 核苷酸序列的大豆植株 (PPO6A)、转入 PPO12A 核苷酸序列的大豆植株 (PPO12A)、转入 PPO-ECA 核苷酸序列的大豆植株 (PPO-ECA)、转入 PPO-APA 核苷酸序列的大豆植株 (PPO-APA)、转入对照载体大豆植株 (对照载体) 和野生型大豆植株 (CK) 各 16 株 (播种后 18 天)，分别用 3 种浓度的苯嘧磺草胺 (50 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、100 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×))、3 种浓度的乙氧氟草醚 (360 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、720 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 和 3 种浓度的丙炔氟草胺 (120 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、240 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 进行喷洒以检测大豆植株的除草剂耐受性。按照上述第一实施例 6 中的方法，在喷施 7 天 (7 DAT) 后，根据植株平均损伤百分比等级来评价除草剂对每株植株的损伤程度。实验结果如表 5-7 所示。

表 5、转基因大豆植株对苯嘧磺草胺的耐受性实验结果

大豆基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	50	0	0	0	16
	100	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	50	0	0	0	16
	100	0	0	0	16
PPO1A	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0
	100	16	0	0	0
PPO6A	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0
	100	16	0	0	0
PPO12A	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0

	100	16	0	0	0
PPO-ECA	0	16	0	0	0
	50	9	7	0	0
	100	8	3	5	0
PPO-APA	0	16	0	0	0
	50	0	0	8	8
	100	0	0	0	16

表 5 的结果表明, (1) 相比于对照载体和 CK, PPO1A、PPO6A、PPO12A 和 PPO-ECA 均能够对苯嘧磺草胺产生不同程度的耐受性, 而 PPO-APA 对苯嘧磺草胺基本不具有耐受性; (2) 对于 2 倍大田浓度的苯嘧磺草胺, PPO1A、PPO6A 和 PPO12A 的药害等级均为 0 级, 而 PPO-ECA 中约有 44% 植株的药害等级为 1 级; (3) 对于 4 倍大田浓度的苯嘧磺草胺, PPO1A、PPO6A 和 PPO12A 全部表现出高抗的耐受性, 而 PPO-ECA 中约有 31% 植株表现出中低抗的耐受性。

表 6、转基因大豆植株对乙氧氟草醚的耐受性实验结果

大豆基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株数			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	360	0	0	0	16
	720	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	360	0	0	0	16
	720	0	0	0	16
PPO1A	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO6A	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO12A	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO-ECA	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	13	3	0	0
PPO-APA	0	16	0	0	0
	360	0	0	8	8
	720	0	0	0	16

表 6 的结果表明, 相比于对照载体和 CK, (1) 对于 2 倍大田浓度的乙氧氟草醚, PPO1A、PPO6A、PPO12A 和 PPO-ECA 均表现出高抗的耐受性, 而

PPO-APA 中有 50% 植株不具有耐受性；(2) 对于 4 倍大田浓度的乙氧氟草醚，PPO1A、PPO6A、PPO12A 和 PPO-ECA 均表现出高抗的耐受性，而 PPO-APA 不具有耐受性。

表 7、转基因大豆植株对丙炔氟草胺的耐受性实验结果

大豆基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	120	0	0	0	16
	240	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	120	0	0	0	16
	240	0	0	0	16
PPO1A	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO6A	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO12A	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO-ECA	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	15	1	0	0
PPO-APA	0	16	0	0	0
	120	0	0	0	16
	240	0	0	0	16

5 表 7 的结果表明，对于不同浓度的丙炔氟草胺，相比于对照载体和 CK，PPO1A、PPO6A、PPO12A 和 PPO-ECA 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APA 对丙炔氟草胺不具有耐受性。

第三实施例、转基因玉米植株的获得和验证

1、构建含有 PPO 基因的玉米重组表达载体

10 将上述第一实施例 1 中所述 PPO1B 核苷酸序列、PPO6B 核苷酸序列、PPO12B 核苷酸序列和 PPO-APB 核苷酸序列的 5' 和 3' 端分别连接如下通用接头引物 2：

5' 端通用接头引物 2：5'-ccaagcggccaagctta-3'，如序列表中 SEQ ID NO:72 所示；

15 3' 端通用接头引物 2：5'-tgtttgaacgatcggcgcgcc-3'，如序列表中 SEQ ID NO:73 所示。

用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Asc* I 对植物表达载体 DBNBC-02 进行双酶切反应，从而对植物表达载体线性化，酶切产物纯化得到线性化的 DBNBC-02 表达载体骨架（载体骨架：pCAMBIA2301（CAMBIA 机构可以提供）），将连接所述通用接头引物 2 的 PPO1B 核苷酸序列与所述线性化的 DBNBC-02 表达载体骨架进行重组反应，操作步骤按照 Takara 公司 In-Fusion 无缝连接产品试剂盒（Clontech, CA, USA, CAT: 121416）说明书进行，构建成重组表达载体 DBN12354，其载体结构图如图 3 所示（Spec: 壮观霉素基因；RB: 右边界；prOsAct1: 水稻肌动蛋白 1 的启动子（SEQ ID NO:74）；cPAT: 磷丝菌素 N-乙酰基转移酶基因（SEQ ID NO:60）；t35S: 花椰菜花叶病毒 35S 终止子（SEQ ID NO:61）；pr35S-06: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子（SEQ ID NO:75）；iZmHSP70: 玉米热休克 70 kDa 蛋白内含子（SEQ ID NO:76）；spAtCLP1: 拟南芥白化体或浅绿色体转运肽（SEQ ID NO:57）；PPO1B: PPO1B 核苷酸序列（SEQ ID NO:62）；tNos: 胭脂碱合成酶基因的终止子（SEQ ID NO:58）；prZmUbi: 玉米泛素（Ubiquitin）1 基因的启动子（SEQ ID NO:77）；PMI: 磷酸甘露糖异构酶基因（SEQ ID NO:78）；tNos: 胭脂碱合成酶基因的终止子（SEQ ID NO:58）；LB: 左边界）。

按照第一实施例 3 中所述热激方法转化大肠杆菌 T1 感受态细胞并用碱法提取其质粒，将提取的质粒进行测序验证，结果表明重组表达载体 DBN12354 中含有序列 SEQ ID NO:62 所示核苷酸序列，即 PPO1B 核苷酸序列。

按照上述构建重组表达载体 DBN12354 的方法，将连接所述通用接头引物 2 的所述 PPO6B 核苷酸序列、PPO12B 核苷酸序列和 PPO-APB 核苷酸序列分别与所述线性化的 DBNBC-02 表达载体骨架进行重组反应，依次得到重组表达载体 DBN12355 至 DBN12357。测序验证重组表达载体 DBN12355 至 DBN12357 中 PPO6B 核苷酸序列、PPO12B 核苷酸序列和 PPO-APB 核苷酸序列分别正确插入。

按照上述构建重组表达载体 DBN12354 的方法，构建对照重组表达载体 DBN12354N，其载体结构如图 4 所示（Spec: 壮观霉素基因；RB: 右边界；prOsAct1: 水稻肌动蛋白 1 的启动子（SEQ ID NO:74）；cPAT: 磷丝菌素 N-乙酰基转移酶基因（SEQ ID NO:60）；t35S: 花椰菜花叶病毒 35S 终止子（SEQ ID NO:61）；prZmUbi: 玉米泛素（Ubiquitin）1 基因的启动子（SEQ ID NO:77）；PMI: 磷酸甘露糖异构酶基因（SEQ ID NO:78）；tNos: 胭脂碱合成酶基因的终止子（SEQ ID NO:58）；LB: 左边界）。

2、重组表达载体转化农杆菌

对已经构建正确的重组表达载体 DBN12354 至 DBN12357 以及上述对照重组表达载体 DBN12354N 用液氮法转化到农杆菌 LBA4404（Invitrogen，

Chicago, USA, CAT:18313-015)中,其转化条件为:100 μ L 农杆菌 LBA4404、3 μ L 质粒 DNA (重组表达载体);置于液氮中 10 min, 37 $^{\circ}$ C 温水浴 10 min;将转化后的农杆菌 LBA4404 接种于 LB 试管中于温度 28 $^{\circ}$ C、转速为 200 rpm 条件下培养 2 h,涂于含 50 mg/L 的利福平 (Rifampicin) 和 50 mg/L 的壮观霉素的所述 LB 固体平板上直至长出阳性单克隆,挑取单克隆培养并提取其质粒,将提取的质粒进行测序鉴定,结果表明重组表达载体 DBN12354 至 DBN12357 和 DBN12354N 结构完全正确。

3、转基因玉米植株的获得

按照常规采用的农杆菌侵染法,将无菌培养的玉米品种综 31 (Z31) 的幼胚与本实施例 2 中所述的农杆菌共培养,以将本实施例 1 中构建的重组表达载体 DBN12354 至 DBN12357 以及对照重组表达载体 DBN12354N 中的 T-DNA (包括水稻肌动蛋白 1 的启动子序列、膦丝菌素 N-乙酰基转移酶基因、花椰菜花叶病毒 35S 终止子序列、花椰菜花叶病毒 35S 启动子序列、玉米热休克 70 kDa 蛋白内含子序列、拟南芥白化体或浅绿色体转运肽、PPO1B 核苷酸序列、PPO6B 核苷酸序列、PPO12B 核苷酸序列、PPO-APB 核苷酸序列、胭脂碱合成酶基因的终止子序列、玉米泛素 (Ubiquitin) 1 基因的启动子序列、磷酸甘露糖异构酶基因、胭脂碱合成酶基因的终止子序列) 转入到玉米染色体组中,分别获得了转入 PPO1B 核苷酸序列的玉米植株、转入 PPO6B 核苷酸序列的玉米植株、转入 PPO12B 核苷酸序列的玉米植株、转入 PPO-APB 核苷酸序列的玉米植株和转入对照载体 DBN12354N 的玉米植株,同时以野生型玉米植株作为对照。

对于农杆菌介导的玉米转化,简要地,从玉米中分离未成熟的幼胚,用农杆菌悬浮液接触幼胚,其中农杆菌能够将所述 PPO1B 核苷酸序列、PPO6B 核苷酸序列、PPO12B 核苷酸序列或 PPO-APB 核苷酸序列传递至幼胚之一的至少一个细胞 (步骤 1: 侵染步骤)。在此步骤中,幼胚优选地浸入农杆菌悬浮液 ($OD_{660}=0.4-0.6$, 侵染培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 68.5g/L、葡萄糖 36g/L、乙酰丁香酮 (AS) 40mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L, pH5.3)) 中以启动接种。幼胚与农杆菌共培养一段时期 (3 天) (步骤 2: 共培养步骤)。优选地,幼胚在侵染步骤后在固体培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 20g/L、葡萄糖 10g/L、乙酰丁香酮 (AS) 100mg/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L、琼脂 8g/L, pH5.8) 上培养。在此共培养阶段后,可以有一个选择性的“恢复”步骤。在“恢复”步骤中,恢复培养基 (MS 盐 4.3g/L、MS 维他命、干酪素 300mg/L、蔗糖 30g/L、2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 1mg/L、植物凝胶 3g/L, pH5.8) 中至少存在一种已知抑制农杆菌生长的抗生素 (头孢霉素), 不添加植物转化体的选择剂 (步

骤3:恢复步骤)。优选地,幼胚在有抗生素但没有选择剂的固体培养基上培养,以消除农杆菌并为侵染细胞提供恢复期。接着,接种的幼胚在含选择剂(甘露糖)的培养基上培养并选择生长着的转化愈伤组织(步骤4:选择步骤)。优选地,幼胚在有选择剂的筛选固体培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、甘露糖12.5g/L、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)1mg/L、植物凝胶3g/L,pH5.8)上培养,导致转化的细胞选择性生长。然后,愈伤组织再生成植物(步骤5:再生步骤),优选地,在含选择剂的培养基上生长的愈伤组织在固体培养基(MS分化培养基和MS生根培养基)上培养以再生植物。

10 筛选得到的抗性愈伤组织转移到所述MS分化培养基(MS盐4.3g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、6-苄基腺嘌呤2mg/L、甘露糖5g/L、植物凝胶3g/L,pH5.8)上,25℃下培养分化。分化出来的小苗转移到所述MS生根培养基(MS盐2.15g/L、MS维他命、干酪素300mg/L、蔗糖30g/L、吲哚-3-乙酸1mg/L、植物凝胶3g/L,pH5.8)上,25℃下培养至约10cm高,移至温室培养至结实。在温室中,每天于28℃下培养16小时,再于20℃下培养8小时。

4、用TaqMan验证转基因玉米植株

按照第二实施例中3用TaqMan验证转基因大豆植株的方法,对分别转入PPO1B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO6B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO12B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO-APB核苷酸序列的玉米植株和转入对照载体DBN12354N的玉米植株进行检测分析。通过Taqman探针荧光定量PCR方法检测PMI基因拷贝数以确定PPO基因的拷贝数。同时以野生型玉米植株作为对照,按照上述方法进行检测分析。实验设3次重复,取平均值。

25 以下引物和探针用来检测PMI基因序列:

引物3: gctgtaagagcttactgaaaaattaaca 如序列表中SEQ ID NO:79所示;

引物4: cgatctgcaggtcgacgg 如序列表中SEQ ID NO:80所示;

探针2: tctcttgctaagctgggagctcgatcc 如序列表中SEQ ID NO:81所示。

通过分析PMI基因拷贝数的实验结果,进而证实PPO1B核苷酸序列、PPO6B核苷酸序列、PPO12B核苷酸序列、PPO-APB核苷酸序列和对照载体DBN12354N均已整合到所检测的玉米植株的染色体组中,而且分别转入PPO1B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO6B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO12B核苷酸序列的玉米植株、转入PPO-APB核苷酸序列的玉米植株和转入对照载体DBN12354N的玉米植株均获得了单拷贝的转基因玉米植株。

35 5、转基因玉米植株的除草剂耐受性效果检测

取转入 PPO1B 核苷酸序列的玉米植株 (PPO1B)、转入 PPO6B 核苷酸序列的玉米植株 (PPO6B)、转入 PPO12B 核苷酸序列的玉米植株 (PPO12B)、转入 PPO-APB 核苷酸序列的玉米植株 (PPO-APB)、转入对照载体的玉米植株 (对照载体) 和野生型玉米植株 (CK) 各 16 株 (播种后 18 天), 分别用 3 种浓度的苯嘧磺草胺 (50 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、100 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×))、3 种浓度的乙氧氟草醚 (360 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、720 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 和 3 种浓度的丙炔氟草胺 (120 g ai/ha (2 倍大田浓度, 2×)、240 g ai/ha (4 倍大田浓度, 4×) 和 0 g ai/ha (水, 0×)) 进行喷洒以检测玉米植株的除草剂耐受性。按照上述第一实施例 6 中的方法, 在喷施 7 天 (7 DAT) 后, 根据植株平均损伤百分比等级 (植株平均损伤百分比=叶片损伤面积/叶片总面积×100%) 来评价除草剂对每株植株的损伤程度。实验结果如表 8-10 所示。

表 8、转基因玉米植株对苯嘧磺草胺的耐受性实验结果

玉米基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	50	0	0	0	16
	100	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	50	0	0	0	16
	100	0	0	0	16
PPO1B	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0
	100	16	0	0	0
PPO6B	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0
	100	16	0	0	0
PPO12B	0	16	0	0	0
	50	16	0	0	0
	100	16	0	0	0
PPO-APB	0	16	0	0	0
	50	0	0	7	9
	100	0	0	1	15

表 8 的结果表明, 相比于对照载体和 CK, (1) 对于 2 倍大田浓度的苯嘧磺草胺, PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 全部表现出高抗的耐受性, 而 PPO-APB 中约有 56% 植株不具有耐受性; (2) 对于 4 倍大田浓度的苯嘧磺草胺, PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 全部表现出高抗的耐受性, 而 PPO-APB

基本不具有耐受性。

表 9、转基因玉米植株对乙氧氟草醚的耐受性实验结果

玉米基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株数			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	360	0	0	0	16
	720	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	360	0	0	0	16
	720	0	0	0	16
PPO1B	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO6B	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO12B	0	16	0	0	0
	360	16	0	0	0
	720	16	0	0	0
PPO-APB	0	16	0	0	0
	360	0	0	8	8
	720	0	0	0	16

表 9 的结果表明，相比于对照载体和 CK，（1）对于 2 倍大田浓度的乙氧氟草醚，PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APB 中有 50% 植株不具有耐受性；（2）对于 4 倍大田浓度的乙氧氟草醚，PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APB 不具有耐受性。

表 10、转基因玉米植株对丙炔氟草胺的耐受性实验结果

玉米基因型	处理浓度 (g ai/ha)	药害等级/株			
		0 级	1 级	2 级	3 级
CK	0	16	0	0	0
	120	0	0	0	16
	240	0	0	0	16
对照载体	0	16	0	0	0
	120	0	0	0	16
	240	0	0	0	16
PPO1B	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO6B	0	16	0	0	0

	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO12B	0	16	0	0	0
	120	16	0	0	0
	240	16	0	0	0
PPO-APB	0	16	0	0	0
	120	0	0	3	13
	240	0	0	0	16

表 10 的结果表明，对于不同浓度的丙炔氟草胺，相比于对照载体和 CK，PPO1B、PPO6B 和 PPO12B 全部表现出高抗的耐受性，而 PPO-APB 对丙炔氟草胺基本不具有耐受性。

综上所述，就植物而言，本发明所述原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 不仅可以赋予拟南芥对 PPO 抑制剂除草剂较好的耐受性，特别是 PPO1、PPO6 和 PPO12 可以赋予拟南芥、大豆和玉米对 PPO 抑制剂类除草剂较好的耐受性，因此，所述原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 可以赋予植物较好的耐受性；就除草剂而言，本发明首次公开了原卟啉原氧化酶 PPO1-PPO14 可以赋予植物对 PPO 抑制剂除草剂表现出较高的耐受性，至少可以耐受 4 倍大田浓度的乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺和丙炔氟草胺以及 2 倍大田浓度的甲磺草胺，因此在植物上应用前景广阔。

最后所应说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

权 利 要 求 书

1、一种控制杂草的方法，其特征在于，包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

10 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

15 进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

优选地，所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；进一步优选地，所述转基因植物为草甘膦耐受性植物，
20 所述杂草为草甘膦抗性杂草；

优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和
25 /或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

2、根据权利要求 1 所述控制杂草的方法，其特征在于，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

30 (a) 编码与选自由 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

(b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序列。

3、根据权利要求 1 或 2 所述控制杂草的方法，其特征在于，所述转基因植物还包括至少一种不同于编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的编码
35

第二种除草剂耐受性蛋白质的第二种多核苷酸。

4、根据权利要求3所述控制杂草的方法，其特征在于，所述第二种多核苷酸编码选择标记蛋白质、合成活性蛋白质、分解活性蛋白质、抗生物胁迫蛋白质、抗非生物胁迫蛋白质、雄性不育蛋白质、影响植物产量的蛋白质和/或影响植物品质的蛋白质。

5 5、根据权利要求4所述控制杂草的方法，其特征在于，所述第二种多核苷酸编码 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、草甘膦脱羧酶、草铵膦乙酰转移酶、 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶、麦草畏单加氧酶、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶和/或细胞色素类蛋白质。

6、根据权利要求1-5任一项所述控制杂草的方法，其特征在于，所述含有有效剂量PPO抑制剂的除草剂还包括草甘膦除草剂、草铵膦除草剂、植物生长素类除草剂、禾本科除草剂、发芽前选择性除草剂和/或发芽后选择性除草剂。

15 7、一种控制杂草生长的种植组合，其特征在于，包括PPO抑制剂除草剂和至少一种转基因植物，将含有有效剂量的所述PPO抑制剂除草剂施加到存在所述至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自由SEQ ID NO:1-14组成的组的氨基酸序列具有至少88%序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由SEQ ID NO:1-14组成的组的氨基酸序列具有至少90%序列同一性；

25 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由SEQ ID NO:1-14组成的组的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由SEQ ID NO:1-14组成的组的氨基酸序列具有至少99%序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由SEQ ID NO:1-14组成的组的氨基酸序列；

30 优选地，所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；进一步优选地，所述转基因植物为草甘膦耐受性植物，所述杂草为草甘膦抗性杂草；

35 优选地，所述PPO抑制剂除草剂包括二苯醚类PPO抑制剂除草剂、噁二

唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

5 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

8、根据权利要求 7 所述控制杂草生长的种植组合，其特征在于，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

10 (a) 编码与选自由 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

(b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序列。

15 9、根据权利要求 7 或 8 所述控制杂草生长的种植组合，其特征在于，所述转基因植物还包括至少一种不同于编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的编码第二种除草剂耐受性蛋白质的第二种多核苷酸。

10、根据权利要求 9 所述控制杂草生长的种植组合，其特征在于，所述第二种多核苷酸编码选择标记蛋白质、合成活性蛋白质、分解活性蛋白质、抗生物胁迫蛋白质、抗非生物胁迫蛋白质、雄性不育蛋白质、影响植物产量的蛋白质和/或影响植物品质的蛋白质。

20 11、根据权利要求 10 所述控制杂草生长的种植组合，其特征在于，所述第二种多核苷酸编码 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、草甘膦脱羧酶、草铵膦乙酰转移酶、 α 酮戊二酸依赖性双加氧酶、麦草畏单加氧酶、4-羟基苯丙酮酸双加氧酶、乙酰乳酸合酶和/或细胞色素类蛋白质。

25 12、根据权利要求 7-11 任一项所述控制杂草生长的种植组合，其特征在于，所述含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂还包括草甘膦除草剂、草铵膦除草剂、植物生长素类除草剂、禾本科除草剂、发芽前选择性除草剂和/或发芽后选择性除草剂。

30 13、一种产生耐受 PPO 抑制剂除草剂的植物的方法，其特征在于，包括向植物的基因组中引入编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，当含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到至少存在所述植物的田地中，所述植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

35 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基

酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

5 更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

优选地，所述引入的方法包括遗传转化方法、基因组编辑方法或基因突变方法；

10 优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

15 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

20 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

14、一种培养耐受 PPO 抑制剂除草剂植物的方法，其特征在于，包括：

种植至少一个植物繁殖体，所述植物繁殖体的基因组中包括编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

25 使所述植物繁殖体长成植株；

将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到至少包含所述植株的田地中，收获与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植株相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量的植株；

30 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

35 进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自 SEQ ID NO:1-14 组成的组的

氨基酸序列；

优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

5 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和
10 /或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

15 15、一种用于保护植物免受由 PPO 抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性的方法，其特征在于，包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

20 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

25 更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

30 优选地，所述转基因植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述转基因植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

35 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噻二唑类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和

/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

5 16、一种原卟啉原氧化酶在赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性中的用途，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 88% 序列同一性；

优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 90% 序列同一性；

10 优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 95% 序列同一性；

更优选地，所述原卟啉原氧化酶与选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列具有至少 99% 序列同一性；

进一步优选地，所述原卟啉原氧化酶选自由 SEQ ID NO:1-14 组成的组的氨基酸序列；

15 优选地，所述原卟啉原氧化酶在赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性中的用途包括将含有有效剂量 PPO 抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量；

20 优选地，所述植物包括单子叶植物和双子叶植物；更优选地，所述植物为燕麦、小麦、大麦、谷子、玉米、高粱、二穗短柄草、水稻、烟草、向日葵、苜蓿、大豆、鹰嘴豆、花生、甜菜、黄瓜、棉花、油菜、土豆、番茄或拟南芥；

25 优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括二苯醚类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、N-苯基酞酰胺亚胺类 PPO 抑制剂除草剂、噁唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂、苯基吡唑啉类 PPO 抑制剂除草剂、脲嘧啶类 PPO 抑制剂除草剂、噁二唑啉类 PPO 抑制剂除草剂、三唑啉酮类 PPO 抑制剂除草剂和/或三嗪酮类 PPO 抑制剂除草剂；

30 进一步优选地，所述 PPO 抑制剂除草剂包括乙氧氟草醚、苯嘧磺草胺、甲磺草胺和/或丙炔氟草胺。

17、根据权利要求 16 所述原卟啉原氧化酶在赋予植物 PPO 抑制剂除草剂耐受性中的用途，其特征在于，所述原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列具有：

(a) 编码与选自由 SEQ ID NO:1-14 具有至少 88% 序列同一性的氨基酸序列的多核苷酸序列，所述多核苷酸序列不包括 SEQ ID NO:15-28；或

35 (b) SEQ ID NO:29-42 或 SEQ ID NO:62-64 任意一种所示的多核苷酸序列。

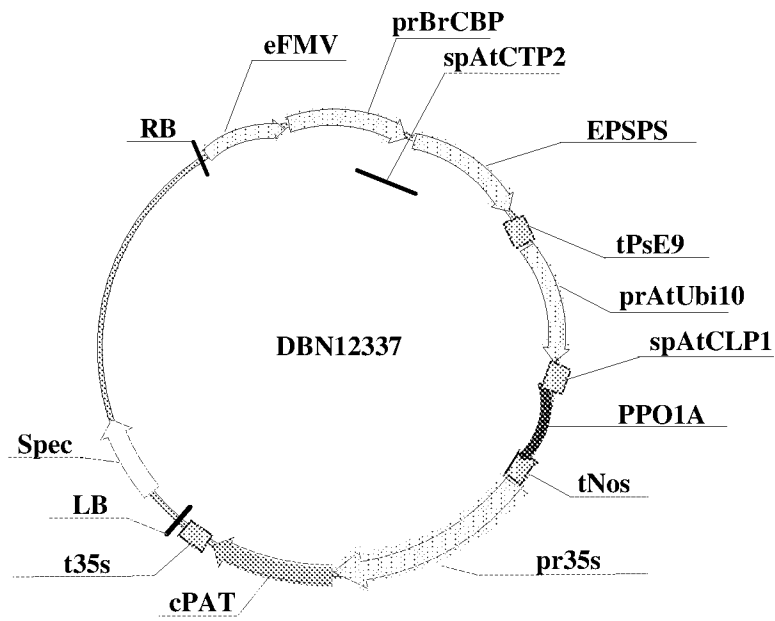


图 1

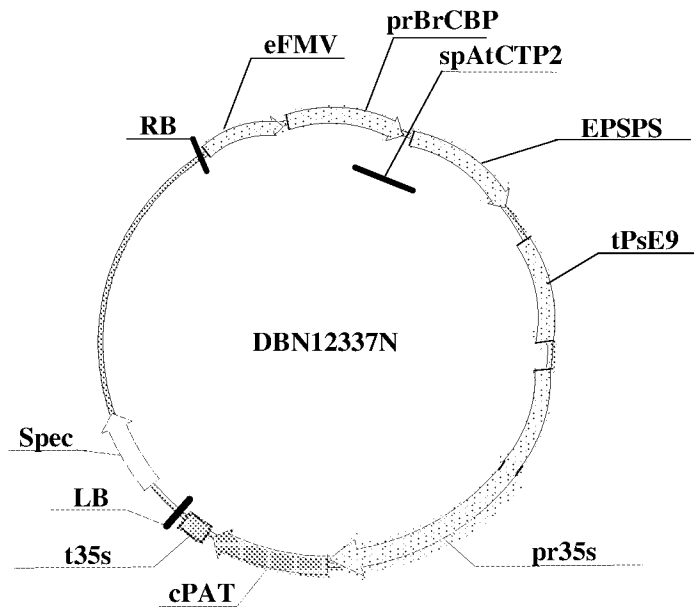


图 2

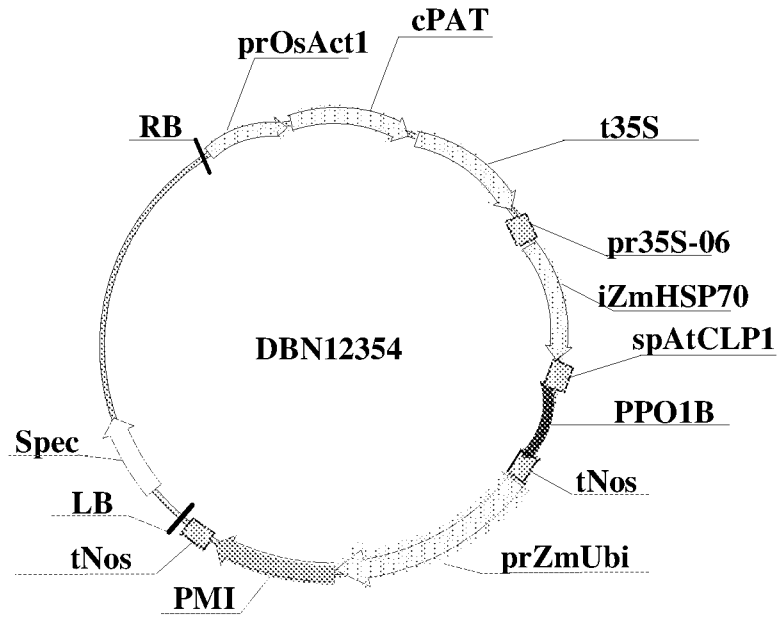


图 3

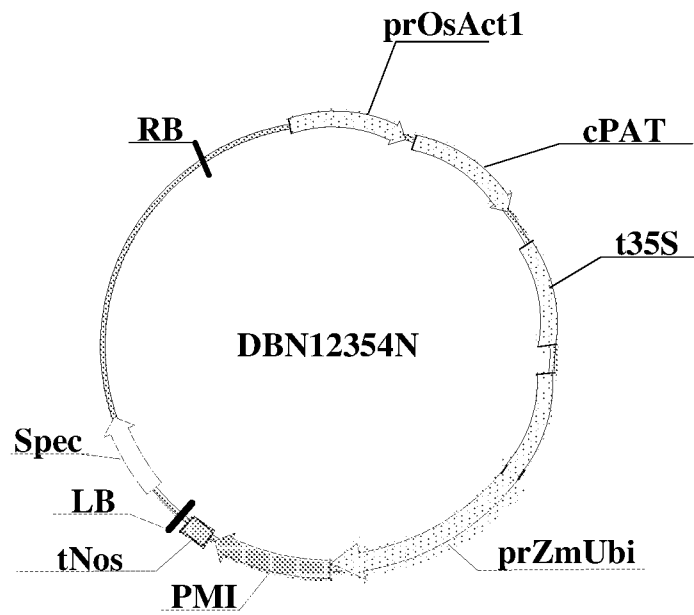


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/089519

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12N 15/82(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C12N; A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS; CNMED; CNTXT; VEN; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; Genbank; NCBI; EMBL; STN; Elsevier; WEB OF SCIENCE; Pubmed; 原卟啉原氧化酶, 除草剂抗性, 除草剂, PPO, protoporphyrinogen oxidase+, herbicide tolerance, herbicide resistant, herbicide resistance, herbicide+, SEQ ID No: 1等		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 111727245 A (FARMHANNONG CO., LTD.) 29 September 2020 (2020-09-29) see claims 18-20, description, paragraph 34, 137, 163, and 166	1-17 (in part)
Y	UniProt Accession number A0A502G7W6, "18 September 2019 (18.09.2019), [Search time 12 July 2022 (12.07.2022)]," <i>Search from UniProt [Online]: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A502G7W6/entry></i> , see entire document, in particular, sequence part	1-17 (in part)
A	CN 1373811 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG) 09 October 2002 (2002-10-09) see claims 1-54	1-17 (in part)
A	CN 111712567 A (FARMHANNONG CO., LTD.) 25 September 2020 (2020-09-25) see claims 1-23	1-17 (in part)
A	US 10674725 B1 (SUMITOMO CHEMICAL CO.) 09 June 2020 (2020-06-09) see claims 1-4, and description, embodiments 1-2	1-17 (in part)
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 July 2022		28 July 2022
Name and mailing address of the ISA/CN		Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	李燕敏等 (LI, Yanmin et al.). "除草剂抗性农作物育种研究进展 (Process of Crop Breeding on Resistance to Herbicides)" <i>作物杂志 (Crops)</i> , No. 2, 05 April 2017 (2017-04-05), see abstract	1-17 (in part)
A	YOON, J. et al. "Characterization of HemY-type Protoporphyrinogen IX Oxidase Genes from Cyanobacteria and Their Functioning in Transgenic Arabidopsis" <i>Plant Molecular Biology</i> , No. 101, 27 December 2019 (2019-12-27), see abstract	1-17 (in part)

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention 1: claims 1-17 (all in part): relating to a method for controlling weeds, comprising applying a herbicide having an effective dosage of a PPO inhibitor to a field in which at least one transgenic plant is present, the transgenic plant comprising, in a genome thereof, a polynucleotide sequence encoding a protoporphyrinogen oxidase, the transgenic plant having reduced plant damage and/or increased plant yield compared with other plants that do not have the polynucleotide sequence encoding the protoporphyrinogen oxidase, wherein the protoporphyrinogen oxidase has at least 88% sequence identity to an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 1; a corresponding planting combination for controlling the growth of weeds; a method for producing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for culturing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for protecting a plant from damage caused by a PPO inhibitor herbicide or conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant; and a corresponding use of a protoporphyrinogen oxidase in conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant.
- [2] Invention 2: claims 1-17 (all in part): relating to a method for controlling weeds, comprising applying a herbicide having an effective dosage of a PPO inhibitor to a field in which at least one transgenic plant is present, the transgenic plant comprising, in a genome thereof, a polynucleotide sequence encoding a protoporphyrinogen oxidase, the transgenic plant having reduced plant damage and/or increased plant yield compared with other plants that do not have the polynucleotide sequence encoding the protoporphyrinogen oxidase, wherein the protoporphyrinogen oxidase has at least 88% sequence identity to an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 2; a corresponding planting combination for controlling the growth of weeds; a method for producing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for culturing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for protecting a plant from damage caused by a PPO inhibitor herbicide or conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant; and a corresponding use of a protoporphyrinogen oxidase in conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant.
- [3] Invention 3: claims 1-17 (all in part): relating to a method for controlling weeds, comprising applying a herbicide having an effective dosage of a PPO inhibitor to a field in which at least one transgenic plant is present, the transgenic plant comprising, in a genome thereof, a polynucleotide sequence encoding a protoporphyrinogen oxidase, the transgenic plant having reduced plant damage and/or increased plant yield compared with other plants that do not have the polynucleotide sequence encoding the protoporphyrinogen oxidase, wherein the protoporphyrinogen oxidase has at least 88% sequence identity to an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO: 3; a corresponding planting combination for controlling the growth of weeds; a method for producing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for culturing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for protecting a plant from damage caused by a PPO inhibitor herbicide or conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant; and a corresponding use of a protoporphyrinogen oxidase in conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant.
- [4] Inventions 4-14: claims 1-17 (all in part): relating to a method for controlling weeds, comprising applying a herbicide having an effective dosage of a PPO inhibitor to a field in which at least one transgenic plant is present, the transgenic plant comprising, in a genome thereof, a polynucleotide sequence encoding a protoporphyrinogen oxidase, the transgenic plant having reduced plant damage and/or increased plant yield compared with other plants that do not have the polynucleotide sequence encoding the protoporphyrinogen oxidase, wherein the protoporphyrinogen oxidase has at least 88% sequence identity to an amino acid sequence selected from a group consisting of SEQ ID NOs: 4-14; a corresponding planting combination for controlling the growth of weeds; a method for producing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for culturing a plant tolerant to a PPO inhibitor herbicide; a method for protecting a plant from damage caused by a PPO inhibitor herbicide or conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant; and a corresponding use of a protoporphyrinogen oxidase in conferring tolerance to a PPO inhibitor herbicide in a plant.
- [5] The same or corresponding technical feature of these fourteen inventions is "applying the herbicide having an effective dosage of the PPO inhibitor to the field in which at least one transgenic plant is present, the transgenic plant comprising, in the genome thereof, the polynucleotide sequence encoding a protoporphyrinogen oxidase, the transgenic plant having reduced plant damage and/or increased plant yield compared with other plants that do not have the polynucleotide sequence encoding the protoporphyrinogen oxidase", and the technical feature is disclosed by the prior art (for example, CN111727245A, published on 29 September 2020, see claims 20-22 and claims 8-11). Therefore, the fourteen inventions do not share a same or corresponding special technical feature that makes a contribution over the prior art, do not belong to a single general inventive concept, and thus do not comply with the requirement of unity of invention, and do not comply with PCT Rule 13.1.

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1-17 (in part)**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/089519

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111727245	A	29 September 2020	AU	2018385129	A1	02 July 2020
				BR	112020011963	A2	24 November 2020
				CA	3085594	A1	20 June 2019
				AR	113642	A1	27 May 2020
				US	2022042033	A1	10 February 2022
				KR	20190072433	A	25 June 2019
				UY	38013	A	28 February 2019
				WO	2019117578	A1	20 June 2019
CN	1373811	A	09 October 2002	WO	0112825	A1	22 February 2001
				EP	1200611	A1	02 May 2002
				CA	2381927	A1	22 February 2001
				JP	2003507019	A	25 February 2003
				AR	024642	A1	16 October 2002
				AU	5536000	A	13 March 2001
CN	111712567	A	25 September 2020	CA	3085361	A1	20 June 2019
				KR	20210029183	A	15 March 2021
				AU	2018385130	A1	02 July 2020
				US	2021269821	A1	02 September 2021
				AR	113956	A1	01 July 2020
				UY	38011	A	28 February 2019
				BR	112020011954	A2	24 November 2020
				WO	2019117579	A2	20 June 2019
				KR	20190072432	A	25 June 2019
US	10674725	B1	09 June 2020	US	2022183289	A1	16 June 2022
				WO	2020188982	A1	24 September 2020
				AU	2020240153	A1	07 October 2021
				CA	3133609	A1	24 September 2020

A. 主题的分类		
C12N 15/82(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; A01H 5/00(2018.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C12N; A01H		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNABS;CNMED; CNTXT; VEN;DWPI;SIPOABS;EPTXT;WOTXT;USTXT;JPTXT;CNKI;中国专利生物序列检索系统;Genbank;NCBI;EMBL;STN;Elsevier;WEB OF SCIENCE; Pubmed和检索项: 原卟啉原氧化酶, 除草剂抗性, 除草剂, PP0, protoporphyrinogen oxidase+, herbicide tolerance, herbicide resistant, herbicide resistance, herbicide+, SEQ ID No: 1等		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 111727245 A (福阿母韩农株式会社) 2020年9月29日 (2020 - 09 - 29) 见权利要求18-20, 说明书第34段、第137段、第163段、第166段	1-17 (部分)
Y	UniProt登录号A0A502G7W6, . "18.09.2019 (18.09.2019), [检索时间12.7月2022 (12.07.2022)], " 检索自UniProt [联机]: <URL: https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A502G7W6/entry >, 见全文, 特别是序列部分	1-17 (部分)
A	CN 1373811 A (辛根塔参与股份公司) 2002年10月9日 (2002 - 10 - 09) 见权利要求1-54	1-17 (部分)
A	CN 111712567 A (福阿母韩农株式会社) 2020年9月25日 (2020 - 09 - 25) 见权利要求1-23	1-17 (部分)
A	US 10674725 B1 (SUMITOMO CHEMICAL CO) 2020年6月9日 (2020 - 06 - 09) 见权利要求1-4, 说明书实施例1-2	1-17 (部分)
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2022年7月13日		2022年7月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		张金丽
传真号 (86-10)62019451		电话号码 010-62411124

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	李燕敏等. “除草剂抗性农作物育种研究进展” 作物杂志, 第2期, 2017年4月5日 (2017 - 04 - 05), 见摘要	1-17 (部分)
A	Joonseon Yoon等. “Characterization of HemY-type protoporphyrinogen IX oxidase genes from cyanobacteria and their functioning in transgenic Arabidopsis” Plant Molecular Biology, 第101期, 2019年12月27日 (2019 - 12 - 27), 见摘要	1-17 (部分)

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST.25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- [1] 发明1：权利要求1-17（均为部分）：涉及一种控制杂草的方法，将含有有效剂量PP0抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自SEQ ID NO:1组成的氨基酸序列具有至少88%序列同一性；相应的控制杂草生长的种植组合、产生耐受PP0抑制剂除草剂的植物的方法、培养耐受PP0抑制剂除草剂植物的方法、用于保护植物免受由PP0抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性的方法、相应的原卟啉原氧化酶在赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性中的用途。
- [2] 发明2：权利要求1-17（均为部分）：涉及一种控制杂草的方法，将含有有效剂量PP0抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自SEQ ID NO:2组成的氨基酸序列具有至少88%序列同一性；相应的控制杂草生长的种植组合、产生耐受PP0抑制剂除草剂的植物的方法、培养耐受PP0抑制剂除草剂植物的方法、用于保护植物免受由PP0抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性的方法、相应的原卟啉原氧化酶在赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性中的用途。
- [3] 发明3：权利要求1-17（均为部分）：涉及一种控制杂草的方法，将含有有效剂量PP0抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与选自SEQ ID NO:3组成的氨基酸序列具有至少88%序列同一性；相应的控制杂草生长的种植组合、产生耐受PP0抑制剂除草剂的植物的方法、培养耐受PP0抑制剂除草剂植物的方法、用于保护植物免受由PP0抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性的方法、相应的原卟啉原氧化酶在赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性中的用途。
- [4] 发明4~14：权利要求1-17（均为部分）：涉及一种控制杂草的方法，将含有有效剂量PP0抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量，其中所述原卟啉原氧化酶与分别选自SEQ ID NO:4~14组成的氨基酸序列具有至少88%序列同一性；相应的控制杂草生长的种植组合、产生耐受PP0抑制剂除草剂的植物的方法、培养耐受PP0抑制剂除草剂植物的方法、用于保护植物免受由PP0抑制剂除草剂引起的损伤或赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性的方法、相应的原卟啉原氧化酶在赋予植物PP0抑制剂除草剂耐受性中的用途。
- [5] 这14项发明的相同或相应的技术特征为“将含有有效剂量PP0抑制剂的除草剂施加到存在至少一种转基因植物的田地中，所述转基因植物在其基因组中包含编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列，所述转基因植物与其他不具有编码原卟啉原氧化酶的多核苷酸序列的植物相比具有减弱的植物损伤和/或具有增加的植物产量”，这一技术特征已经被现有技术公开（例如，CN111727245A，公开日2020年09月29日，参见权利要求20-22，权利要求8-11）。因此，这14项发明不具有相同或相应的体现发明对现有技术作出贡献的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合PCT实施细则 13.1的规定。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 权利要求1-17（部分）

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/089519

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111727245	A	2020年9月29日	AU	2018385129	A1	2020年7月2日
				BR	112020011963	A2	2020年11月24日
				CA	3085594	A1	2019年6月20日
				AR	113642	A1	2020年5月27日
				US	2022042033	A1	2022年2月10日
				KR	20190072433	A	2019年6月25日
				UY	38013	A	2019年2月28日
				WO	2019117578	A1	2019年6月20日
CN	1373811	A	2002年10月9日	WO	0112825	A1	2001年2月22日
				EP	1200611	A1	2002年5月2日
				CA	2381927	A1	2001年2月22日
				JP	2003507019	A	2003年2月25日
				AR	024642	A1	2002年10月16日
				AU	5536000	A	2001年3月13日
CN	111712567	A	2020年9月25日	CA	3085361	A1	2019年6月20日
				KR	20210029183	A	2021年3月15日
				AU	2018385130	A1	2020年7月2日
				US	2021269821	A1	2021年9月2日
				AR	113956	A1	2020年7月1日
				UY	38011	A	2019年2月28日
				BR	112020011954	A2	2020年11月24日
				WO	2019117579	A2	2019年6月20日
				KR	20190072432	A	2019年6月25日
US	10674725	B1	2020年6月9日	US	2022183289	A1	2022年6月16日
				WO	2020188982	A1	2020年9月24日
				AU	2020240153	A1	2021年10月7日
				CA	3133609	A1	2020年9月24日