



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0036233

(51)¹⁹ C12N 9/88; C07K 14/415; C12Q 1/68;
C12N 15/82; A01H 5/00; C12N 15/60

(13) B

(21) 1-2019-04454

(22) 12/04/2018

(86) PCT/CN2018/082758 12/04/2018

(87) WO/2019/024534 07/02/2019

(30) 201710655418.X 03/08/2017 CN; 201711477560.6 29/12/2017 CN

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/10/2020 391A1

(73) JIANGSU ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES (CN)

No.50, Zhongling Street, Xuanwu District, Nanjing, Jiangsu 210014, China

(72) ZHANG, Baolong (CN); WANG, Jinyan (CN); LING, Xitie (CN); CHEN, Tianzi (CN); DENG, Huiqing (CN); WU, Kui (CN).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) PROTEIN ĐỘT BIẾN ALS KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ, AXIT NUCLEIC, GEN MÃ HÓA PROTEIN, CATXET BIỂU HIỆN, VECTƠ TÁI TỔ HỢP HOẶC TẾ BÀO CHỨA AXIT NUCLEIC HOẶC GEN, PHƯƠNG PHÁP THU VÀ NHẬN DẠNG CÂY TRỒNG, VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ DẠI

(57) Sáng chế đề cập đến protein đột biến ALS của lúa cho phép cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, gen mã hóa protein, catxet biểu hiện, vectơ tái tổ hợp hoặc tế bào chứa axit nucleic hoặc gen, phương pháp thu và nhận dạng cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, phương pháp kiểm soát cỏ dại và bảo vệ cây trồng. Protein này có nguồn gốc từ cây lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ kháng ALS, và được so sánh với trình tự ALS trong bộ gen lúa kiểu dại, trình tự protein của protein đột biến tại các vị trí Pro171 và /hoặc Asp350. Theo sáng chế, chứng minh bằng các thí nghiệm phun thuốc diệt cỏ kháng ALS “Imazapic” lên các cánh đồng, cây lúa giai đoạn 3-4 lá có chứa protein ALS có khả năng kháng thuốc diệt cỏ được bộc lộ trong sáng chế vẫn sống, phát triển và hình thành hạt bình thường sau khi được sử dụng với 3,3 mL dung dịch Imazapic/1 L nước (10 lần nồng độ sử dụng được khuyến nghị), trong khi toàn bộ cây lúa kiểu dại giai đoạn 3-4 lá đã chết sau 30 ngày khi sử dụng với 1 ml dung dịch Imazapic/3 L nước (1 lần so với nồng độ sử dụng được khuyến nghị).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực protein cây trồng và cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, và cụ thể là liên quan đến protein đột biến ALS của lúa và gen tạo điều kiện cho cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, và các ứng dụng của chúng, cụ thể hơn, sáng chế liên quan đến protein đột biến tổng hợp axetolactat (ALS) có thể cung cấp cho thực vật, đặc biệt là lúa với đặc tính kháng thuốc diệt cỏ kháng ALS. Sáng chế bộc lộ trình tự protein và các ứng dụng của chúng trong lĩnh vực cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic, gen mã hóa protein, catxet biểu hiện, vector tái tổ hợp hoặc tế bào chứa axit nucleic hoặc gen, phương pháp thu và nhân dạng cây trồng, phương pháp kiểm soát cỏ dại và bảo vệ cây trồng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cỏ dại là yếu tố bất lợi hạn chế năng suất cao và ổn định trong sản xuất nông nghiệp. So với các phương pháp truyền thống dựa vào biện pháp canh tác, làm cỏ thủ công và cơ học thì sử dụng thuốc diệt cỏ hóa học là phương pháp hiệu quả, đơn giản và kinh tế để kiểm soát cỏ dại.

Sinh tổng hợp các axit amin mạch nhánh (valin, leuxin và isoleuxin) trong thực vật và vi sinh vật đòi hỏi phải đồng xúc tác bốn enzym bao gồm tổng hợp axetolactat (ALS), axit ketol reductoisomeraza, dihydroxyavid dehydrataza và chuỗi amino axittransaminaza mạch nhánh. ALS là enzym chính trong giai đoạn đầu của quá trình sinh tổng hợp, xúc tác 2 phân tử axit pyruvic để tạo ra axit axetolactic và cacbon đioxit trong quá trình tổng hợp valin và leuxin, và xúc tác 1 phân tử axit pyruvic và 1 phân tử axit α butanol để tạo ra 2-axetaldehyt-2-hydroxybutyrat và cacbon đioxit trong quá trình tổng hợp isoleuxin. Thuốc diệt cỏ kháng ALS ức chế tổng hợp các axit amin mạch nhánh bằng cách ức chế hoạt động ALS ở thực vật, điều này gây hại cho quá trình tổng hợp protein và cản trở quá trình tổng hợp ADN trong giai đoạn phân chia tế bào, vì vậy quá trình nguyên phân của tế bào thực vật bị dừng lại ở pha S (giai đoạn tổng hợp ADN), giai đoạn G1 và pha M của giai đoạn G2, và quá trình tổng hợp ADN bị can thiệp. Do

đó, các tế bào không thể hoàn thành quá trình nguyên phân và thực vật ngừng phát triển, cuối cùng dẫn đến cái chết của từng cây.

ALS được sử dụng như là đích trong axetolactat synthetaza (ALS) (cũng được biết đến như là axit axetohydroxy synthaza, AHAS; EC 4.1.3.18) chất ức chế thuốc diệt cỏ gây ra cái chết của cỏ dại bao gồm chủ yếu 13 loại hợp chất như sulfonylurea (SU), imidazolinon (IMI), triazolopyrimidin (TP), pyrimidin-5-thio (hoặc oxy) -benzoat (PTB) hoặc pyrimin và sulfonylamino-carbonyltriazolinon (SCT). Tổng hợp axetolactat, tồn tại trong quá trình sinh trưởng của thực vật, có thể xúc tác axit pyruvic thành axit axetolactic với tính đặc hiệu và hiệu quả xúc tác cao, do đó dẫn đến sinh tổng hợp của các axit amin mạch nhánh.

Thuốc diệt cỏ kháng ALS có đặc tính chọn lọc mạnh, phổ kiểm soát cỏ dại rộng, độc tính thấp, hiệu quả cao và hiện nay đã được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, những thuốc diệt cỏ này cũng gây độc tế bào cho cây trồng nói chung không có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, điều này hạn chế rất lớn đến thời gian và không gian sử dụng. Ví dụ, cần phải sử dụng thuốc diệt cỏ một thời gian trước khi trồng cây để tránh nhiễm độc tế bào cho cây trồng. Việc trồng các giống cây kháng thuốc diệt cỏ có thể làm giảm độc tính tế bào của cây trồng và mở rộng phạm vi ứng dụng của thuốc diệt cỏ.

Hiện tại, các vị trí đột biến được biết đến của các chất ức chế kháng ALS của lúa bao gồm Gly 95, Ala 96, Trp 548 và Ser 627. Mức kháng thuốc diệt cỏ của đột biến ALS có liên quan đến vị trí đột biến axit amin ALS, và cũng liên quan đến loại axit amin sau đột biến và số lượng axit amin bị đột biến.

Hiện tại, chưa xác định được cơ chế hoạt động của thuốc diệt cỏ kháng ALS, do đó rất khó dự đoán trước có hay không các đột biến ở các vị trí axit amin khác của protein ALS có thể sản sinh chất kháng thuốc diệt cỏ, và chỉ có thể phát hiện ra vị trí mới kháng thuốc diệt cỏ của protein ALS qua khảo sát và thực nghiệm lâu dài và tích cực của các nhà nghiên cứu và một số may mắn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế: vấn đề kỹ thuật thứ nhất cần được giải quyết bởi sáng chế là đề xuất protein cho phép cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết tiếp theo bởi sáng chế là đề xuất axit nucleic

mã hóa protein và catxet biểu hiện, vector hoặc tế bào.

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết tiếp theo bởi sáng chế là đề xuất phương pháp để thu được cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và ứng dụng của chúng.

Vấn đề kỹ thuật cần được giải quyết nữa bởi sáng chế là đề xuất phương pháp để xác định xem cây trồng thu được bằng phương pháp của sáng chế hay không.

Thông qua các nghiên cứu lâu dài và tích cực, các tác giả đã tiến hành sàng lọc lâu dài và liên tục trên các cây đột biến EMS của lúa kiểu dại là hạt giống lúa indica truyền thống dòng năng suất thấp Hefei, hạt giống lúa indica truyền thống R89, kiểu dại Jiahua No. 1, và tìm thấy một loạt các protein đột biến ALS, bao gồm một số protein đột biến ALS đã biết và các protein đột biến ALS mới được đề cập ở trên, không nhạy cảm với thuốc diệt cỏ kháng ALS, do đó cho phép cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ ALS. Ứng dụng của sáng chế trong nhân giống cây trồng có thể được sử dụng để canh tác cho thực vật có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, đặc biệt là cây trồng, và ứng dụng protein và gen mã hóa protein trong cây chuyển gen hoặc không chuyển gen như lúa và các cây tương tự cũng được phát triển.

Các giải pháp kỹ thuật: để giải quyết các vấn đề kỹ thuật nêu trên, các giải pháp kỹ thuật sau đây được sử dụng trong sáng chế: đề xuất protein đột biến ALS của lúa cho phép cây trồng kháng thuốc diệt cỏ, trình tự axit amin của protein đột biến ALS có bất kỳ một hoặc nhiều đột biến sau: đột biến tương ứng với axit amin thứ 171 và/hoặc axit amin thứ 350 của protein đột biến ALS của lúa.

Protein đột biến ALS của lúa cho phép cây trồng kháng thuốc diệt cỏ bao gồm:

(a) trình tự axit amin được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, hoặc SEQ ID NO: 12; hoặc

(b) protein thu được (a) bằng cách thay thế và/hoặc xóa và/hoặc thêm một hoặc nhiều axit amin vào trình tự axit amin trong (a) và có hoạt tính tổng hợp acetolactat.

Thuốc diệt cỏ là loại thuốc diệt cỏ imidazolinon.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic hoặc gen mã hóa protein.

Axit nucleic hoặc gen mã hóa protein bao gồm:

(a) mã hóa protein;

(b) lai với trình tự nucleotit được xác định trong (a) dưới các điều kiện nghiêm ngặt và mã hóa trình tự nucleotit chứa protein có hoạt tính tổng hợp axetolactat; hoặc

(c) trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 11.

Các điều kiện nghiêm ngặt là các điều kiện lai hóa nghiêm ngặt của việc rửa màng ở 65°C trong 15 phút trong dung dịch 0,1×SSC (saline-sodium citrate: Salin natri xitrat) và 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfat: natri đodecyl sulfat).

Sáng chế cũng đề xuất protein ALS cho phép cây trồng kháng thuốc diệt cỏ, axit amin thứ 171 trong trình tự axit amin được thay đổi từ prolin thành histidin và axit amin thứ 350 được thay đổi từ axit aspartic thành axit glutamic. Hiện tại, không có báo cáo nào cho thấy các vị trí Pro171 và Asp350 của protein ALS của các giống lúa thuộc dòng năng suất thấp Hefei đột biến đồng thời.

Tốt hơn là, protein theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế có chủng đột biến với các vị trí Pro171 và Asp350 bị đột biến đồng thời, ngoài ra để sàng lọc đột biến cây trồng hoặc phương pháp khuếch đại cũng được mô tả trong các phương án của sáng chế, với điều kiện là trình tự protein đã biết, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có khả năng điều chế protein với thay thế, thêm hoặc xóa axit amin còn lại bằng cách thay đổi trình tự gen mã hóa protein đã biết và đưa trình tự gen mã hóa vào vector. Các phương pháp là tất cả các phương pháp thông thường. Trong các phương án thực hiện của sáng chế, trình tự axit amin của protein ALS có khả năng kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 2. Protein được xác định là tổng hợp axetolactat không nhạy cảm với thuốc diệt cỏ imidazolinon.

Sáng chế còn đề xuất axit nucleic hoặc gen mã hóa protein theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế. Theo sáng chế, axit nucleic có thể là ADN hoặc ARN, trong đó ADN được ưu tiên. Dựa trên tiền đề đã biết của trình tự protein hoặc trình tự axit nucleic được mã hóa, thông qua mối quan hệ tương ứng với codon thông thường và tần số biểu hiện của vật chủ, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có khả năng thu được và tối ưu hóa axit nucleic mã hóa protein theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế sử dụng phương pháp phản ứng chuỗi polymeraza (Polymerase Chain Reaction: PCR), ADN tái tổ hợp hoặc tổng hợp nhân tạo. Sau khi thu được axit nucleic, axit nucleic có thể được nhân lên trong vector, biến nạp hoặc chuyển nhiễm vào trong các tế bào tương ứng và

sau đó được tăng sinh qua các tế bào chủ thông thường, từ đó lượng lớn axit nucleic có thể được tách chiết. Tốt hơn là, trình tự nucleotit của axit nucleic ở khía cạnh thứ hai của sáng chế được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1. Cụ thể, trình tự ADN của sáng chế có được bằng cách thay đổi nucleotit thứ 512 của trình tự gen ALS của lúa kiểu đại là hạt giống lúa indica truyền thống dòng năng suất thấp Hefei thay đổi từ nucleotit C sang nucleotit A và thay đổi nucleotit thứ 1050 từ nucleotit T thành nucleotit A.

Ngoài ra, với lúa kiểu đại là hạt giống lúa indica truyền thống dòng năng suất thấp Hefei trước khi đột biến, trình tự nucleotit ALS của dòng năng suất thấp Hefei kiểu đại nhạy cảm với thuốc diệt cỏ kháng ALS được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 3, và axit amin được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 4.

Sáng chế còn đề xuất catxet biểu hiện, vector tái tổ hợp hoặc tế bào có chứa axit nucleic hoặc gen nêu trên.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất các ứng dụng protein ALS với tính kháng thuốc diệt cỏ, axit nucleic hoặc gen và catxet biểu hiện, vector tái tổ hợp hoặc tế bào trong khía cạnh kháng thuốc diệt cỏ của cây trồng.

Cây trồng ở trên bao gồm nhưng không giới hạn ở cây lúa, cây thuốc lá, cây *Arabidopsis thaliana*, cây bông, v.v..

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để thu được cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, phương pháp bao gồm các bước sau đây:

- 1) tạo khả năng cho cây chứa axit nucleic hoặc gen được mô tả trong sáng chế; hoặc
- 2) cho phép cây biểu hiện protein.

Phương pháp nêu trên bao gồm các bước chuyển gen, lai tạo, lai hồi quy hoặc nhân giống sinh dưỡng.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp xác định cây trồng, trong đó cây trồng là cây có chứa axit nucleic, cây trồng biểu hiện protein hoặc cây trồng thu được bằng phương pháp, cụ thể phương pháp bao gồm các bước sau:

- 1) xác định xem cây trồng có chứa axit nucleic hoặc gen hay không; hoặc

2) xác định xem cây trồng có biểu hiện protein hay không.

Sáng chế còn đề xuất protein ALS cho phép cây trồng kháng thuốc diệt cỏ và axit amin thứ 350 trong trình tự axit amin được đột biến từ axit aspartic thành axit glutamic. Trình tự axit amin của protein ALS được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 8. Cụ thể, trình tự ADN theo sáng chế là trình tự gen ALS của giống lúa kiểu đại là hạt giống lúa indica truyền thống R89 có nucleotit thứ 1050 được thay đổi từ nucleotit T thành nucleotit A và trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 7.

Trình tự nucleotit của ALS của lúa kiểu đại là hạt giống lúa indica truyền thống R89 của sáng chế được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 9, và trình tự axit amin được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 10; và

Sáng chế còn đề xuất protein ALS cho phép cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và axit amin thứ 171 trong trình tự axit amin chỉ được thay đổi từ prolin thành leuxin. Trình tự axit amin của protein ALS được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 12. Cụ thể, trình tự ADN theo sáng chế là trình tự gen ALS của lúa kiểu đại với hạt giống lúa japonica truyền thống Jiahua No. 1 có nucleotit thứ 512 được thay đổi từ C thành T và trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11.

Trình tự nucleotit ALS của lúa kiểu đại Jiahua No. 1 của sáng chế được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 13, và trình tự axit amin được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 14.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp kiểm soát cỏ dại, trong đó phương pháp bao gồm việc sử dụng liều thuốc diệt cỏ hiệu quả cho đất trồng, trong đó các loại cây trồng có chứa axit nucleic hoặc gen, hoặc catxet biểu hiện, vector tái tổ hợp hoặc tế bào và thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp bảo vệ cây trồng khỏi thiệt hại do thuốc diệt cỏ gây ra, trong đó phương pháp bao gồm việc sử dụng liều thuốc diệt cỏ hiệu quả cho vùng đất trồng trọt, trong đó cây trồng có chứa axit nucleic hoặc gen hoặc cây trồng được đưa vào catxet biểu hiện hoặc vector tái tổ hợp, và các cây được đưa vào tạo ra protein kháng thuốc diệt cỏ và thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon.

Sáng chế còn đề xuất chất bảo vệ thuốc diệt cỏ chứa protein đột biến ALS.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

So với các kỹ thuật đã có, sáng chế có những ưu điểm sau:

1) Hiệu quả của sáng chế được chứng minh bằng các thí nghiệm phun thuốc diệt cỏ kháng ALS “Imazapic” lên các cánh đồng, cây lúa giai đoạn 3-4 lá chứa protein ALS kháng thuốc diệt cỏ được bộc lộ bởi sáng chế vẫn sinh trưởng, phát triển và hình thành hạt bình thường sau khi phun 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (10 lần nồng độ sử dụng được khuyến nghị), trong khi toàn bộ cây lúa kiểu dại giai đoạn 3-4 lá đã chết sau 30 ngày khi phun 1 ml dung dịch Imazapic/3 L nước (1 lần nồng độ sử dụng được khuyến nghị).

2) Hoạt tính enzym ALS của lúa chuyển gen chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei cao hơn 4,7 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu dại, và hoạt tính enzym ALS của cây thuốc lá thể hệ sau chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei cao hơn 5,2 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu dại.

3) Xác định hoạt tính enzym ALS được thực hiện trên dòng năng suất thấp Hefei đột biến của sáng chế và cây đột biến kháng thuốc diệt cỏ của CGMCC No. 12265 trong đơn patent Trung Quốc số 201610226003.6, và hoạt tính enzym ALS của dòng năng suất thấp Hefei đột biến theo sáng chế được phát hiện cao hơn 18% so với CGMCC No. 12265.

4) Hoạt tính enzym ALS của lúa chuyển gen chứa gen ALS đột biến kháng thuốc diệt cỏ số 2 và số 3 của sáng chế cao hơn 4,96 đến 5,25 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu dại và hoạt tính enzym ALS của cây thuốc lá chuyển gen thể hệ sau chứa gen ALS đột biến kháng thuốc diệt cỏ số 2 và số 3 của sáng chế cao hơn 5,84 đến 6,3 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu dại.

5) Xác định hoạt tính của enzym ALS để thực hiện trên các đột biến kháng thuốc diệt cỏ số 2 và số 3 của sáng chế và cây đột biến kháng thuốc diệt cỏ của CGMCC No. 12265 trong đơn patent Trung Quốc số 201610226003.6, và các hoạt tính enzym ALS của các đột biến số 2 và số 3 theo sáng chế được phát hiện cao hơn 15,7% đến 18,6% so với CGMCC No. 12265.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đột biến lúa kháng bệnh thu được bằng cách sàng lọc với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.2 là kết quả điện di của khuếch đại gen ALS bằng PCR; trong đó A. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử Marker từ trên xuống dưới là 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp và 100 bp, giếng thứ hai là ADN của lúa dòng năng suất thấp Hefei kiểu đại, giếng thứ ba là ADN của đột biến kháng thuốc diệt cỏ và kích thước đoạn đích là 2091 bp; và B. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử của Marker từ trên xuống dưới là 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 750 bp, 500 bp và 250 bp, giếng thứ hai là ADN của lúa kiểu đại R89, giếng thứ ba là ADN của đột biến kháng thuốc diệt cỏ R89, giếng thứ tư là ADN của lúa kiểu đại Jiahua No. 1, giếng thứ năm là ADN đột biến kháng thuốc diệt cỏ Jiahua No. 1 và kích thước đoạn đích là 2091 bp;

Fig.3 minh họa của xác định giá trị độ hấp thụ đối với việc ức chế hoạt động của enzym ALS của kiểu đại và đột biến kháng thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.4 là sơ đồ minh họa xác minh bằng thủy phân bằng hai enzym BamHI/SacI thành vector biểu hiện của gen ALS chứa đột biến kháng thuốc diệt cỏ; trong đó A. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử của Marker từ trên xuống dưới là 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp và 100 bp, giếng thứ hai là vector tái tổ hợp không thủy phân với enzym, giếng thứ ba là các ADN của đoạn gen ALS và đoạn plasmit của dòng năng suất thấp Hefei đột biến được tạo ra bởi vector tái tổ hợp sau khi thủy phân bằng hai enzym BamHI/SacI, kích thước của đoạn gen đáp ứng sự mong đợi, điều này chứng tỏ việc xây dựng thành công các vector; và B. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử Marker từ trên xuống dưới là 15 kb, 8 kb, 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp và 250 bp; giếng thứ hai là vector tái tổ hợp không thủy phân với enzym, giếng thứ ba là các ADN của đoạn gen ALS và đoạn plasmit của đột biến R89 được tạo ra bởi vector tái tổ hợp sau khi thủy phân bằng hai enzym BamHI/SacI, giếng thứ tư là các ADN của đoạn gen ALS và đoạn plasmit của đột biến Jiahua No. 1 được tạo ra bởi vector tái tổ hợp sau quá trình thủy phân bằng hai enzym BamHI/SacI và kích thước của đoạn gen đáp ứng mong đợi, điều này chứng tỏ sự xây dựng thành công vector;

Fig.5 là sơ đồ phát hiện PCR của lúa đột biến gen ALS; trong đó A. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử của Marker từ trên xuống dưới là 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb,

750 bp, 500 bp và 250 bp; giếng thứ hai là ADN của kiểu dại không biến đổi gen, được sử dụng làm đối chứng âm, giếng thứ ba là ADN của plasmit chứa trình tự đột biến ALS dòng năng suất thấp Hefei sử dụng làm mạch khuôn và là đối chứng dương, các giếng thứ tư đến thứ sáu là ADN cây chuyển gen biến đổi gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ; B. giếng thứ nhất là Marker; trọng lượng phân tử của Marker từ trên xuống dưới là 3 kb, 2 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp và 250 bp; giếng thứ hai là ADN của kiểu dại không chuyển gen sử dụng làm đối chứng âm, giếng thứ ba là ADN của plasmit chứa trình tự đột biến ALS R89 sử dụng làm mạch khuôn và là đối chứng dương, giếng thứ tư là ADN của plasmit chứa trình tự đột biến ALS Jiahua No. 1 sử dụng làm mạch khuôn và là đối chứng dương, các giếng thứ năm đến thứ sáu là ADN của cây chuyển gen biến đổi gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ R89; và các giếng thứ bảy đến thứ tám là ADN của cây chuyển gen biến đổi gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ Jiahua No. 1;

Fig.6 là biểu đồ minh họa sự xác định giá trị độ hấp thụ đối với việc ức chế hoạt động enzyme ALS của lúa kiểu dại và lúa chuyển gen chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.7 là biểu đồ minh họa xác định giá trị độ hấp thụ trong việc ức chế hoạt động enzyme ALS của cây thuốc lá kiểu dại và cây thuốc lá chuyển gen có chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.8 minh họa sự xác định giá trị độ hấp thụ trong việc ức chế hoạt động enzyme ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ và CGMCC No. 12265 với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.9 là đột biến lúa kháng thuốc diệt cỏ Jiahua No. 1 thu được bằng cách sàng lọc với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.10 là đột biến lúa kháng thuốc diệt cỏ R89 thu được bằng cách sàng lọc với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.11 là biểu đồ minh họa xác định giá trị độ hấp thụ đối với việc ức chế hoạt động của enzyme ALS của kiểu dại, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.12 là biểu đồ minh họa xác định giá trị độ hấp thụ đối với việc ức chế hoạt động enzyme ALS của lúa kiểu dại, lúa chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ và lúa chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 3 kháng thuốc diệt

cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic;

Fig.13 là biểu đồ minh họa xác định giá trị độ hấp thụ trong việc ức chế hoạt động enzym ALS của cây thuốc lá kiểu dại, cây thuốc lá chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ và cây thuốc lá chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ với thuốc diệt cỏ Imazapic; và

Fig.14 biểu đồ minh họa xác định giá trị độ hấp thụ trong việc ức chế hoạt động enzym ALS của đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ, đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ và CGMCC No. 12265 với thuốc diệt cỏ Imazapic.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án thực hiện của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây, nhưng người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các phương án dưới đây chỉ để minh họa cho sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Nếu không có điều kiện cụ thể được quy định trong phương án, các điều kiện bình thường hoặc các điều kiện được đề xuất bởi nhà sản xuất phải được tuân theo. Thuốc thử hoặc dụng cụ được sử dụng mà không cần quy định của nhà sản xuất là các sản phẩm thông thường có thể được mua trên thị trường.

Phương án thứ nhất: Thu nhận trình tự của lúa dòng năng suất thấp Hefei, Jiahua No. 1 và kiểu dại R89.

Mỗi được thiết kế theo gen ALS của Nipponbar từ Ngân hàng Gen của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (The National Center for Biotechnology Information: NCBI), (NCBI: XM_015770973) để khuếch đại, Takara PrimerSTAR Max ADN Polymeraza polymeraza (mua từ công ty Takara) đã được sử dụng để khuếch đại gen ALS của dòng năng suất thấp Hefei, Jiahua No. 1 và kiểu dại R89 và hệ thống phản ứng của chúng được thực hiện như sau:

PrimerSTAR Max Premix (2×):	10,0 µl
Mồi xuôi (10 µM):	1,0 µl
Mồi ngược (10 µM):	1,0 µl
Bộ gen ADN của lúa (20 đến 30 ng/µL):	1,0 µl
Nước vô trùng được thêm vào để đạt thể tích:	20 µl

Phương pháp hai bước được sử dụng trong quá trình phản ứng khuếch đại PCR, ủ và kéo dài được kết hợp ở 68°C.

Quy trình được thực hiện như sau: trước biến tính ở 98°C trong 3 phút; 35 chu kỳ; biến tính ở 98°C trong 10 giây; kéo dài ở 68°C trong 2 phút; và cô lập ở 72°C trong 10 phút.

Sau đó 2 µl sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa 1% và kích thước đoạn đích được tìm thấy, sản phẩm PCR còn lại được tinh sạch và thu hồi bằng bộ kit tinh sạch PCR (mua từ công ty Axygen), được nhân dòng bằng vectơ pMD19-T (mua từ công ty Takara), và sau đó được biến nạp vào trong vi khuẩn *Escherichia coli*. *Escherichia coli* 12 đơn dòng được chọn ngẫu nhiên trong mỗi khuẩn lạc được biến nạp để thực hiện PCR, và 6 khuẩn lạc đơn dòng được nhân dòng với kết quả PCR dương tính được gửi đến Nanjing Yidao Biotechnology Co., Ltd. để giải trình tự, thu được trình tự gen ALS đột biến và chiều dài đoạn gen là 2091 bp.

Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của kiểu đại giống lúa năng suất thấp Hefei như sau:

```
CTGCATCGCGTGTCTGCCCTTTCGCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
CCACCTTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
CGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGCGGTTCAG
GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGGCCAC
GCCGCTCCGGCCCGTGGGGGACGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCC
TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGACGTGTTGCCTACCCG
GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCAT
CACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCG
GGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCC
CCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCG
TCCCGATGGTCGCCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCG
ACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTACCCGCTCCATCACCAAG
CACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGGAA
GCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCGGTGCTGGTCGACATCC
CCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATG
```

AATCTACCGGGGTACATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATT
 GCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTA
 TGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGA
 GCTGACCGGCATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCC
 CAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTA
 CGCAAATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCAATTTGGCGTGCG
 GTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCA
 AGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAA
 CCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAAT
 GCTCTGCTAGACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGG
 CACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGAC
 TTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCT
 GACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGACAGCACCAGATGT
 GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCG
 GCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCT
 GTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTG
 AAGGTGATGGTGTGTAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGA
 GGATAGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCAG
 AATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCA
 ATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCA
 AGAAGATGCTCGAGACCCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCAC
 ACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGAC
 ATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTATGTATTAATCTATAATCTGTATG
 TTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAGA
 GAAGGGCGACACGCGATGCAG

Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của kiểu đại R89 như sau:

CTGCATCGCGTGTGCGCCCTTTCGCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
 GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
 CCACCTTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
 CGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGGCGGTCAG
 GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCAC

GCCGCTCCGGCCGTGGGGGACGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCC
 TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGACGTGTTGCCTACCCG
 GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCAT
 CACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGGCGTCCG
 GGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCC
 CCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCG
 TCCCGATGGTCGCCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCG
 ACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAG
 CACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGGAA
 GCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCCGGTGCTGGTCGACATCC
 CCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATG
 AATCTACCGGGGTACATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATT
 GCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTA
 TGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTGA
 GCTGACCGGCATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCC
 CAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTA
 CGCAAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGCG
 GTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCA
 AGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAA
 CCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAAT
 GCTCTGCTAGACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGG
 CACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGAC
 TTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCT
 GACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGACAGCACCAGATGT
 GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCG
 GCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCT
 GTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTG
 AAGGTGATGGTGTTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGA
 GGATAGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCAG
 AATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCA
 ATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCA

AGAAGATGCTCGAGACCCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCAC
 ACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGAC
 ATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTATGTATTAATCTATAATCTGTATG
 TTGGCAAAGCACCCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAGA
 GAAGGGCGACACGCGATGCAG

Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của kiểu đại Jiahua No. 1 như sau:

CTGCATCGCGTGTGCGCCCTTTCGCCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
 GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
 CCGCCCTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
 CGACACCACGTCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGCGGTTCAG
 GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCAC
 GCCGCTCCGGCCGTGGGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCC
 TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGACGTGTTGCCTACCCG
 GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCAT
 CACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGCGTCCG
 GGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCC
 CCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCG
 TCCCGATGGTCGCCATCACGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCG
 ACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAAG
 CACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGGAA
 GCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCCGGTGCTGGTTCGACATCC
 CCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTCGATG
 AATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATT
 GCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTA
 TGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGTGTA
 GCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCC
 CAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTA
 CGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTGGTGTGCG
 GTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCA
 AGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGCAA
 CCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAAT
 GCTCTGCTACAACAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGCATGG

CACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAAAC
 TTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTGAGGTGCTGGATGAGCT
 GACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT
 GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCG
 GCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCT
 GTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCTGTG
 AAGGTGATGGTGTGGAACAACCAACATTTGGGTATGGTGGTGCAATGGGA
 GGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCGG
 AATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCA
 ATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCA
 AGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGC
 ACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGAC
 ATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTATG
 TTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAGA
 GAAGGGCGACACGCGATGCAG

Phương án thứ hai: quá trình thu nhận lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ imidazolinon (Imazapic).

1. 150 kg hạt giống lúa indica truyền thống của dòng năng suất thấp Hefei (Hua K01S được cung cấp bởi Anhui Huakai Agricultural Science and Technology Co., Ltd.) (M0, được ngâm trong nước sạch trong 2 giờ) được ngâm trong 0,5% đến 1,0% trọng lượng (w/w) etyl metanesulfonat (EMS) trong 6 giờ đến 9 giờ ở nhiệt độ phòng trong 6 lần và hạt giống được lắc mỗi giờ một lần; dung dịch EMS được loại bỏ, hạt giống được ngâm với nước máy 5 lần, mỗi lần ngâm trong 5 phút, sau đó hạt giống được rửa qua đêm bằng nước máy, hạt giống được gieo trên cánh đồng vào ngày hôm sau sử dụng phân bón thông thường và quản lý nước (M1). Sau khi cây trưởng thành, hạt thu hoạch được trộn lẫn, sấy khô và lưu trữ cho mùa đông. Những hạt giống đã được gieo trên cánh đồng vào năm sau. Khi cây lúa (M2) giai đoạn 3-4 lá được phun với 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (“Imazapic” là thuốc diệt cỏ imidazolinon dạng nước được sản xuất bởi Công ty BASF của Đức, với nồng độ tối thiểu được khuyến nghị là 1 ml Imazapic/1,5 L đến 3 L nước), và sau 30 ngày phun, những cây có màu xanh lá cây bình thường là những đột biến lúa kháng thuốc diệt cỏ imidazolinon (như thể hiện trên Fig.1).

Tổng số 128 cây đơn lẻ M2 kháng thuốc diệt cỏ đã được thu, thực hiện quản lý nước và phân bón thông thường cho các cây đơn lẻ kháng thuốc diệt cỏ, 101 cây đơn lẻ kháng thuốc diệt cỏ M2 có thể ra hạt bình thường, và sau khi hạt trưởng thành, hạt của cây đơn lẻ kháng thuốc được thu hoạch, sấy khô và lưu trữ cho mùa đông.

2. 150 kg hạt giống lúa indica truyền thống của R89 (được cung cấp bởi Anhui Royee Seed Co., Ltd.) và hạt giống lúa indica truyền thống của Jiahua No. 1 (được cung cấp bởi Ngân hàng bảo tồn và sử dụng giống cây trồng tỉnh Giang Tô- Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm) (M0, được ngâm trong nước sạch trong 2 giờ) được ngâm trong 0,5% đến 1,0% (w/w) etyl metanesulfonat (EMS) trong 6 giờ đến 9 giờ ở nhiệt độ phòng trong 6 lần và hạt giống được lắc mỗi 1 giờ 1 lần; dung dịch EMS được loại bỏ, hạt giống được ngâm với nước máy 5 lần, mỗi lần trong 5 phút, sau đó hạt được rửa qua đệm bằng nước máy, hạt giống được gieo trên cánh đồng vào ngày hôm sau và thực hiện quản lý nước (M1) và phân bón thông thường. Sau khi cây trưởng thành, hạt giống được thu hoạch trộn lẫn, được sấy khô và được lưu trữ cho mùa đông. Những hạt giống đã được gieo trên cánh đồng vào năm sau. Khi cây lúa (M2) ở giai đoạn 3-4 lá được phun với 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (“Imazapic” là thuốc diệt cỏ imidazolinon dạng nước được sản xuất bởi Công ty BASF của Đức, với nồng độ tối thiểu được khuyến nghị là 1 mL dung dịch Imazapic/1,5 L đến 3 L nước), và sau 30 ngày phun, cây có màu xanh lá cây bình thường là lúa đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ imidazolinon (như thể hiện trên Fig.9 và Fig.10). Sau khi hạt giống của lúa đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ đã trưởng thành, hạt của các cây đơn lẻ kháng thuốc diệt cỏ được thu hoạch, sấy khô và bảo quản cho mùa đông.

Phương án thứ ba: phân tích vị trí đột biến của đột biến gen lúa kháng thuốc diệt cỏ.

Lá của cây lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ thu được trong phương án thứ hai nêu trên đã được lấy, và bộ gen ADN được tách chiết và gửi đến Nanjing Yidao Biotechnology Co., Ltd. để giải trình tự bộ gen. Kết quả giải trình tự được so sánh với gen ALS của dòng năng suất thấp Hefei kiểu đại, đột biến lúa kháng thuốc diệt cỏ được phát hiện có đột biến ở hai vị trí trên gen ALS, các nhóm bazơ thứ 512 và thứ 1050 đã bị đột biến, được thay đổi từ C thành A, và T thành A, tương ứng, do đó dẫn đến vị trí thứ 171 và vị trí thứ 350 của trình tự axit amin mã hóa tương ứng được thay đổi từ prolin thành histidin và asparagin thành axit glutamic, tức là, trình tự nucleotit của gen ALS

đột biến kháng thuốc diệt cỏ đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, và mã hóa trình tự axit amin mã hóa của protein ALS đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 2.

Lá của đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ thu được trong phương án thứ hai ở trên đã được lấy, bộ gen ADN được tách chiết và gửi đến Nanjing Yidao Biotechnology Co., Ltd. để giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh với gen ALS của hạt giống lúa indica truyền thống R89 kiểu dại, đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ được phát hiện là chỉ có đột biến tại một vị trí trên gen ALS, nhóm bazơ thứ 1050 bị đột biến, thay đổi từ T thành A, do đó dẫn đến vị trí thứ 350 của trình tự axit amin mã hóa tương ứng được thay đổi từ asparagin thành axit glutamic, tức là, trình tự nucleotit của gen ALS đột biến kháng thuốc diệt cỏ số 2 đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 7, và trình tự axit amin mã hóa của protein ALS đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 8.

Lá của đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ thu được trong phương án thứ hai đã được chọn, bộ gen ADN được tách chiết và gửi đến Nanjing Yidao Biotechnology Co., Ltd. để giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh với gen ALS của lúa kiểu truyền thống Jiahua No. 1 kiểu dại, lúa đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ được phát hiện chỉ có đột biến tại một vị trí trên gen ALS, nhóm bazơ thứ 512 đã bị đột biến, được thay đổi từ C thành T, do đó dẫn đến vị trí thứ 171 của trình tự axit amin mã hóa tương ứng được thay đổi từ prolin thành leuxin, tức là, trình tự nucleotit của gen ALS đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 11, và trình tự axit amin mã hóa của protein ALS đã được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 12.

Giống lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ theo sáng chế được phân loại và đặt tên là hạt giống lúa HF-407 (*Oryza sativa Indica* nhóm HF-407) và chủng này đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (CCTCC) vào ngày 02 tháng 6 năm 2017 và tại trung tâm sưu tập Đại học Vũ Hán (đối diện với trường tiểu học Vũ Hán), huyện Vũ Xương, thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, mã bưu điện: 430072 và số lưu chủng tại CCTCC: P201714.

Giống lúa đột biến số 2 kháng thuốc diệt cỏ R89 của sáng chế được phân loại và đặt tên là hạt giống lúa R28 (*Oryza sativa Indica* nhóm R28), và nguyên liệu này đã

được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (CCTCC) vào ngày 30 tháng 7 năm 2017, tại Trung tâm sưu tập Đại học Vũ Hán (đối diện với trường tiểu học là chi nhánh liên kết thứ nhất của Đại học Vũ Hán), huyện Vũ Xương, thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, mã bưu điện: 430072 và số lưu chủng tại CCTCC: P201718.

Giống lúa đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ Jiahua No. 1 của sáng chế được phân loại và đặt tên là hạt giống lúa JH10 (*Oryza sativa Japonica* nhóm JH10), và nguyên liệu này đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (CCTCC) vào ngày 30 tháng 7 năm 2017, tại Trung tâm sưu tập của Đại học Vũ Hán (đối diện Trường tiểu học là chi nhánh liên kết thứ nhất của Đại học Vũ Hán), huyện Vũ Xương, thành phố Vũ Hán, tỉnh Hồ Bắc, mã bưu điện: 430072 và số lưu chủng tại CCTCC: P201720.

Phương án thứ tư: nhân bản gen ALS của cây lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ imidazolinon

Bộ gen ADN tương ứng được tách chiết từ lúa đột biến kháng thuốc diệt cỏ, lúa đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ ở trên. Theo trình tự gen ALS của dòng năng suất thấp Hefei kiểu dại, gen ALS của lúa indica truyền thống R89 kiểu dại và gen ALS của lúa japonica truyền thống kiểu Jiahua No. 1 kiểu dại, các đoạn môi đặc hiệu để khuếch đại toàn bộ chiều dài của gen ALS được thiết kế như sau: môi xuôi F 5'-TCGCCCAAACCCAGAAACCC-3' và môi ngược R 5'-CTCTTTATGGGTCATTCAGGTC-3'.

Takara Primer Star Max ADN Polymeraza polymeraza (được cung cấp bởi công ty Takara) đã được sử dụng để khuếch đại gen ALS tương ứng và hệ thống phản ứng PCR được thực hiện như sau:

PrimerSTAR Max Premix (2×):	10,0 µl
Môi xuôi (10 µM):	1,0 µl
Môi ngược (10 µM):	1,0 µl
Bộ gen ADN của lúa (20 đến 30 ng/µL):	1,0 µl
Nước vô trùng được thêm vào để đạt thể tích:	20 µl.

Phương pháp hai bước được sử dụng trong quá trình phản ứng khuếch đại PCR, ủ và kéo dài được kết hợp ở 68°C.

Quy trình PCR được thực hiện như sau: trước biến tính ở 98°C trong 3 phút; 35 chu kỳ bao gồm biến tính ở 98°C trong 10 giây; kéo dài ở 68°C trong 2 phút; và cô lập ở 72°C trong 10 phút.

Sau đó, 2 µl của sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarosa 1% và kích thước đoạn đích được tìm thấy (như thể hiện trên Fig.2A và Fig.2B), sản phẩm PCR còn lại được tinh sạch và thu hồi bằng bộ kit tinh sạch PCR (mua từ công ty Axygen), được nhân dòng bằng vectơ pMD19-T (mua từ công ty Takara) sau đó được biến nạp vào trong vi khuẩn *Escherichia coli*. *Escherichia coli* 12 đơn dòng được chọn ngẫu nhiên trong mỗi các thể được biến nạp để thực hiện PCR, và 6 đơn dòng được nhân dòng với kết quả PCR dương tính được gửi đến Nanjing Yidao Biotechnology Co., Ltd. để giải trình tự, thu được trình tự gen ALS đột biến và chiều dài đoạn gen là 2091 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của đột biến lúa số 1 dòng năng suất thấp Hefei kháng thuốc diệt cỏ như sau:

```
CTGCATCGCGTGTGCGCCCTTTCGCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
CCACCTTGTCGCGCCGCGGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
CGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGCGGTTCAG
GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGCCAC
GCCGCTCCGGCCGTGGGGGACGGCCGAGCCCCGCAAGGGCGCGGACATCC
TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGACGTGTTTCGCCTACCCG
GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCAT
CACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTTCGCGGCGTCCG
GGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCC
CCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCG
TCCCGATGGTCGCCATCACGGGCCAGGTCCACCGCCGCATGATCGGCACC
GACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAA
GCACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGGA
AGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCCGGTGCTGGTCGACAT
CCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGA
TGAATCTACCGGGGTACATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAA
TTGCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTC
TATGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGT
```

GAGCTGACCGGCATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTC
 CCCAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTG
 TACGCAAATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTG
 CGGTTTGATGAACGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGC
 CAAGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGC
 AACCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGA
 ATGCTCTGCTAGACCAGAGCACAAACAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGAT
 GGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAG
 ACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAG
 CTGACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGACAGCACCAGAT
 GTGGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTC
 GGCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTC
 TGTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTT
 CCTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGT
 GAAGGTGATGGTGTTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGG
 AGGATAGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCA
 GAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTC
 AATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATC
 AAGAAGATGCTCGAGACCCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCA
 CACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGA
 CATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTATGTATTAATCTATAATCTGTAT
 GTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAG
 AGAAGGGCGACACGCGATGCAG

Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của đột biến lúa số 2 kháng thuốc diệt cỏ R89 như sau:

CTGCATCGCGTGTGCGCCCTTTCGCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
 GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
 CCACCTTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
 CGACACCACGTCCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGCGGTGAG
 GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCACCCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGGCCAC
 GCCGCTCCGGCCGTGGGGGACGGCCGAGCCCCGCAAGGGGCGCGGACATCC
 TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGTCAGCGACGTGTTGCTTACCCG

GGCGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTCAT
 CACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTTCGCGGCGTCCG
 GGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCGGCC
 CCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACTCCG
 TCCCGATGGTCGCCATCACGGGGCCAGGTCCCCCGCCGCATGATCGGCACCG
 ACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTACCCCGCTCCATCACCAAG
 CACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGGAA
 GCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCCGGTGCTGGTTCGACATCC
 CCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCTGTGCCAGTCTGGGACACCTCGATG
 AATCTACCGGGGTACATTGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGAATT
 GCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCTCTA
 TGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGATGAATTGCGCCGGTTTGTTGA
 GCTGACCGGCATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTTCCC
 CAGTGATGATCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTGTA
 CGCAAATTATGCGGTGGATAAAGGCTGACCTGTTGCTTGCATTTGGCGTGCG
 GTTTGATGAACGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGCCA
 AGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCGGAGATTGGAAAGAACAAGCAA
 CCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAAT
 GCTCTGCTAGACCAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGATGG
 CACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAGAC
 TTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCTATTCAGGTGCTGGATGAGCT
 GACGAAAGGGGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTTGGACAGCACCAGATGT
 GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTCG
 GCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTCT
 GTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTTC
 CTCATGAACATTCAGGAGTTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCGGTG
 AAGGTGATGGTGTGTAACAACCAACATTTGGGTATGGTTGTGCAATGGGA
 GGATAGGTTTTACAAGGCAAATAGGGCGCATACTTGGGCAACCCAG
 AATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAAGGGTTCA
 ATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCA
 AGAAGATGCTCGAGACCCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCAC
 ACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGAC

ATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTATGTATTAATCTATAATCTGTATG
 TTGGCAAAGCACCAGCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAGA
 GAAGGGCGACACGCGATGCAG

Kết quả giải trình tự đoạn gen ALS của lúa đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ dòng
 Jiahua No. 1 như sau:

CTGCATCGCGTGTGCGCCCTTTCGCCCAAACCCAGAAACCCTCGCCGCC
 GCCGCCGCCGCCATCACCCACCATGGCTACGACCGCCGCGGCCGCGGCCG
 CCGCCCTGTCCGCCGCCGCGACGGCCAAGACCGGCCGTAAGAACCACCAG
 CGACACCACGTCTTCCCGCTCGAGGCCGGGTGGGGGCGGCGGGCGGTGAG
 GTGCTCGGCGGTGTCCCCGGTCAACCCGCCGTCCCCGGCGCCGCCGGCCAC
 GCCGCTCCGGCCGTGGGGGCCGGCCGAGCCCCGCAAGGGGCGCGGACATCC
 TCGTGGAGGCGCTGGAGCGGTGCGGCGtrướcCAGCGACGTGTTCGCCTACC
 CGGGCGGGCGCGTCCATGGAGATCCACCAGGCGCTGACGCGCTCCCCGGTC
 ATCACCAACCACCTCTTCCGCCACGAGCAGGGCGAGGCGTTCGCGGGCGTC
 CGGGTACGCGCGCGCGTCCGGCCGCGTCGGGGTCTGCGTCGCCACCTCCG
 GCCCCGGGGCAACCAACCTCGTGTCCGCGCTCGCCGACGCGCTGCTCGACT
 CCGTCCCGATGGTCGCCATCACGGGGCCAGGTCCTCCGCCGCATGATCGGCA
 CCGACGCCTTCCAGGAGACGCCCATAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCA
 AGCACAATTACCTTGTCTTGATGTGGAGGACATCCCCCGCGTCATACAGG
 AAGCCTTCTTCCTCGCGTCCTCGGGCCGTCCTGGCCCCGGTGTGTCGACA
 TCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCCGTGCCGGTCTGGGACACCTCG
 ATGAATCTACCAGGGTACATCGCACGCCTGCCCAAGCCACCCGCGACAGA
 ATTGCTTGAGCAGGTCTTGCGTCTGGTTGGCGAGTCACGGCGCCCGATTCT
 CTATGTCGGTGGTGGCTGCTCTGCATCTGGTGACGAATTGCGCTGGTTTGT
 GAGCTGACTGGTATCCCAGTTACAACCACTCTGATGGGCCTCGGCAATTT
 CCCAGTGACGACCCGTTGTCCCTGCGCATGCTTGGGATGCATGGCACGGTG
 TACGCAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCGTTTGGTGTG
 CGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAAAATTGAGGCTTTTGCAAGCAGGGC
 CAAGATTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAAGC
 AACCACATGTGTCAATTTGCGCAGATGTAAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGA
 ATGCTCTGCTACAACAGAGCACAACAAAGACAAGTTCTGATTTTAGTGAT
 GGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGTTTCCTCTGGGGTACAAA

ACTTTTGGTGAAGAGATCCCACCGCAATATGCCATTCAGGTGCTGGATGAG
 CTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGAT
 GTGGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTTC
 GGCTGGTCTGGGCGCAATGGGATTTGGGCTGCCTGCTGCAGCTGGTGCTTC
 TGTGGCTAACCCAGGTGTCACAGTTGTTGATATTGATGGGGATGGTAGCTT
 CCTCATGAACATTCAGGAGCTGGCATTGATCCGCATTGAGAACCTCCCTGT
 GAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTATGGTGGTGCAATGGG
 AGGATAGGTTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACCCG
 GAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTC
 AATATTCCTGCAGTCCGTGTAACAAAGAAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATC
 AAGAAGATGCTCGAGACTCCAGGGCCATACTTGTTGGATATCATCGTCCCG
 CACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGATCCCAAGTGGGGGCGCATTCAAGGA
 CATGATCCTGGATGGTGTGATGGCAGGACTGTGTATTAATCTATAATCTGTAT
 GTTGGCAAAGCACCAGCCCCGGCCTATGTTTGACCTGAATGACCCATAAAG
 AGAAGGGCGACACGCGATGCAG

Phương án thứ 5: Lúa đột biến M3 kháng thuốc diệt cỏ (Imazapic)

Hạt giống được thu hoạch từ đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei được gieo để mọc thành cây con (M3), và khi cây M3 phát triển ở giai đoạn 3-4 lá, 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (với nồng độ tối thiểu được khuyến nghị là 1 mL Imazapic/3 L nước, tương đương với 10 lần nồng độ) được phun. 15 ngày sau khi phun, cây con M3 kháng thuốc diệt cỏ có màu xanh lá cây bình thường và có thể tiếp tục phát triển lên đến 20 cm đến 30 cm, trong khi lá của cây con không kháng thuốc diệt cỏ bị mất màu xanh lá cây hoặc thậm chí trở thành phần màu vàng, và cây không phát triển thêm với chiều cao chỉ 5 cm đến 9 cm. Sau 30 ngày phun, các cây kháng thuốc M3 đều là những cây xanh bình thường, trong khi tất cả các cây lúa kiểu dại được phun thuốc diệt cỏ có cùng nồng độ đã chết, điều đó cho thấy rằng cây lúa đột biến ít nhất kháng với thuốc diệt cỏ Imazapic gấp 10 lần nồng độ.

Các hạt được thu hoạch từ cây đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ tương ứng đã được gieo để mọc thành cây con (M3) và khi cây M3 phát triển ở giai đoạn 3-4 lá, 3,3 ml dung dịch Imazapic/L (với nồng độ tối thiểu được đề nghị là 1 ml dung dịch Imazapic/3 L nước, tương đương đến 10 lần nồng độ) được phun. 15 ngày sau khi phun, cây con M3 kháng thuốc có màu xanh lá cây bình thường và có thể tiếp tục phát triển

lên đến 20 cm đến 30 cm, trong khi lá của cây con không kháng thuốc diệt cỏ bị mất màu xanh lá cây hoặc thậm chí trở thành màu vàng, và cây không lớn lên chỉ cao từ 5 cm đến 9 cm. Sau 30 ngày phun, các cây kháng thuốc diệt cỏ M3 đều là những cây xanh bình thường, trong khi tất cả các cây lúa kiều đại được phun thuốc diệt cỏ có cùng nồng độ đều chết, điều này cho thấy cả cây đột biến số 2 và cây đột biến số 3 kháng thuốc diệt cỏ đều có thể kháng thuốc diệt cỏ Imazapic với nồng độ gấp 10 lần.

Phương án thứ 6: Xác định hoạt tính enzym ALS của cây lúa đột biến M3 kháng thuốc diệt cỏ.

Để xác minh có hay không khả năng kháng thuốc diệt cỏ của đột biến lúa có phải do đột biến ALS, tác giả đã thực hiện xác định hoạt tính enzym ALS. Phương pháp xác định tham khảo các phương pháp của Singh, v.v. (Singh B. K., Stidham M. A., Shaner D. L. thí nghiệm tổng hợp axit axetohydroxy. Phân tích hóa sinh, 1988, 171: 173-179.). Cụ thể, 0,2 g lá cây M3 của kiều đại, đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ đã được lấy tương ứng, để vào trong cối và nghiền thành bột với nitơ lỏng, chiết với 2 mL (100 mM K_2HPO_4 , pH 7,5, 10 mM natri pyruvat, 5 mM EDTA, 1 mM valin, 1 mM leuxin, 10 mM xystein, 0,1 mM flavin adenin đinucleotit, 5 mM magie clorua, 10 mM glyxerol, và 1% (w/v) polyvinylpyrrolidon) được thêm vào, và sau khi chiết xuất xong hoàn toàn, lá tiếp tục được nghiền thêm trong khoảng 1 phút. Hỗn hợp sau chiết tiến hành ly tâm ở 12.000 vòng/phút (revolutions per minute: rpm) và ở 4° được thực hiện trong 30 phút, xuất hiện chất nổi trên bề mặt, amoni sulfat đã được thêm vào để làm cho hỗn hợp đạt đến 50% bão hòa, hỗn hợp này được đặt trên đá lạnh trong nửa giờ và ly tâm ở 12.000 vòng/phút và 4°C trong 30 phút, loại bỏ chất nổi trên bề mặt, kết tủa được hòa tan trong 0,2 ml dung dịch đệm phản ứng (100 mM K_2HPO_4 , pH 7, 0, 1 mM EDTA, 10 mM magie clorua, 100 mM natri pyruvat, 1 mM thiamin pyrophosphat và 0,1 mM flavin adenin đinucleotit) và thu được dung dịch chiết ALS của mỗi loại cây tương ứng.

10 μ L thuốc diệt cỏ “Imazapic” (dung dịch nước với 240 g/L hoạt tố) lần lượt được thêm vào dịch chiết ALS thu được để trộn đều, hỗn hợp này được ủ ở 37°C trong 1 giờ, 0,1 ml axit sulfuric 3 M được bổ sung vào để kết thúc phản ứng và hỗn hợp phản ứng được ủ ở 60°C trong 30 phút để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình khử cacboxyl. Sau đó, 0,4 mL dung dịch phát triển màu (0,09 g/L 1-naphthol và 0,009 g/L creatin, hòa tan

với NaOH 2,5 M) đã được thêm vào. Hỗn hợp chất lỏng được ủ ở 37°C trong 30 phút để phát triển màu (ALS đã xúc tác hai axit pyruvic để tạo thành axetolactat và axetolactat decarboxylat để tạo thành 3-hydroxybutanon, sau đó phức hợp màu hồng được tạo thành bởi 3-hydroxybutanon và 1-naphtol, và phức chất có giá trị hấp thụ cực đại ở 530 nm), do đó độ hấp thụ ở 530 nm được xác định, hoạt tính của ALS được biểu thị bằng giá trị độ hấp thụ A530 và giá trị độ hấp thụ A530 phản ánh mức độ ALS hoạt động. Trong thí nghiệm, nước được sử dụng làm đối chứng và năm cây riêng lẻ của kiểu dại, đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ được xác định.

Kết quả xác định giá trị độ hấp thụ A530 cho thấy khi không có Imazapic kháng ALS tồn tại trong dịch chiết ALS của kiểu dại và đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng Hefei thì các giá trị độ hấp thụ A530 của kiểu dại đều nằm trong khoảng 1,2 đến 1,4 và đột biến không có sự khác biệt đáng kể (tham chiếu trên Fig.3); tuy nhiên, sau khi thêm chất Imazapic kháng ALS thì giá trị độ hấp thụ A530 của kiểu dại chỉ là 0,25 và giá trị độ hấp thụ A530 của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng Hefei là 1,21, nghĩa là hoạt tính enzyme ALS của kiểu dại chỉ bằng 18,9% so với đối chứng, trong khi hoạt tính enzyme ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei vẫn ở mức trên 89% (như thể hiện trên Fig.3), cho thấy ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei không nhạy cảm với Imazapic, do đó có sức đề kháng.

Kết quả xác định độ hấp thụ của A530 cho thấy rằng khi không có Imazapic kháng ALS tồn tại trong dịch chiết ALS của kiểu dại, thì các cây đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ có giá trị độ hấp thụ A530 nằm trong khoảng 1,2 đến 1,4 là khoảng hoạt tính enzyme ALS của kiểu dại và các đột biến không có sự khác biệt đáng kể (như thể hiện trên Fig.11); tuy nhiên, sau khi thêm chất Imazapic kháng ALS thì giá trị độ hấp thụ A530 của kiểu dại chỉ là 0,19 đến 0,23, và giá trị độ hấp thụ A530 của đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ là 1,16 đến 1,21, tức là, hoạt tính enzyme ALS của kiểu dại chỉ bằng 18,9% hoạt tính enzyme ALS của kiểu dại khi không thêm Imazapic, trong khi hoạt tính enzyme ALS của đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ là 5,25 lần và 4,49 lần cao gấp nhiều lần so với kiểu dại (như thể hiện trên Fig.11).

Phương án thứ 7: chuyển gen ALS lúa kháng với imazapic

Cặp mồi đặc hiệu 5'-CGCGGATCCATCCGAGCCACACATCGCCTC-3' và 5'-

TCCCCGCGGCCTACGGAAAACAACACAC-3' được thiết kế, đầu 5' của chúng được phân cắt thêm với enzym giới hạn BamHI và SacI, tương ứng. Tham chiếu đến phương pháp của phương án thứ tư, các gen ALS đột biến được khuếch đại từ bộ gen ADN của lúa đột biến lúa kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ nêu trên được thực hiện PCR, sau khi giải trình tự là chính xác, hai enzym phân cắt trên lần lượt được thực hiện cho đoạn gen ALS đột biến và plasmit pCAMBIA1301 của vector biểu hiện thực vật (mua từ công ty pcambia) sử dụng với BamHI và SacI, các sản phẩm sau khi được phân cắt với enzym giới hạn được liên kết với enzym T4-ADN (mua từ Công ty TaKaRa), và sản phẩm liên kết được biến nạp vào trong *Escherichia coli*. ADN được tách chiết từ plasmit tái tổ hợp và được kiểm tra lại bằng phân cắt sử dụng hai enzym BamHI và SacI, đoạn plasmit lớn và đoạn gen nhỏ có thể được tạo ra, điều đó chứng minh rằng các gen ALS có trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1 (thể hiện trên Fig.4A), SEQ ID NO: 8 (thể hiện trên Fig.4B) và SEQ NO.11 (thể hiện trên Fig.4B) đã được nhân lên nhờ vào plasmit pCAMBIA1301 của vector biểu hiện thực vật (mua từ công ty pcambia). Vector plasmit xây dựng được biến nạp vào trong vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 và thalluses để nuôi cấy. Phương pháp chuyển gen qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* thông thường được sử dụng để biến đổi lúa japonica Nipponbare (mua từ Trung tâm bảo tồn và sử dụng tài nguyên thực vật tỉnh Giang Tô), sau khi hạt của cây chuyển gen được thu hoạch, khi cây thế hệ sau phát triển đến giai đoạn 3-4 lá, PCR được sử dụng để phát hiện cây chuyển gen (tham chiếu trên Fig.5A và Fig.5B).

Các môi phát hiện PCR là môi xuôi 35SF 5'-ATGGTTAGAGAGGCTTACGC-3' và môi ngược 5R 5'-AGCAACAGGTCAGCCTTATCCAC-3', và đoạn khuếch đại bao gồm vùng gen khởi động CaMV35S và trình tự cuối 5' của gen ALS với kích thước khoảng 2 kb. Hệ thống phản ứng khuếch đại PCR được đề cập trong phương án thứ tư, phương pháp hai bước được sử dụng trong quy trình phản ứng khuếch đại PCR, ủ và kéo dài được kết hợp ở 68°C. Quy trình khuếch đại như sau: trước biến tính ở 98°C trong 3 phút; 30 chu kỳ; biến tính ở 98°C trong 10 giây; kéo dài ở 68°C trong 2 phút; và cô lập ở 72°C trong 10 phút. Sau khi kết quả PCR thu được là dương tính, 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (10 lần nồng độ được khuyến nghị) đã được phun, sau 7 ngày phun, hoạt tính enzym ALS được xác định tham chiếu đến phương pháp được mô tả

trong phương án thứ sáu, và hoạt tính enzym ALS trong lúa chuyển gen đã được phát hiện cao hơn đáng kể so với lúa không chuyển gen; sau 30 ngày phun, lúa chuyển gen được phát hiện trong tình trạng tăng trưởng tốt trong khi lúa Nipponbare không chuyển gen đã chết. Hoạt tính enzym ALS ở cây lúa thể hệ sau biến đổi gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ được so sánh, hoạt tính enzym ALS của cây chuyển gen chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei được phát hiện có hoạt tính cao hơn 4,7 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu đại (thể hiện trên Fig.6) và hoạt tính enzym ALS của cây chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ là 4,96 lần và cao hơn 5,04 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu đại (tham chiếu trên Fig.12).

Phương án thứ 8: chuyển gen ALS của cây thuốc lá kháng Imazapic

Cặp mồi đặc hiệu 5'-CGCGGATCCATCCGAGCCACACATCGCCTC-3' và 5'-TCCCCGCGGCCTACGAAAACAACACAC-3' được thiết kế, và đầu 5' của chúng được phân cắt thêm bằng enzym BamHI và SacI tương ứng. Đột biến gen ALS được khuếch đại từ bộ gen ADN của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ được thực hiện PCR, sau khi giải trình tự là chính xác, các gen ALS có trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:11 được sao chép vào plasmit pCAMBIA2301 của vectơ biểu hiện thực vật (mua từ công ty pcambia) đề cập trong phương pháp của phương án thứ bảy. Khuẩn lạc dương tính đã được chọn để biến đổi *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, phương pháp chuyển gen qua trung gian vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* thông thường đã được sử dụng để biến đổi phiến lá của cây thuốc lá *nicotiana* uốn cong, sau khi thu hoạch hạt giống của cây chuyển gen, khi các cây thể hệ sau phát triển đến giai đoạn 3-4 lá, 3,3 ml dung dịch Imazapic/1 L nước (10 lần nồng độ được khuyến nghị) đã được phun sau khi xác định PCR là dương tính, sau 7 ngày phun, hoạt tính của enzym ALS đã được xác định đề cập trong phương pháp được mô tả trong phương án thứ sáu, hoạt tính enzym ALS của cây thuốc lá chuyển gen đã được phát hiện là cao hơn đáng kể so với cây thuốc lá không chuyển gen; và sau 30 ngày phun, cây thuốc lá chuyển gen đã được phát hiện trong tình trạng tăng trưởng tốt, trong khi cây thuốc lá không chuyển gen đều đã chết. Các hoạt tính enzym ALS của cây thuốc lá chuyển gen thể hệ sau chứa biến đổi gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ

dòng năng suất thấp Hefei, đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ đã được so sánh, hoạt tính enzym ALS của cây chuyển gen chứa gen ALS của đột biến kháng thuốc diệt cỏ dòng năng suất thấp Hefei đã được phát hiện cao hơn 5,2 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu đại (tham chiếu trên Fig.7) và cao hơn hoạt tính enzym ALS của cây chuyển gen chứa gen ALS của đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ là 5,84 lần và cao hơn 6,0 lần so với hoạt tính enzym ALS của kiểu đại (tham chiếu trên Fig.13).

Phương án thứ 9: so sánh và xác định nguyên liệu kháng thuốc

Để phát hiện có hay không cây kháng thuốc với hai vị trí đột biến được đề cập trong sáng chế có khả năng kháng thuốc diệt cỏ mạnh hơn so với cây kháng thuốc được đề cập trong đơn đăng ký sáng chế trước đó (201610226003.6), các tác giả đã thực hiện xác định hoạt tính enzym ALS trên dòng năng suất thấp Hefei đột biến trong phương án thứ hai và cây đột biến kháng thuốc diệt cỏ của CGMCC No. 12265 trong đơn patent Trung Quốc số 201610226003.6, và hoạt tính enzym ALS của dòng năng suất thấp Hefei đột biến trong sáng chế cao hơn 18% so với CGMCC No. 12265 (như thể hiện trên Fig.8).

Để phát hiện xem cây kháng thuốc của đột biến số 2 và số 3 kháng thuốc diệt cỏ được đề cập trong sáng chế có khả năng kháng thuốc diệt cỏ mạnh hơn cây kháng thuốc được đề cập trong đơn đăng ký sáng chế trước đó (201610226003.6) hay không, các tác giả đã thực hiện xác định hoạt tính enzym ALS của các đột biến trong phương án thứ hai và cây đột biến kháng thuốc diệt cỏ của CGMCC No. 12265 trong đơn patent Trung Quốc số 201610226003.6, và hoạt tính enzym ALS của các đột biến kháng thuốc diệt cỏ trong sáng chế cao hơn 8% và 10,7% so với của CGMCC số 12265 (tham chiếu trên Fig.14).

Mặc dù các phương án của sáng chế đã được mô tả chi tiết, người có hiểu biết trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật sẽ hiểu rằng các sửa đổi và thay thế khác có thể được thực hiện cho các chi tiết dựa theo các phần mô tả được bộc lộ đều nằm trong phạm vi bảo hộ của sáng chế. Phạm vi đầy đủ của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Protein đột biến ALS của lúa cho phép cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ bao gồm trình tự axit amin được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, hoặc SEQ ID NO: 12; trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon, cây trồng là cây lúa hoặc cây thuốc lá.
2. Axit nucleic mã hóa cho protein theo điểm 1.
3. Axit nucleic theo điểm 2 bao gồm:
 - (a) mã hóa protein theo điểm 1;
 - (b) trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 11.
4. Gen mã hóa protein theo điểm 1.
5. Gen mã hóa theo điểm 4 bao gồm:
 - (a) mã hóa protein theo điểm 1;
 - (b) trình tự nucleotit được thể hiện bằng trình tự có mã nhận biết SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, hoặc SEQ ID NO: 11.
6. Catxet biểu hiện chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5.
7. Vector tái tổ hợp chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5.
8. Tế bào chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5.
9. Phương pháp thu được cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ bao gồm các bước sau:
 - 1) tạo khả năng cho cây trồng chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5; hoặc
 - 2) cho phép cây trồng biểu hiện protein theo điểm 1, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon, cây trồng là cây lúa hoặc cây thuốc lá.
10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó phương pháp này bao gồm các bước chỉnh sửa gen crispr, biến đổi gen, lai tạo, lai hồi quy hoặc nhân giống sinh dưỡng.
11. Phương pháp nhận dạng cây trồng, trong đó cây trồng là cây có chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, cây trồng biểu hiện protein theo điểm 1, hoặc cây thu được bằng

phương pháp theo điểm bất kỳ từ 9 đến 10, phương pháp bao gồm các bước sau:

1) xác định xem cây trồng có chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5 hay không, hoặc

2) xác định xem cây trồng có biểu hiện protein theo điểm 1 hay không, trong đó thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon, cây trồng là cây lúa hoặc cây thuốc lá.

12. Phương pháp kiểm soát cỏ dại bao gồm: áp dụng liều thuốc diệt cỏ hiệu quả cho vùng đất trồng, trong đó các loại cây trồng chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5, hoặc catxet biểu hiện theo điểm 6, vectơ tái tổ hợp theo điểm 7, hoặc tế bào theo điểm 8, và thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon, cây trồng là cây lúa hoặc cây thuốc lá.

13. Phương pháp bảo vệ cây trồng khỏi thiệt hại do thuốc diệt cỏ gây ra bao gồm: áp dụng liều thuốc diệt cỏ hiệu quả cho đất trồng, trong đó cây trồng chứa axit nucleic theo điểm 2 hoặc 3, hoặc gen theo điểm 4 hoặc 5, hoặc cây trồng được đưa vào catxet biểu hiện theo điểm 6, hoặc vectơ tái tổ hợp theo điểm 7, và cây trồng được đưa vào tạo ra protein kháng thuốc diệt cỏ, và thuốc diệt cỏ là thuốc diệt cỏ imidazolinon, cây trồng là cây lúa hoặc cây thuốc lá.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Jiangsu Academy of Agricultural Sciences

<120> PROTEIN ĐỘT BIẾN ALS KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ, AXIT NUCLEIC, GEN MÃ HÓA PROTEIN, CATXET BIỂU HIỆN, VECTO TÁI TỔ HỢP HOẶC TẾ BÀO CHỨA AXIT NUCLEIC HOẶC GEN, PHƯƠNG PHÁP THU VÀ NHẬN DẠNG CÂY TRỒNG, VÀ PHƯƠNG PHÁP KIỂM SOÁT CỎ DẠI

<150> 201710655418X

<151> 2017-08-03

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1935

<212> ADN

<213> Hạt giống lúa HF-407(Oryza sativa Indica nhóm HF-407)

<400> 1

```

atggctacga ccgccgcggc cgcggccgcc accttgtccg ccgccgcgac ggccaagacc   60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgtc gaggccgggt gggggcgggc   120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccgtc accccgccgt ccccggcgcc gccggccacg   180
ccgctccggc cgtgggggac ggccgagccc cgcaaggcg cggacatcct cgtggaggcg   240
ctggagcggt gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccggt gcggcgcgtc catggagatc   300
caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttcgccca cgagcagggc   360
gaggcgttcg cggcggtccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcgggggt ctgcgtcgcc   420
acctccggcc cgggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc   480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc caccgccgca tgatcggcac cgacgccttc   540
caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgc tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt   600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgtc ctcggggcgt   660
cctggcccgg tgctggtcga catcccgaag gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc   720
tgggacacct cgatgaatct accgggggtac attgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca   780
gaattgcttg agcaggctct gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc   840
ggtggtggct gctctgcatc tggatgatgaa ttgcgccggt ttgttgagct gaccggcatc   900
ccagttacaa cactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg   960
cgcatgcttg ggatgcatgg cacggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg 1020
ttgcttgcat ttggcgtgcg gtttgatgaa cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080

```


agcagggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
 ccacatgtgt caatttgccg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
 gaccagagca caacaaagac aagttctgat tttagtgcatt ggcacaaatga gttggaccag 1260
 cagaagaggg agtttcctct ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
 gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga 1380
 cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
 tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtgc ttctgtggct 1500
 aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
 gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatgggtgtt gaacaaccaa 1620
 catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
 tacttgggca acccagaatg tgagagcgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
 gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcctgac cgccatcaag 1800
 aagatgctcg agacccagc gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
 gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
 aggactatgt attaa 1935

<210> 2

<211> 644

<212> PRT

<213> Hạt giống lúa HF-407(Oryza sativa Indica nhóm HF-407)

<400> 2

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

Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	His	Arg	Arg	Met	Ile	Gly
				165					170					175	
Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile
			180					185					190		
Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Val
		195					200					205			
Ile	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val
	210					215					220				
Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	Pro	Val
225					230					235					240
Trp	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Leu	Pro	Gly	Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys
				245					250					255	
Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu
			260					265					270		
Ser	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly
		275					280					285			
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr
	290					295					300				
Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu
305					310					315					320
Arg	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp
				325					330					335	
Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Glu	Arg	Val
			340					345					350		
Thr	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile
		355					360					365			
Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser
	370					375					380				
Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu
385					390					395					400
Asp	Gln	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Ala	Trp	His	Asn
				405					410					415	
Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Thr	Phe
			420					425					430		
Gly	Glu	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu
		435				440						445			
Thr	Lys	Gly	Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met
	450					455					460				
Trp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser
465					470					475					480
Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly
				485					490					495	
Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp
			500					505					510		
Gly	Ser	Phe	Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Glu
		515					520					525			
Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Met	Val	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met
	530					535					540				
Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr
545					550					555					560
Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val
				565					570					575	
Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys
			580					585					590		
Ser	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro
		595					600					605			
Tyr	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met
	610					615					620				

Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Met Tyr

<210> 3
 <211> 1935
 <212> ADN
 <213> Gen ALS của hạt giống lúa kiểu dại (*Oryza sativa Indica*)
 <400> 3

```

atggctacga cgcgcgcggc cgcggccgcc accttgtccg cgcgcgcgac ggccaagacc      60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgtc gaggccgggt gggggcggcg      120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccgtc accccgccgt ccccggcgcc gccggccacg      180
ccgctccggc cgtgggggac ggccgagccc cgcaaggcg cgacatcct cgtggaggcg      240
ctggagcggg gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccgg gcggcgcgtc catggagatc      300
caccaggcgc tgacgcgctc cccgggtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc      360
gaggcgttcg cggcggtccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc      420
acctccggcc cgggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc      480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc ccccgccgca tgatcggcac cgacgccttc      540
caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgc tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt      600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgtc ctcgggccgt      660
cctggcccgg tgctggtcga catcccgaag gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc      720
tgggacacct cgatgaatct accggggtac attgcacgcc tgccaagcc acccgcgaca      780
gaattgcttg agcaggctct gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc      840
ggtggtggct gctctgcac tggtgatgaa ttgcgccggt ttgttgagct gaccggcatc      900
ccagttacaa cactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg      960
cgcatgcttg ggatgcatgg cacggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg     1020
ttgcttgcat ttggcgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca     1080
agcaggggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa     1140
ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta     1200
gaccagagca caacaaagac aagtctgat ttagtgcat ggcacaatga gttggaccag     1260
cagaagaggg agtttctctt ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat     1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tggtgttgga     1380

```

cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctgggc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtgc ttctgtggct 1500
aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatgggtgtt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggtttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagcgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtccgtgc cgccatcaag 1800
aagatgctcg agaccccgagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
aggactatgt attaa 1935

<210> 4

<211> 644

<212> PRT

<213> Gen ALS của hạt giống lúa kiểu dại (Oryza sativa Indica)

<400> 4

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

				245					250				255				
Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu		
			260					265					270				
Ser	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly		
		275					280					285					
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr		
	290					295					300						
Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu		
305					310					315					320		
Arg	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp		
				325					330					335			
Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val		
			340					345				350					
Thr	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile		
		355					360					365					
Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser		
	370					375					380						
Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu		
385					390					395					400		
Asp	Gln	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Ala	Trp	His	Asn		
				405					410					415			
Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Thr	Phe		
			420					425					430				
Gly	Glu	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu		
		435					440					445					
Thr	Lys	Gly	Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met		
	450					455					460						
Trp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser		
465					470				475					480			
Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly		
				485					490					495			
Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp		
			500					505					510				
Gly	Ser	Phe	Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Glu		
		515					520					525					
Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Met	Val	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met		
	530					535					540						
Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr		
545					550					555					560		
Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val		
				565					570					575			
Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys		
			580					585					590				
Ser	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro		
		595					600					605					
Tyr	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met		
	610					615					620						
Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Lys	Asp	Met	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly		
625					630					635					640		
Arg	Thr	Met	Tyr														

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<400> 5

Cgcggatcca tccgagccac acatcgcctc 30

<210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<400> 6
 tccccgcggc ctacggaaaa caacacac 28

<210> 7
 <211> 1935
 <212> ADN
 <213> Hạt giống lúa R28 (Oryza sativa Indica nhóm R28)

<400> 7

atggctacga ccgccgcggc cgcggccgcc accttgtccg ccgccgcgac ggccaagacc 60
 ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgctc gaggccgggt gggggcggcg 120
 gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgcctg ccccggcgcc gccggccacg 180
 ccgctccggc cgtgggggac ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg 240
 ctggagcggt gcggcgctcag cgacgtgttc gcctaccggg gcggcgcgtc catggagatc 300
 caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc 360
 gaggcgttcg cggcgctccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcgggggt ctgcgtcgcc 420
 acctccggcc ccggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
 gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc cccgcgcgca tgatcggcac cgacgccttc 540
 caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgcg tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt 600
 gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tctcgcgctc ctcgggccgt 660
 cctggcccgg tgctggtcga catccccaaag gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc 720
 tgggacacct cgatgaatct accgggggtac attgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca 780
 gaattgcttg agcaggtctt gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
 ggtggtggct gctctgcac tggtgatgaa ttgcgcgggt ttgttgagct gaccggcatc 900
 ccagttacaa cactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg 960
 cgcattgcttg ggatgcatgg cacggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg 1020
 ttgcttgcat ttggcgctgcg gtttgatgaa cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
 agcagggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa 1140
 ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200

gaccagagca caacaaagac aagttctgat tttagtgcac ggcacaatga gttggaccag 1260
cagaagaggg agtttcctct ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga 1380
cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtgc ttctgtggct 1500
aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggttttaca aggcaaatag ggcgcataca 1680
tacttgggca acccagaatg tgagagcgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
gggttcaata ttcctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcctgac cgccatcaag 1800
aagatgctcg agaccccagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
aggactatgt attaa 1935

<210> 8

<211> 644

<212> PRT

<213> Hạt giống lúa R28 (Oryza sativa Indica nhóm R28)

<400> 8

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

Ile	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val
	210					215					220				
Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	Pro	Val
225					230					235					240
Trp	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Leu	Pro	Gly	Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys
				245					250					255	
Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu
			260					265					270		
Ser	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly
		275					280					285			
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr
	290					295					300				
Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu
305					310					315					320
Arg	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp
				325					330					335	
Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Glu	Arg	Val
			340					345					350		
Thr	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile
		355					360					365			
Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser
	370					375					380				
Ile	Cys	Ala	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu
385					390					395					400
Asp	Gln	Ser	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Ser	Asp	Phe	Ser	Ala	Trp	His	Asn
				405					410					415	
Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Lys	Arg	Glu	Phe	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Thr	Phe
			420					425					430		
Gly	Glu	Glu	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gln	Val	Leu	Asp	Glu	Leu
		435					440					445			
Thr	Lys	Gly	Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met
	450					455					460				
Trp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser
465					470					475					480
Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly
				485					490					495	
Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp
			500					505					510		
Gly	Ser	Phe	Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Glu
		515					520					525			
Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Met	Val	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met
		530				535					540				
Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr
545															

<210> 9
 <211> 1935
 <212> ADN
 <213> Gen ALS của lúa kiểu đại R89(*Oryza sativa Indica*)

<400> 9

```

atggctacga cgcgcgcggc cgcggccgcc accttgtccg cgcgcgcgac ggccaagacc      60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgcgc gaggccgggt gggggcggcg      120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgcgct ccccggcgcc gccggccacg      180
ccgctccggc cgtggggggac ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg      240
ctggagcggg gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccggy gcggcgcgtc catggagatc      300
caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc      360
gaggcgttcg cggcgctccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc      420
acctccggcc ccggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc      480
gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc ccccgccgca tgatcggcac cgacgccttc      540
caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgcy tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt      600
gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tctcgcgctc ctcgggccgt      660
cctggccccg tgctggtcga catccccaa gacatccagc agcagatggc tgtgccagtc      720
tgggacacct cgatgaatct accgggggtac attgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca      780
gaattgcttg agcaggtctt gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgccccgat tctctatgtc      840
ggtggtggct gctctgcata tggatgatga ttgcgcgggt ttgttgagct gaccggcatc      900
ccagttacaa ccactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgatgatcc gttgtccctg      960
cgcatgcttg ggatgcatgg cacgggtgtac gcaaattatg cgggtggataa ggctgacctg     1020
ttgcttgcat ttggcgtgcy gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca     1080
agcaggggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcgg agattggaaa gaacaagcaa     1140
ccacatgtgt caatttgcyg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta     1200
gaccagagca caacaaagac aagttctgat tttagtgcac ggcacaatga gttggaccag     1260
cagaagaggg agtttcctct ggggtacaag acttttggtg aagagatccc accgcaatat     1320
gctattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggggaggcaa tcatcgctac tgggtgttga     1380
cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct     1440
tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtc ttctgtggct     1500
aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag     1560

```

gagttggcat tgatccgcat tgagaacctc ccggtgaagg tgatggtggt gaacaaccaa 1620
 catttgggta tggttgtgca atgggaggat aggtttttaca aggcaaataag ggcgcataca 1680
 tacttggggca acccagaatg tgagagcgag atatatccag attttgtgac tattgctaaa 1740
 gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtcctgtc cgccatcaag 1800
 aagatgctcg agaccccagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccaca ccaggagcat 1860
 gtgctgccta tgatcccaag tggggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
 aggactatgt attaa 1935

<210> 10

<211> 644

<212> PRT

<213> Gen ALS của lúa kiểu dại R89 (*Oryza sativa Indica*)

<400> 10

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

Asp Glu Leu Arg Arg Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr
 290 295 300
 Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
 325 330 335
 Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
 340 345 350
 Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
 355 360 365
 Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser
 370 375 380
 Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 385 390 395 400
 Asp Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
 405 410 415
 Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
 420 425 430
 Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
 435 440 445
 Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met
 450 455 460
 Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser
 465 470 475 480
 Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly
 485 490 495
 Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp
 500 505 510
 Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu
 515 520 525
 Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met
 530 535 540
 Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr
 545 550 555 560
 Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val
 565 570 575
 Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys
 580 585 590
 Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro
 595 600 605
 Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met
 610 615 620
 Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Met Tyr

<210> 11

<211> 1935

<212> ADN

<213> Hạt giống lúa JH10 (Oryza sativa Japonica nhóm JH10)

<400> 11

atggctacga cgcgcgcggc cgcggccgcc gccctgtccg ccgccgcgac ggccaagacc 60

ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgtc gaggccgggt gggggcggcg 120

gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgccgt ccccggcgcc gccggccacg 180
 ccgctccggc cgtggggggc ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg 240
 ctggagcggt gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccggg gcggcgcgtc catggagatc 300
 caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc 360
 gaggcgttcg cggcgctccg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420
 acctccggcc ccgggggcaac caacctcgtg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
 gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggtc ctccgccgca tgatcggcac cgacgccttc 540
 caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgcg tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt 600
 gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgtc ctcgggccgt 660
 cctggccccg tgctggtcga catccccaag gacatccagc agcagatggc cgtgccggtc 720
 tgggacacct cgatgaatct accagggtac atcgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca 780
 gaattgcttg agcaggctct gcgtctggtt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
 ggtggtggct gctctgcatc tggtgacgaa ttgcgctggt ttgttgagct gactggtatc 900
 ccagttacaa ccaactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgacgacct gttgtccctg 960
 cgcattgcttg ggatgcatgg cacggtgtac gcaaattatg ccgtggataa ggctgacctg 1020
 ttgcttgctg ttggtgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
 agcagggccca agattgtgca cattgacatt gatccagcag agattggaaa gaacaagcaa 1140
 ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
 caacagagca caacaaagac aagtctctgat tttagtgcac ggcacaatga gttggaccag 1260
 cagaagaggg agtttcctct ggggtacaaa acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
 gccattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggtgaggcaa tcatcgctac tgggtgttggg 1380
 cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
 tcggctggtc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctggtgc ttctgtggct 1500
 aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
 gagctggcat tgatccgcat tgagaacctc cctgtgaagg tgatggtggt gaacaaccaa 1620
 catttgggta tgggtgtgca atgggaggat aggttttaca aggcgaatag ggcgcataca 1680
 tacttgggca acccggaatg tgagagcgag atatatccag atttgtgac tattgctaag 1740
 gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtccgtgc cgccatcaag 1800
 aagatgctcg agaactcagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccgcga ccaggagcat 1860

gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tgggtgatggc 1920
aggactgtgt attaa 1935

<210> 12

<211> 644

<212> PRT

<213> Hạt giống lúa JH10 (Oryza sativa Japonica nhóm JH10)

<400> 12

Met	Ala	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Ala	Ala
1				5						10					15	
Thr	Ala	Lys	Thr	Gly	Arg	Lys	Asn	His	Gln	Arg	His	His	Val	Leu	Pro	
			20					25					30			
Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Arg	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	
		35					40					45				
Pro	Val	Thr	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Pro	Ala	Thr	Pro	Leu	Arg	Pro	
	50					55					60					
Trp	Gly	Pro	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Gly	Ala	Asp	Ile	Leu	Val	Glu	Ala	
65					70					75					80	
Leu	Glu	Arg	Cys	Gly	Val	Ser	Asp	Val	Phe	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ala	
				85					90					95		
Ser	Met	Glu	Ile	His	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Pro	Val	Ile	Thr	Asn	
			100					105					110			
His	Leu	Phe	Arg	His	Glu	Gln	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	
		115					120					125				
Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Val	Cys	Val	Ala	Thr	Ser	Gly	Pro	
	130					135					140					
Gly	Ala	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Ser	
145					150					155					160	
Val	Pro	Met	Val	Ala	Ile	Thr	Gly	Gln	Val	Leu	Arg	Arg	Met	Ile	Gly	
				165					170					175		
Thr	Asp	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Pro	Ile	Val	Glu	Val	Thr	Arg	Ser	Ile	
			180					185					190			
Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Val	
		195					200					205				
Ile	Gln	Glu	Ala	Phe	Phe	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	
	210					215					220					
Leu	Val	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Met	Ala	Val	Pro	Val	
225					230					235					240	
Trp	Asp	Thr	Ser	Met	Asn	Leu	Pro	Gly	Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys	
				245					250					255		
Pro	Pro	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Glu	Gln	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Glu	
			260					265					270			
Ser	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Ser	Ala	Ser	Gly	
		275					280					285				
Asp	Glu	Leu	Arg	Trp	Phe	Val	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Thr	Thr	
	290					295					300					
Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly	Asn	Phe	Pro	Ser	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Leu	
305					310					315					320	
Arg	Met	Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Val	Asp	
				325					330					335		
Lys	Ala	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	
			340					345					350			
Thr	Gly	Lys	Ile	Glu	Ala	Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	
		355					360					365				
Asp	Ile	Asp	Pro	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Gln	Pro	His	Val	Ser	

370	Ile Cys Ala Asp Val Lys	375	Leu Ala Leu Gln Gly	380	Leu Asn Ala Leu Leu
385	Gln Gln Ser Thr Thr	390	Lys Thr Ser Ser Asp	395	Phe Ser Ala Trp His Asn
	405		410		415
Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe	420		425		430
Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu	435		440		445
Thr Lys Gly Glu Ala Ile Ile Ala Thr Gly Val Gly Gln His Gln Met	450		455		460
Trp Ala Ala Gln Tyr Tyr Thr Tyr Lys Arg Pro Arg Gln Trp Leu Ser	465		470		475
Ser Ala Gly Leu Gly Ala Met Gly Phe Gly Leu Pro Ala Ala Ala Gly	485		490		495
Ala Ser Val Ala Asn Pro Gly Val Thr Val Val Asp Ile Asp Gly Asp	500		505		510
Gly Ser Phe Leu Met Asn Ile Gln Glu Leu Ala Leu Ile Arg Ile Glu	515		520		525
Asn Leu Pro Val Lys Val Met Val Leu Asn Asn Gln His Leu Gly Met	530		535		540
Val Val Gln Trp Glu Asp Arg Phe Tyr Lys Ala Asn Arg Ala His Thr	545		550		555
Tyr Leu Gly Asn Pro Glu Cys Glu Ser Glu Ile Tyr Pro Asp Phe Val	565		570		575
Thr Ile Ala Lys Gly Phe Asn Ile Pro Ala Val Arg Val Thr Lys Lys	580		585		590
Ser Glu Val Arg Ala Ala Ile Lys Lys Met Leu Glu Thr Pro Gly Pro	595		600		605
Tyr Leu Leu Asp Ile Ile Val Pro His Gln Glu His Val Leu Pro Met	610		615		620
Ile Pro Ser Gly Gly Ala Phe Lys Asp Met Ile Leu Asp Gly Asp Gly	625		630		635
Arg Thr Val Tyr					640

<210> 13

<211> 1935

<212> ADN

<213> Gen ALS của lúa kiểu dại Jiahua No. 1 (nhóm *Oryza sativa* Japonica)

<400> 13

```

atggctacga cgcgcgcggc cgcggccgcc gccctgtccg ccgccgcgac ggccaagacc 60
ggccgtaaga accaccagcg acaccacgtc cttcccgtc gaggccgggt gggggcggcg 120
gcggtcaggt gctcggcggt gtccccggtc accccgccgt ccccggcgcc gccggccacg 180
ccgctccggc cgtggggggc ggccgagccc cgcaagggcg cggacatcct cgtggaggcg 240
ctggagcggt gcggcgtcag cgacgtgttc gcctaccgg gcggcgcgtc catggagatc 300
caccaggcgc tgacgcgctc cccggtcatc accaaccacc tcttccgcca cgagcagggc 360
gaggcgttcg cggcgtccgg gtacgcgcgc gcgtccggcc gcgtcggggg ctgcgtcgcc 420

```

acctccggcc cccggggcaac caacctcgctg tccgcgctcg ccgacgcgct gctcgactcc 480
 gtcccgatgg tcgccatcac gggccaggctc ccccgccgca tgatcggcac cgacgccttc 540
 caggagacgc ccatagtcga ggtcaccgcg tccatcacca agcacaatta ccttgtcctt 600
 gatgtggagg acatcccccg cgtcatacag gaagccttct tcctcgcgct ctcgggcccgt 660
 cctggcccgg tgctgggtcg catccccaag gacatccagc agcagatggc cgtgccggctc 720
 tgggacacct cgatgaatct accagggtac atcgcacgcc tgcccaagcc acccgcgaca 780
 gaattgcttg agcaggctct gcgtctgggt ggcgagtcac ggcgcccgat tctctatgtc 840
 ggtggtggct gctctgcatc tggtgacgaa ttgcgctggt ttgttgagct gactgggtatc 900
 ccagttacaa ccactctgat gggcctcggc aatttcccca gtgacgaccc gttgtccctg 960
 cgcattgcttg ggatgcatgg cacgggtgtac gcaaattatg ccgtggataa ggctgacctg 1020
 ttgcttgctg ttggtgtgcg gtttgatgat cgtgtgacag ggaaaattga ggcttttgca 1080
 agcagggcca agattgtgca cattgacatt gatccagcag agattggaaa gaacaagcaa 1140
 ccacatgtgt caatttgcg agatgttaag cttgctttac agggcttgaa tgctctgcta 1200
 caacagagca caacaaagac aagttctgat tttagtgcac ggcacaatga gttggaccag 1260
 cagaagaggg agtttcctct ggggtacaaa acttttggtg aagagatccc accgcaatat 1320
 gccattcagg tgctggatga gctgacgaaa ggtgaggcaa tcatcgctac tgggtgttggg 1380
 cagcaccaga tgtgggcggc acaatattac acctacaagc ggccacggca gtggctgtct 1440
 tcggctggctc tgggcgcaat gggatttggg ctgcctgctg cagctgggtgc ttctgtggct 1500
 aaccaggtg tcacagttgt tgatattgat ggggatggta gcttcctcat gaacattcag 1560
 gagctggcat tgatccgcat tgagaacctc cctgtgaagg tgatggtgtt gaacaaccaa 1620
 catttgggta tgggtggtgca atgggaggat aggttttaca aggcgaatag ggcgcataca 1680
 tacttgggca acccggaatg tgagagcgag atatatccag attttgtgac tattgctaag 1740
 gggttcaata ttctgcagt ccgtgtaaca aagaagagtg aagtccgtgc cgccatcaag 1800
 aagatgctcg agactccagg gccatacttg ttggatatca tcgtcccgca ccaggagcat 1860
 gtgctgccta tgatcccaag tgggggcgca ttcaaggaca tgatcctgga tggatgatggc 1920
 aggactgtgt attaa 1935

<210> 14

<211> 644

<212> PRT

<213> Gen ALS của lúa kiểu dại Jiahua No. 1 (nhóm *Oryza sativa* Japonica)

<400> 14

```

Met Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Ser Ala Ala Ala
1      5      10      15
Thr Ala Lys Thr Gly Arg Lys Asn His Gln Arg His His Val Leu Pro
20      25      30
Ala Arg Gly Arg Val Gly Ala Ala Ala Val Arg Cys Ser Ala Val Ser
35      40      45
Pro Val Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ala Thr Pro Leu Arg Pro
50      55      60
Trp Gly Pro Ala Glu Pro Arg Lys Gly Ala Asp Ile Leu Val Glu Ala
65      70      75      80
Leu Glu Arg Cys Gly Val Ser Asp Val Phe Ala Tyr Pro Gly Gly Ala
85      90      95
Ser Met Glu Ile His Gln Ala Leu Thr Arg Ser Pro Val Ile Thr Asn
100     105     110
His Leu Phe Arg His Glu Gln Gly Glu Ala Phe Ala Ala Ser Gly Tyr
115     120     125
Ala Arg Ala Ser Gly Arg Val Gly Val Cys Val Ala Thr Ser Gly Pro
130     135     140
Gly Ala Thr Asn Leu Val Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Leu Asp Ser
145     150     155     160
Val Pro Met Val Ala Ile Thr Gly Gln Val Pro Arg Arg Met Ile Gly
165     170     175
Thr Asp Ala Phe Gln Glu Thr Pro Ile Val Glu Val Thr Arg Ser Ile
180     185     190
Thr Lys His Asn Tyr Leu Val Leu Asp Val Glu Asp Ile Pro Arg Val
195     200     205
Ile Gln Glu Ala Phe Phe Leu Ala Ser Ser Gly Arg Pro Gly Pro Val
210     215     220
Leu Val Asp Ile Pro Lys Asp Ile Gln Gln Gln Met Ala Val Pro Val
225     230     235     240
Trp Asp Thr Ser Met Asn Leu Pro Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Pro Lys
245     250     255
Pro Pro Ala Thr Glu Leu Leu Glu Gln Val Leu Arg Leu Val Gly Glu
260     265     270
Ser Arg Arg Pro Ile Leu Tyr Val Gly Gly Gly Cys Ser Ala Ser Gly
275     280     285
Asp Glu Leu Arg Trp Phe Val Glu Leu Thr Gly Ile Pro Val Thr Thr
290     295     300
Thr Leu Met Gly Leu Gly Asn Phe Pro Ser Asp Asp Pro Leu Ser Leu
305     310     315     320
Arg Met Leu Gly Met His Gly Thr Val Tyr Ala Asn Tyr Ala Val Asp
325     330     335
Lys Ala Asp Leu Leu Leu Ala Phe Gly Val Arg Phe Asp Asp Arg Val
340     345     350
Thr Gly Lys Ile Glu Ala Phe Ala Ser Arg Ala Lys Ile Val His Ile
355     360     365
Asp Ile Asp Pro Ala Glu Ile Gly Lys Asn Lys Gln Pro His Val Ser
370     375     380
Ile Cys Ala Asp Val Lys Leu Ala Leu Gln Gly Leu Asn Ala Leu Leu
385     390     395     400
Gln Gln Ser Thr Thr Lys Thr Ser Ser Asp Phe Ser Ala Trp His Asn
405     410     415
Glu Leu Asp Gln Gln Lys Arg Glu Phe Pro Leu Gly Tyr Lys Thr Phe
420     425     430
Gly Glu Glu Ile Pro Pro Gln Tyr Ala Ile Gln Val Leu Asp Glu Leu
435     440     445

```


Thr	Lys	Gly	Glu	Ala	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met
450						455					460				
Trp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Lys	Arg	Pro	Arg	Gln	Trp	Leu	Ser
465					470					475					480
Ser	Ala	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	Leu	Pro	Ala	Ala	Ala	Gly
				485					490					495	
Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	Gly	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp
			500					505					510		
Gly	Ser	Phe	Leu	Met	Asn	Ile	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Glu
		515					520					525			
Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Met	Val	Leu	Asn	Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met
530						535					540				
Val	Val	Gln	Trp	Glu	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr
545					550					555					560
Tyr	Leu	Gly	Asn	Pro	Glu	Cys	Glu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Pro	Asp	Phe	Val
				565					570					575	
Thr	Ile	Ala	Lys	Gly	Phe	Asn	Ile	Pro	Ala	Val	Arg	Val	Thr	Lys	Lys
			580					585					590		
Ser	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Lys	Met	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Pro
		595					600					605			
Tyr	Leu	Leu	Asp	Ile	Ile	Val	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	Pro	Met
610						615					620				
Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	Ala	Phe	Lys	Asp	Met	Ile	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly
625					630					635					640
Arg	Thr	Val	Tyr												



Fig.1

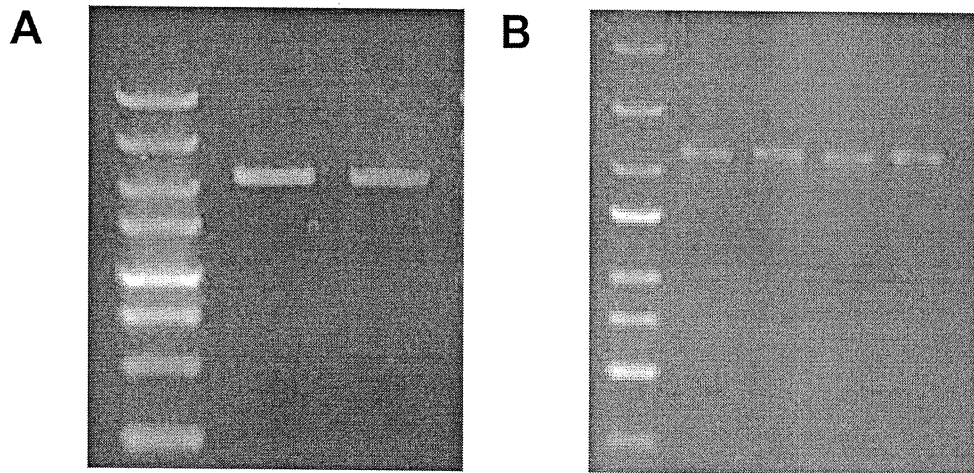


Fig.2

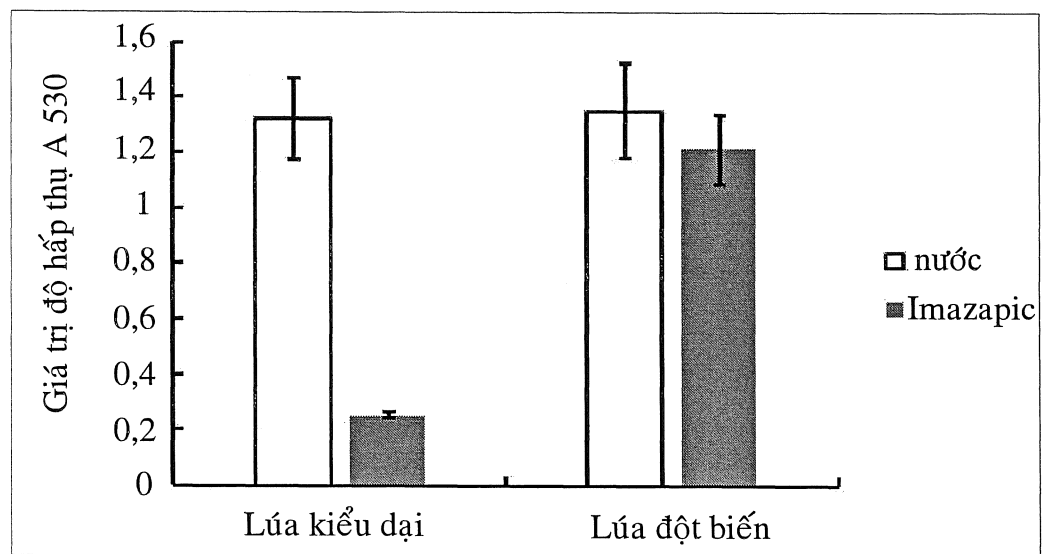


Fig.3

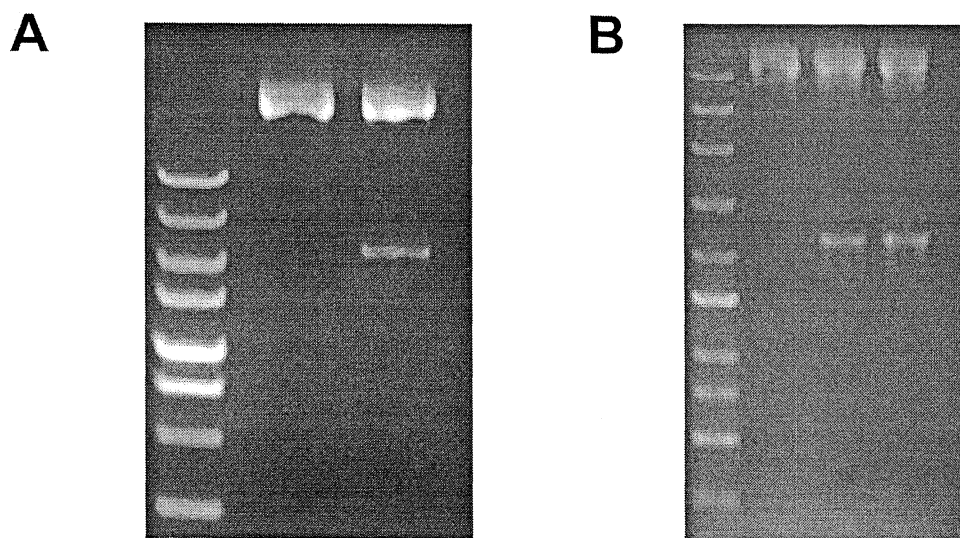


Fig.4

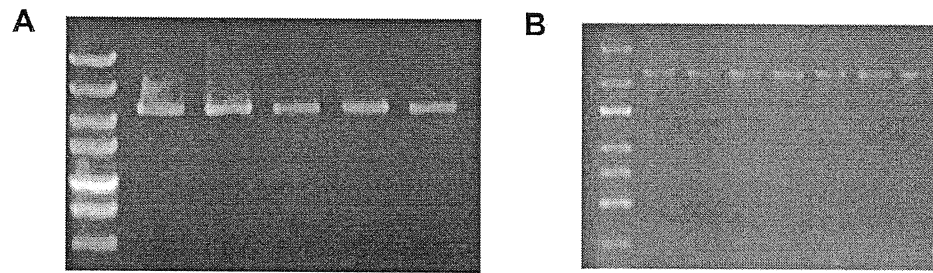


Fig.5

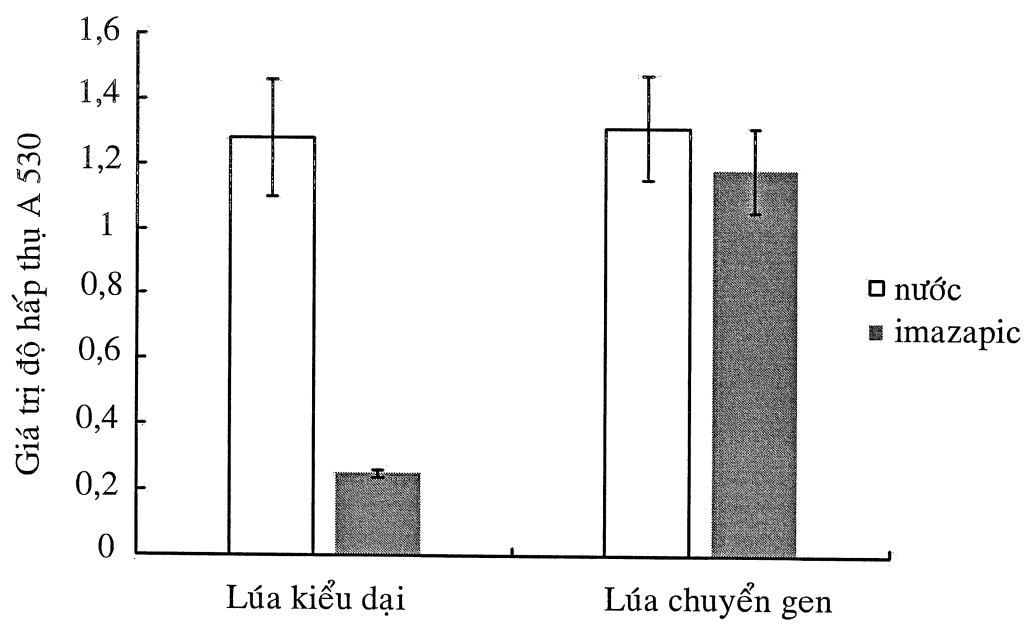


Fig.6

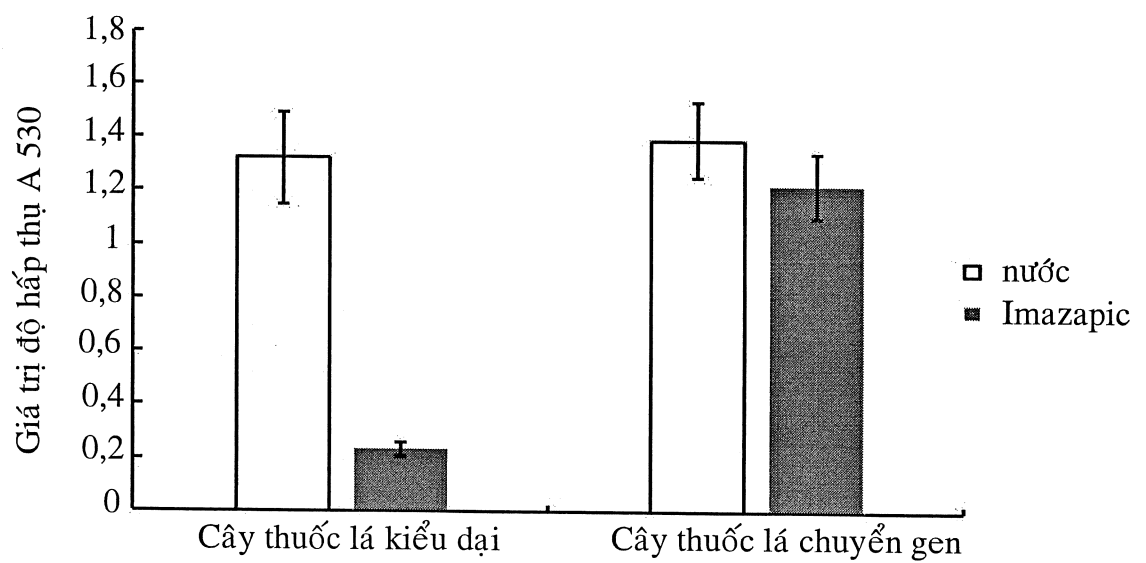


Fig.7

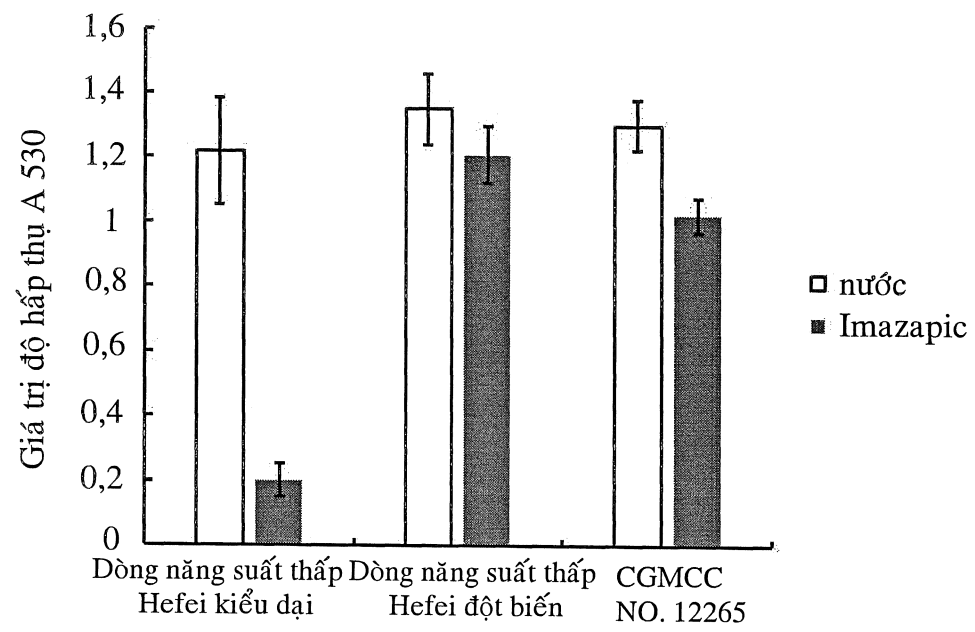


Fig.8



Fig.9



Fig.10

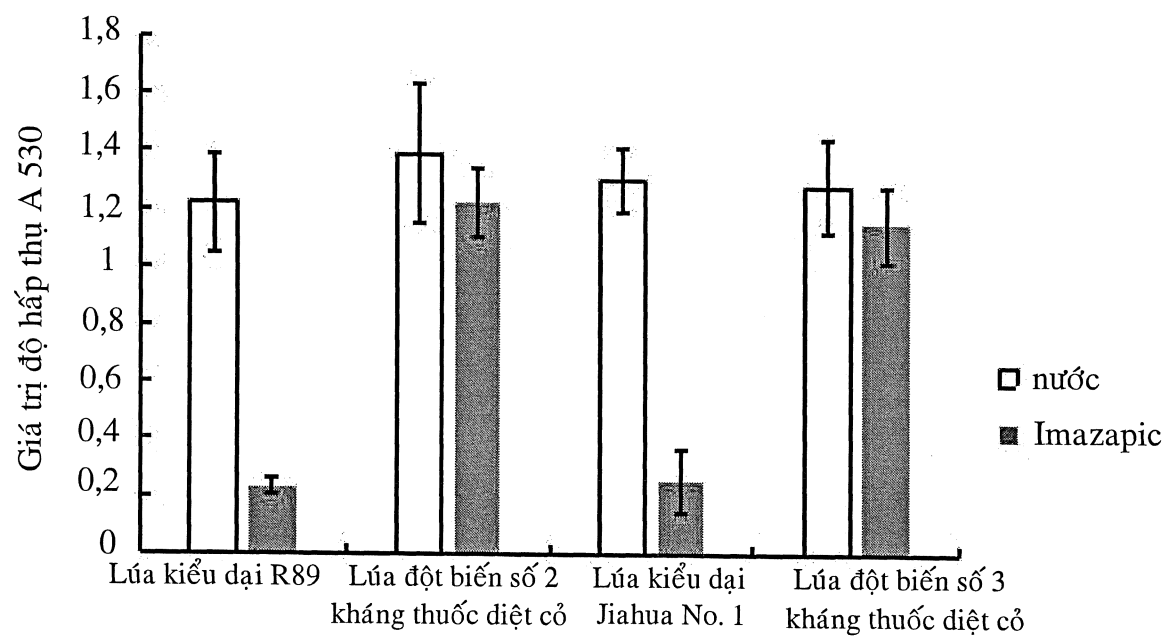


Fig.11

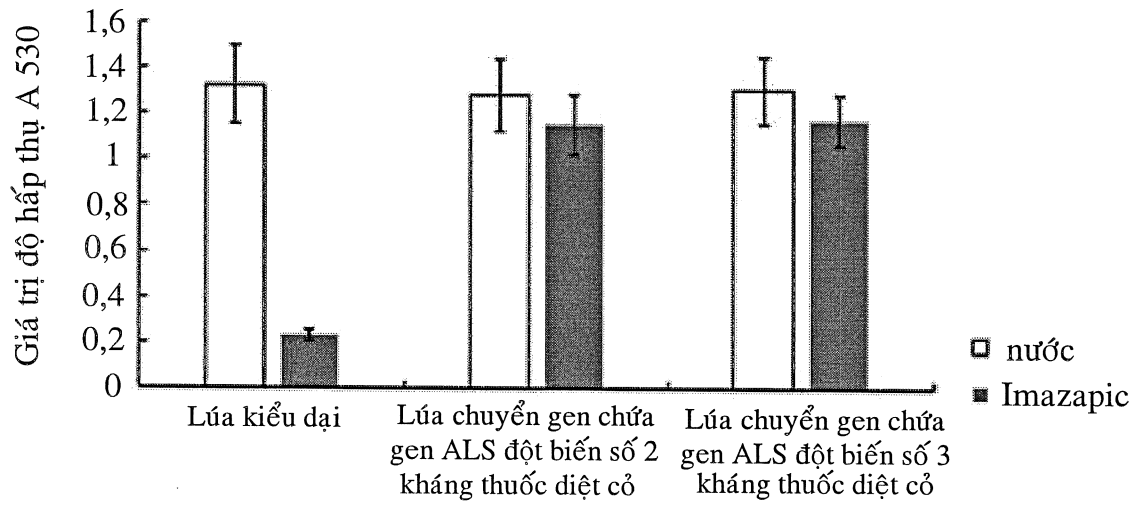


Fig.12

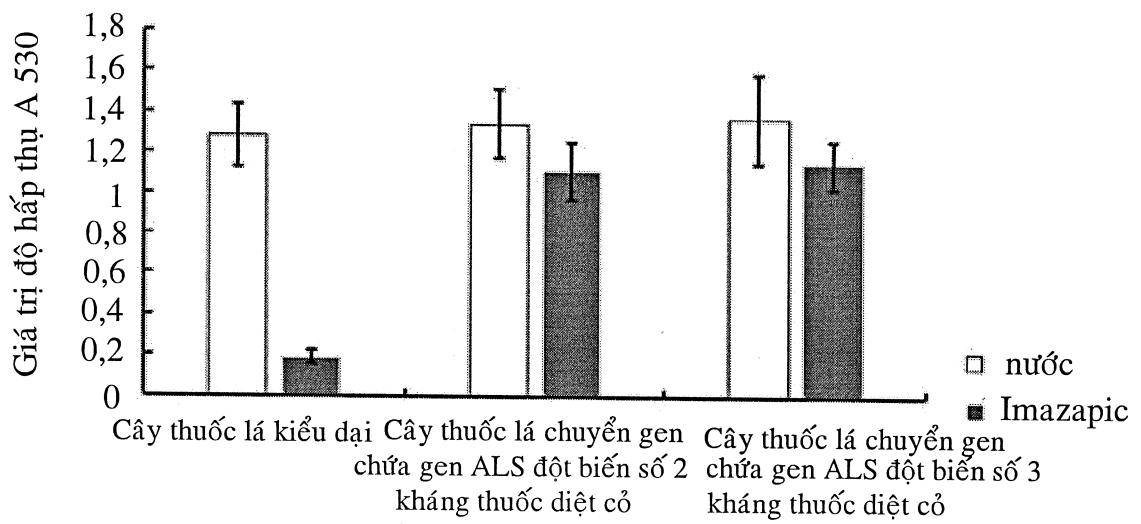


Fig.13

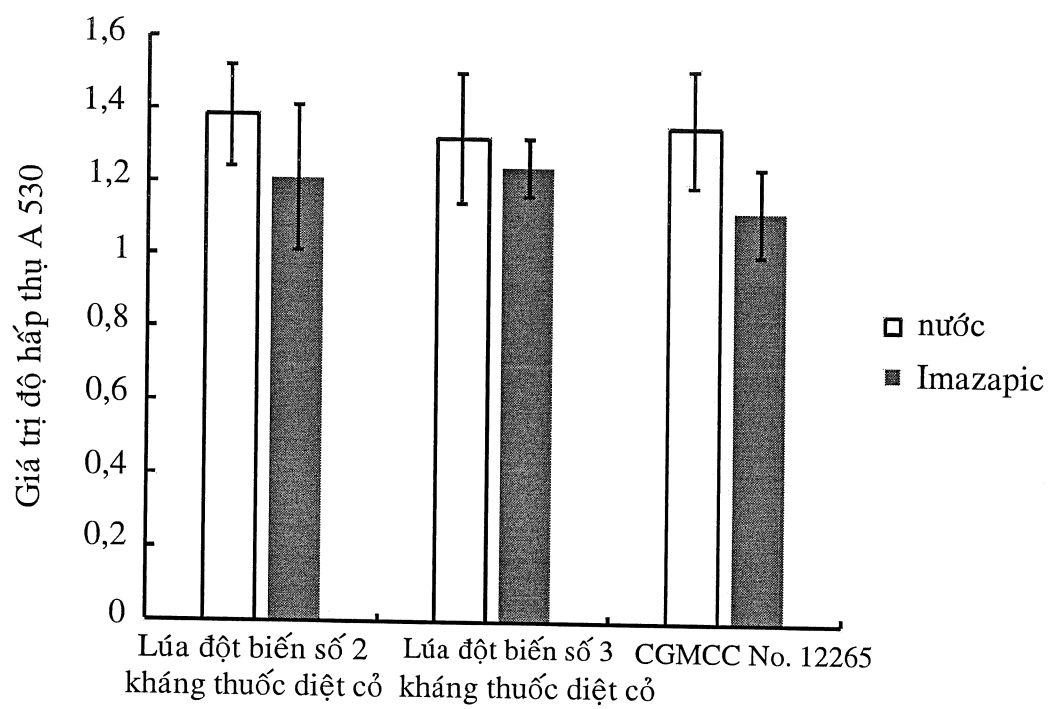


Fig.14