(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) **1-0040256**

(51)[2018.01] **C12N 15/82**; A01G 22/22

(13) **B**

(21) 1-2019-00617

(22) 04/08/2017

(86) PCT/EP2017/069865 04/08/2017

(87) WO 2018/024906 A1 08/02/2018

(30) 62/371,582 05/08/2016 US

(45) 25/06/2024 435

(43) 25/07/2019 376A

(73) RICETEC, INC. (US)
1925 FM 2917 Rd. Alvin, Texas 77511, United States of America

(72) BERNACCHI, Dario (US); KNEPPER, Caleb (US); RASMUSSEN, Russell D. (US); CUEVAS, Federico (US); CHANNARAYAPPA, Venu Reddyvari (US); HINGA, Melissa (US); MOON, Melissa Shannon (US).

(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)

(54) CÂY LÚA CÓ HỆ GEN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH DUNG NẠP CHẤT ỨC CHẾ ACCAZA VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HẠT LÚA NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến cây lúa kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ, ví dụ, chất ức chế ACCaza, và chất ức chế HPPD, hoặc cả hai. Đối với chất ức chế ACCaza, hai vùng nhiễm sắc thể khác nhau hoạt động hiệp đồng để tạo ra tính kháng/dung nạp cùng loại thuốc diệt cỏ. Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất cây lúa kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến cây lúa đột biến mà: (1) kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza ở nồng độ chất ức chế tương đối cao do tác dụng hiệp đồng của các gen trong hai vùng của hai nhiễm sắc thể khác nhau; (2) kháng/dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ ức chế HPPD và ACCaza; và (3) chỉ kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế 4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenaza (HPPD). Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp phòng trừ cỏ dại bằng cách sử dụng cây lúa với các cây trồng kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ này trong ruộng có thể được phun hoặc được xử lý theo cách khác bằng thuốc diệt cỏ. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất cây lúa kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giá trị của cây lúa

Cây lúa là cây nông nghiệp từ xa xưa và ngày nay là một trong số các cây lương thực chính của thế giới. Có hai loài lúa được trồng: *Oryza sativa L.*, lúa châu Á, và *Oryza glaberrima Steud.*, lúa châu Phi. Loài châu Á chiếm hầu hết lúa được trồng của thế giới và là loài được trồng ở Mỹ. Ba vùng sản xuất lúa chính hiện có ở Mỹ: đồng bằng Mississippi (Arkansas, Mississippi, đông bắc Louisiana, đông nam Missouri), duyên hải vịnh Mexico (tây nam Louisiana, đông nam Texas), và thung lũng trung tâm California. Các quốc gia khác, cụ thể là ở Nam Mỹ và phương Đông, là các quốc qua sản xuất lúa chính.

Lúa là một trong số ít cây trồng có thể được trồng trong vùng ngập nông do nó có cấu trúc duy nhất cho phép trao đổi khí qua thân giữa rễ và không khí. Sự sinh trưởng trong vùng ngập nông tạo ra các năng suất tốt nhất và là lý do mà cây lúa thường được trồng trên đất sét nặng, hoặc đất có lớp đất cứng không thấm nằm ngay dưới mặt đất. Các loại đất này thường không thích hợp cho các cây trồng khác hoặc dù trong điều kiện tốt nhất thì các cây trồng này vẫn cho năng suất kém.

Việc cải thiện ổn định cây lúa là cấp bách để cung cấp dinh dưỡng cần thiết cho dân số thế giới ngày càng tăng. Phần lớn dân số thế giới tiêu thụ lúa làm nguồn dinh dưỡng cơ bản, và các cây trồng phải mau lớn trong các điều kiện môi trường khác nhau bao gồm cạnh tranh với cỏ dại và các cuộc tấn công bởi các tác nhân bất lợi. Việc cải thiện cây lúa được thực hiện qua các phương pháp lai thông thường cũng như bằng các kỹ thuật di truyền

tái tổ hợp. Hiển nhiên ngoài nguyên tắc này, việc cải thiện cây trồng cần đến kỹ năng khoa học và kỹ thuật thành thạo và kết quả thường không dự đoán được.

Mặc dù các mục tiêu lai cụ thể thay đổi nhất định ở các vùng sản xuất lúa khác nhau của thế giới, tăng năng suất là mục đích chính trong tất cả các chương trình.

Lai giống cây bắt đầu bằng việc phân tích và xác định độ mạnh yếu của các cây trồng hiện có, tiếp theo là thiết lập các mục tiêu chương trình, để cải thiện các vùng yếu để sản xuất các cây trồng mới. Các mục tiêu lai cụ thể bao gồm kết hợp trong cây trồng duy nhất tổ hợp các tính trạng mong muốn được cải thiện từ các nguồn giống (bố mẹ). Các tính trạng mong muốn có thể được đưa vào do các đột biến ngẫu nhiên hoặc được cảm ứng. Các tính trạng mong muốn bao gồm năng suất cao hơn, kháng stress môi trường, bệnh và côn trùng, thân và rễ tốt hơn, chịu được nhiệt độ thấp, đặc tính nông học tốt hơn, giá trị dinh dưỡng và chất lượng hạt.

Ví dụ, nhà chọn giống trước hết chọn và lai hai hoặc nhiều dòng bố mẹ, tiếp theo là chọn các tính trạng mong muốn trong số nhiều tổ hợp di truyền mới. Nhà chọn giống có thể tạo ra theo lý thuyết hàng tỷ tổ hợp di truyền khác nhau qua việc lai (lai chéo). Việc chọn giống bằng cách lai và tự thụ phấn, không tác động đến việc kiểm soát trực tiếp ở cấp độ tế bào. Tuy nhiên, kiểu kiểm soát này có thể đạt được một phần bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền tái tổ hợp.

Chọn giống theo phả hệ được sử dụng phổ biến để cải thiện các cây trồng tự thụ phấn như cây lúa. Ví dụ, hai cây bố mẹ có các tính trạng bổ trợ thích hợp được lai chéo với nhau tạo ra thế hệ F_1. Bản thân một hoặc cả hai cây bố mẹ có thể là F_1 từ phép lai trước đó. Kết quả là, quần thể riêng biệt được sản xuất, bằng cách trồng hạt giống tạo thành từ sự tự thụ phấn một hoặc vài cá thể F_1 nếu hai cây bố mẹ là các dòng thuần, hoặc bằng cách trồng trực tiếp hạt giống tạo thành từ phép lai ban đầu nếu ít nhất một trong hai cây bố mẹ là F_1. Việc chọn các hệ gen cá thể tốt nhất có thể bắt đầu trong quần thể riêng biệt hoặc F_2; tiếp theo, bắt đầu trong F_3, các cá thể tốt nhất trong các thế hệ tốt nhất được chọn. "Tốt nhất" được xác định theo mục tiêu của chương trình chọn giống cụ thể, ví dụ, để tăng năng suất, kháng bệnh. Nói chung, phương pháp đa nhân tố được sử dụng để xác định giá trị "tốt nhất" do các tương tác di truyền. Gen mong muốn trong một nền di truyền này có thể khác trong một nền khác. Ngoài ra, việc đưa gen vào có thể làm xáo trộn các đặc tính di truyền thuận lợi khác. Việc thử nghiệm lặp lại các thế hệ có thể bắt đầu trong thế hệ F_4 để cải thiện hiệu quả chọn lọc các tính trạng có tính di truyền thấp. Ở giai đoạn nâng cao của lai đồng

huyết (tức là, F_6 và F_7), các dòng hoặc hỗn hợp tốt nhất của các dòng tương tự về mặt kiểu hình được thử nghiệm về sự tách tiềm tàng thành các dòng bố mẹ mới.

Lai ngược được sử dụng để truyền các gen đối với tính trạng di truyền cao vào cây trồng đồng hợp tử mong muốn hoặc dòng đồng huyết là giống truy hồi. Nguồn tính trạng cần truyền được gọi là giống cho (thể cho bố mẹ). Cây tạo ra được cho là có đặc tính của giống truy hồi (ví dụ, cây trồng) và tính trạng mong muốn được truyền từ giống cho. Sau phép lai ban đầu, các cá thể có kiểu hình của giống cho được chọn và lai lặp lại (lai ngược) với giống truy hồi. Quy trình này được sử dụng để phục hồi tất cả các đặc tính có lợi của giống truy hồi có bổ sung tính trạng mới được cung cấp bởi giống cho.

Các dòng lai cải tiến hứa hẹn được thử nghiệm kỹ và so với các dòng chuẩn thích hợp trong các môi trường đại diện cho các vùng đích thương mại trong ít nhất ba năm hoặc nhiều hơn. Các dòng tốt nhất là các dòng tuyển chọn cho các giống hoặc giống lai thương mại mới; chúng vẫn thiếu một vài tính trạng có thể được sử dụng làm giống để sản xuất các quần thể mới cho bước chọn lọc tiếp theo.

Các quy trình này, có thể dẫn đến bước cuối là thương mại hóa và phân phối, thường cần từ 8 đến 12 năm từ lúc phép lai đầu tiên được thực hiện và có thể phụ thuộc vào sự phát triển của các dòng lai được cải thiện làm giống. Do đó, việc phát triển các cây trồng mới không những là quy trình tiêu tốn thời gian, mà còn cần đến việc lập kế hoạch tương lai chính xác, việc sử dụng tài nguyên hiệu quả, và việc giảm đến mức tối thiểu các thay đổi về chiều hướng. Các kết quả này bao gồm các tổ hợp di truyền mới không được tìm thấy trong tự nhiên.

Việc cải thiện nhất định đối với cây lúa qua việc lai có thể bị giới hạn ở biến dị di truyền tự nhiên ở cây lúa và loài lai, như lúa hoang. Việc đưa vào biến dị mới trong chương trình lai thường là qua chương trình lai như được mô tả, như lai theo phả hệ hoặc lai ngược. Tuy nhiên, đôi khi các đột biến tự nhiên được phát hiện dẫn đến việc đưa vào các tính trạng mới như kháng bệnh hoặc thay đổi chiều cao. Các nhà chọn giống cũng đã phát triển các tính trạng mới bằng cách đưa các đột biến (các thay đổi nhỏ trong trình tự ADN) vào hệ gen cây lúa. Một số đột biến hoặc tổ hợp gen này không được tìm thấy trong tự nhiên. Nói chung, EMS hoặc natri azit + MNU được sử dụng làm chất gây đột biến. Các hóa chất này ngẫu nhiên gây ra các thay đổi bazơ duy nhất trong ADN, thường là G và C được biến đổi thành A và T. Toàn bộ các tác dụng là không dự đoán được. Phần lớn các thay đổi này đều không có tác dụng đối với cây trồng do chúng nằm ngoài các vùng mã hóa của gen hoặc

không làm thay đổi trình tự axit amin của sản phẩm gen. Tuy nhiên, một số tạo ra các tính trạng mới hoặc hợp nhất các thay đổi ADN mới vào các dòng trước đó.

Cho đến gần đây, nhà chọn giống không kiểm soát trực tiếp các vị trí đột biến trong trình tự ADN. Việc nhận dạng các thay đổi hữu ích là do khả năng ngẫu nhiên rằng đột biến hữu hiệu sẽ được cảm ứng và rằng nhà chọn giống sẽ nhận biết được các hiệu ứng kiểu hình của thay đổi này và có thể chọn và nhân rộng cây lúa có đột biến đó.

Hạt giống được xử lý bằng hóa chất gây đột biến hoặc tác nhân khác và được trồng ngay để sinh trưởng và tạo ra hạt giống M2. Hạt giống M2 sẽ mang nhiều biến dị mới; do đó, không có trường hợp mà hai thí nghiệm lại tạo ra cùng tổ hợp. Trong số các biến dị này, các tính trạng mới trước đó không tồn tại ở cây lúa và không thể sử dụng được cho việc chọn lọc bởi nhà chọn giống cây có thể được phát hiện và được sử dụng để cải thiện cây lúa.

Để phát hiện các tính trạng mới, nhà chọn giống phải sử dụng các chiến lược chọn lọc hiệu quả do quy trình gây đột biến có tần số tổ hợp mới hữu ích cực thấp. Trong hàng ngàn biến thể di truyền mới được cảm ứng, có thể chỉ có một biến thể có tính trạng mới mong muốn. Hệ thống chọn lọc tối ưu sẽ chọn lọc qua hàng ngàn biến thể mới và cho phép phát hiện một vài hoặc thậm chí một cây duy nhất có thể mang tính trạng mới. Sau khi nhận dạng và phát hiện tính trạng mới có thể có, nhà chọn giống phải phát triển cây trồng mới bằng cách lai theo phả hệ hoặc lai ngược, tiếp theo là thử nghiệm nhân rộng để xác nhận tính trạng mới và cây trồng biểu hiện ổn định và giá trị truyền được cho giống lúa sản xuất.

Bằng cách sử dụng kỹ thuật di truyền tái tổ hợp, các phân tử axit nucleic có các đột biến mã hóa các đặc tính được cải thiện ở cây lúa, có thể được đưa vào cây lúa có các hệ gen thích hợp về mặt thương mại. Các phương pháp thao tác gen như CRISPR, và các kỹ thuật xác định trình tự hiện đại cho phép nhà chọn giống định hướng các cải thiện cây trồng phức tạp, và thúc đẩy tiến trình này đến việc thương mại hóa. Sau khi một đột biến được nhận dạng bằng phương pháp bất kỳ, nó có thể được chuyển vào cây lúa bằng các kỹ thuật tái tổ hợp, và kiểm tra để đảm bảo sự phù hợp không bị gây hại.

Tính kháng thuốc diệt cỏ ở cây lúa

Cỏ dại và các loài cạnh tranh khác về tài nguyên trong ruộng cây trồng cạnh tranh tài nguyên và làm giảm rất nhiều năng suất và chất lượng của cây trồng. Cỏ dại đã được phòng trừ ở cây trồng qua việc phun các thuốc diệt cỏ chọn lọc diệt cỏ dại, mà không làm

hại cây trồng. Thông thường, tính chọn lọc của thuốc diệt cỏ dựa trên các biến đổi hoặc khác biệt sinh hóa giữa cây trồng và cỏ dại. Một số thuốc diệt cỏ không có tính chọn lọc, nghĩa là chúng diệt tất cả hoặc hầu như tất cả các loại cây. Các thuốc diệt cỏ không chọn lọc hoặc phổ rộng có thể được sử dụng ở cây trồng nếu các gen mới được cài vào biểu hiện các protein đặc hiệu truyền tính dung nạp hoặc tính kháng thuốc diệt cỏ. Tính kháng thuốc diệt cỏ cũng đạt được ở cây trồng qua các đột biến di truyền làm biến đổi các protein và các quá trình sinh hóa. Các đột biến này có thể xảy ra trong tự nhiên, song hầu hết chúng được cảm ứng ở cây trồng *in vitro* trong các sản phẩm nuôi cấy mô hoặc bằng cách cảm ứng các đột biến *in vivo*. Không may là trong một số trường hợp, đặc biệt với việc sử dụng lặp lại thuốc diệt cỏ cụ thể, cỏ dại đã phát triển tính kháng qua sự chọn lọc không dự tính các đột biến tự nhiên tạo tính kháng. Khi cỏ dại trở nên kháng thuốc diệt cỏ cụ thể, thuốc diệt cỏ đó không còn hữu ích để phòng trừ cỏ dại. Sự phát triển tính kháng ở cỏ dại được trì hoãn tốt nhất bằng cách luân phiên sử dụng các kiểu tác động khác nhau để phòng trừ cỏ dại, ngăn cản sự phát triển của các cỏ có tính kháng.

Việc sản xuất lúa bị gây hại bởi các cây lá rộng và cụ thể là khó phòng trừ cỏ dại mà được gọi là lúa đỏ. Một khó khăn phát sinh là lúa đỏ rất giống về mặt di truyền với lúa trồng (đôi khi chúng thụ phấn chéo) mà chưa có thuốc diệt cỏ chọn lọc khả dụng để diệt lúa đỏ, mà không làm hại lúa trồng. Việc phòng trừ hiện được đề xuất trong sản xuất lúa thương mại qua việc phát triển các đột biến được phát hiện ở cây lúa làm cho cây lúa kháng thuốc diệt cỏ phổ rộng, tức là các thuốc diệt cỏ imidazolinon và sulfonylure. Lúa kháng thuốc diệt cỏ mà ức chế các cây có hại khác, như cây lá rộng, là cần có.

Đến nay, hầu hết các loại lúa dung nạp thuốc diệt cỏ đều liên quan đến sự thay đổi di truyền đơn lẻ, đáng chú ý là sự thay đổi trong enzym đích làm biến đổi đáp ứng của nó với chất ức chế. Các nguyên nhân phức tạp hơn của sự kháng/dung nạp có thể cần có để đưa vào cây, do chúng tiếp tục chuyển chỗ do các nguyên nhân tự nhiên, và tăng cản trở cỏ dại phát triển tính kháng.

Việc phát hiện các đột biến mới ở cây lúa làm cho nó kháng nhiều loại thuốc diệt cỏ, hỗn hợp thuốc diệt cỏ có các kiểu tác động thay thế, cụ thể tính kháng được tăng cường, có thể tạo thuận lợi lớn cho sản xuất lúa. Việc thu nhận và đưa các gen kháng thuốc diệt cỏ vào hệ gen cây lúa với các đặc tính phù hợp bổ sung, và các tính kháng thay thế là thách thức, không dự đoán được, tốn thời gian và đắt đỏ, song cần thiết để đáp ứng nhu cầu thực phẩm ngày càng tăng của thế giới.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được mô tả và bộc lộ trong bản mô tả này là các dòng lúa mới và khác biệt có các tính kháng độc nhất, trong một số tổ hợp là hiệp đồng, đối với thuốc diệt cỏ – cụ thể là các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza và HPPD, và hỗn hợp của chúng. Thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza bao gồm quizalofop, propaquizafop và fluazifop. Thuốc diệt cỏ ức chế HPPD bao gồm mesotrion, benzobixyclon, và hỗn hợp của chúng.

Các vùng di truyền liên quan đến sự kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ thuộc họ FOP

Sự phát triển quần thể đột biến và việc sàng lọc được thực hiện về tính kháng thuốc diệt cỏ FOP, cho phép nhận dạng hai vùng di truyền đột biến liên quan đến tính kháng Quizalofop. Một trong số các vùng gây ra tính kháng này, có ký hiệu là RTA1, được xác định là nằm trong locut đích đã biết của gen ACCaza trên nhiễm sắc thể 5. Do đó, nó là ví dụ điển hình cho tính kháng thuốc diệt cỏ đặc hiệu đích (TSR: Target Specific Resistance). Vùng khác, có ký hiệu là RTA2, được xác định là nằm trên nhiễm sắc thể 1, trong vùng chưa được thông báo trước đây là liên quan đến tính dung nạp thuốc diệt cỏ FOP, và không liên quan đến trình tự axit amin của ACCaza. Vùng thứ hai này dường như là trường hợp của tác nhân kháng không đặc hiệu đích (NTSR: Non-Target Specific Resistance).

Các nền di truyền là không giống nhau ở hai dòng RTA1 và RTA2. Một dòng được gây đột biến, dòng còn lại được chuyển ngược thành dòng thông thường.

Các dòng RTA1 và RTA2 là đồng hợp tử về các tính trạng kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza và là lai gần.

Các vùng di truyền gây ra tính dung nạp thuốc diệt cỏ của RTA1 và RTA2 có các tác dụng lặn thiết yếu cần đến tính đồng hợp tử để có tác dụng dung nạp hoàn toàn. Các dòng này được ký hiệu là "RTA1 và RTA2" song các thuật ngữ này cũng chỉ các đột biến đặc hiệu bên trong các dòng này. Các vùng này liên quan đến tính dung nạp thuốc diệt cỏ.

RTA1 tạo tính kháng bằng cơ chế TSR

Gen kháng bị đột biến RTA1, được xác định là đột biến điểm duy nhất trong ADN của gen ACCaza, trong đó nucleotit guanin (G) ở cây lúa không đột biến, kiểu dại, được thay bằng adenin trong ADN đột biến, tạo ra sự thay đổi trong trình tự axit amin glyxin thành serin (G thành S) trong vị trí đích protein được biểu hiện ảnh hưởng đến vị trí hoạt động đã biết trong protein này (G2096S). Điều này làm thay đổi tác động diệt cỏ ở vị trí liên kết then chốt trong enzym ACCaza (được tìm thấy trong lục lạp), ảnh hưởng đến sự liên kết của thuốc diệt cỏ với protein ACCaza, và phong bế quá trình biểu hiện độc tính

thực vật. Do đó, các cây mang đột biến không chết khi tiếp xúc với thuốc diệt cỏ. Đột biến được nhận dạng bằng cách phân tích trình tự của gen ACCaza và so khớp chính xác các đột biến kháng FOP giống hệt trong các vị trí tương đồng ở các cây trồng khác, và ở các loài thực vật.

RTA2 tạo tính kháng bởi cơ chế NTSR

Trong trường hợp của RTA2, đột biến liên quan đến sự kháng/dung nạp được lập bản đồ cho Chr.1 (không giống RTA1 nằm trên Chr.5), được chứng minh cả bằng phân tích bản đồ liên kết và bằng MutMap (lập bản đồ đột biến bằng chiến lược xác định trình tự toàn hệ gen). Trong vùng này của nhiễm sắc thể 1, chưa có thông báo về các gen ACCaza hoặc tương tự ACCaza được sao chép hoặc tiến hóa thẳng, gen đích của thuốc diệt cỏ FOP. Do đó, cơ chế dung nạp Quizalofop do đột biến RTA2 này gây ra, không thể được xác định đặc điểm là "vị trí đích". Thay vào đó, RTA2 được coi là vùng hoặc vị trí di truyền tính kháng "không phải vị trí đích", còn được gọi trong tài liệu chuyên ngành là tính dung nạp thuốc diệt cỏ "trên cơ sở không phải vị trí đích hoặc cơ chế" (NTSR).

Phòng trừ cỏ dại

Các dòng mới này có các khả năng phòng trừ cỏ dại được cải thiện.

Phương pháp phòng trừ cỏ dại trong ruộng lúa sử dụng cây lúa trong ruộng kháng nhiều thuốc diệt cỏ.

Ruộng lúa được tiếp xúc với ít nhất một thuốc diệt cỏ, hoặc nhiều thuốc diệt cỏ, ví dụ, thuốc diệt cỏ bất kỳ có thể thuộc về họ thuốc diệt cỏ được biết là chất ức chế ACCaza, hoặc thuốc diệt cỏ bất kỳ có thể thuộc về lớp thuốc diệt cỏ được biết là thuốc diệt cỏ ức chế HPPD.

Sản xuất cây lúa kháng thuốc diệt cỏ

Phương pháp trồng cây lúa kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ bao gồm các bước (a) trồng hạt lúa giống có tính kháng; (b) cho hạt lúa giống nảy mầm; (c) phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ cho mầm lúa ở mức mà thuốc diệt cỏ thường có thể ức chế sự sinh trưởng của cây lúa, và chọn các cây sống sót để nhân rộng.

Các phương pháp sản xuất cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ cũng có thể sử dụng gen chuyển hoặc nhiều gen chuyển, hoặc các phương pháp thao tác di truyền mới như CRISPR. Một phương án của phương pháp như vậy là biến nạp tế bào của cây lúa bằng gen chuyển, trong đó các gen chuyển này mã hóa 2 vùng di truyền khác nhau mà khi được tổ hợp sẽ dẫn đến tính kháng hiệp đồng đối với các chất ức chế ACCaza, hoặc HPPD và enzym

ACCaza để tạo tính dung nạp ở các cây lúa thu được đối với một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ. Tế bào thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để thực hiện các phương pháp này, ví dụ, tế bào có thể ở dạng mô sẹo.

Cây một lá mầm kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza, ở mức cao hơn so với mức dung nạp bởi các cây không có các vùng di truyền từ các hệ gen của các dòng lúa RTA2 và RTA1 hoặc các dòng tương đương, là thích hợp để phòng trừ cỏ dại và phát triển dòng mới. Các dạng tương đương có thể là các vùng di truyền có cùng kết quả mã hóa trên nhiễm sắc thể 5, và cùng vectơ chứa các đột biến như trên nhiễm sắc thể 1, với các tác dụng hiệp đồng khi được tổ hợp.

Vùng trong hệ gen của dòng lúa RTA2 là đột biến mã hóa thay thế glyxin thành serin ở vị trí 2096.

Vùng nhiễm sắc thể số 1 ở dòng lúa RTA2 nằm giữa vị trí C1-32083963 và C1-36386713 với các trình tự nucleotit đột biến như được thể hiện trong bảng 1A và 1B. Vùng này là vùng được liên kết sát nhau với các đột biến được thể hiện ở các vị trí cụ thể trong các bảng 1A và 1B. Khi các vectơ chứa các đột biến này có mặt trong cây lúa tác dụng RTA2 được thể hiện.

Hạt giống của cây lúa được bộc lộ trong bản mô tả này được lưu giữ dưới dạng các số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-122646 và 124233.

Phương pháp sản xuất cây lúa kháng thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, ở mức cao hơn đáng kể so với mức dung nạp bởi các cây không có các vùng di truyền tạo ra tính kháng bao gồm các bước:

a. thu nhận các vùng di truyền về cơ bản giống với các cùng trong các hệ gen của các cây lúa có ký hiệu RTA1 và RTA2 tạo tính kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza; và

b. đưa các vùng di truyền vào các dòng lúa để thay thế các vùng kiểu dại không tạo tính kháng thuốc diệt cỏ ở mức hữu ích cho cây trồng thương mại.

Các tế bào được tạo ra từ hạt giống kháng thuốc diệt cỏ, các cây được trồng từ hạt giống như vậy và các tế bào được tạo ra từ các cây như vậy, thế hệ con của các cây được trồng từ hạt giống như vậy và các tế bào được tạo ra từ thế hệ con như vậy là nằm trong phạm vi của sáng chế. Sự sinh trưởng của các cây được sản xuất từ hạt giống lưu giữ, và thế hệ con của các cây như vậy thường sẽ kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ, tức là ức chế ACCaza, ức chế HPPD hoặc cả hai, ở mức thuốc diệt cỏ mà thường có thể ức chế sự sinh trưởng của cây kiểu dại tương ứng. Có mức tự nhiên nhất định (không được cảm ứng) dung

nạp một số thuốc diệt cỏ, song các vùng này không thể bảo vệ cây ở mức mà có thể hữu ích về mặt thương mại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện thử nghiệm dung nạp tính trạng; cây thử nghiệm được trồng, mesotrion được phun ở tỷ lệ được chỉ rõ khoảng một tháng sau (giai đoạn 3-4 lá), và lần phun thứ hai được thực hiện theo hai đợt xử lý được chỉ rõ khoảng một tuần sau; cây lúa được đánh giá về phần trăm tổn thương hoặc hư hại so với cây lúa không được phun 21 ngày sau lần phun thuốc diệt cỏ thứ nhất; dòng ML0831266-03093 là dòng kháng HPPD và R0146 và P1003 là các dòng đối chứng không có đột biến được tạo ra; dòng PL1214418M2-73009 được chọn ra từ phép lai giữa dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 (giống là P1003) và dòng kháng ACCaza ML0831265-01493 (giống là R0146). Dòng mới được phát triển PL1214418M2-73009 thể hiện tính dung nạp tương đương so với dòng dung nạp HPPD ban đầu ML0831266-03093 đối với chất ức chế HPPD.

Fig.2 là đồ thị thể hiện thử nghiệm dung nạp tính trạng; cây thử nghiệm được trồng, quizalofop được phun ở tỷ lệ được chỉ rõ khoảng 5 tuần sau (bắt đầu đâm chồi); cây lúa được đánh giá về phần trăm tổn thương hoặc hư hại so với cây lúa không được phun bốn tuần sau khi phun thuốc diệt cỏ; dòng ML0831265-01493 là dòng kháng ACCaza và R0146 và P1003 là các dòng đối chứng; dòng PL1214418M2-73009 được chọn ra từ phép lai giữa dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 (giống là P1003) và dòng dung nạp ACCaza ML0831265-01493 (giống là R0146). Dòng mới được phát triển PL1214418M2-73009 mà có tính kháng kết hợp thể hiện mức độ tương đương hoặc tốt hơn so với dòng dung nạp ACCaza ban đầu ML0831265-01493.

Các hình vẽ từ Fig.3A đến Fig.3D là các ảnh chụp (Fig.3A) lô đất 70025, ML0831266-03093F2-2(2)A-1(1)A-P-USP-USA (HPPDi+HPPDni), Callisto, 2 lần phun, trước khi nảy mầm/trước khi tưới 210/210 g hoạt chất/ha; (Fig.3B) 15SAT1, lô đất 03, 1x1x, RTA1, 2 lần phun, 2 lá và trước khi tưới, 77+77 g hoạt chất/ha (Fig.3C); 15SAT1, lô đất 12, 1x1x_RTA2, 2 lần phun, 2 lá và trước khi tưới, 77+77 g hoạt chất/ha; và (Fig.3D) 15SAT1, lô đất 12, 1x1x_RTA1-RTA2, 2 lần phun, 2 lá và trước khi tưới, 77+77 g hoạt chất/ha.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm dung nạp tính trạng trong đó mesotrion được phun ở tỷ lệ được chỉ rõ khoảng 34 ngày sau khi trồng. (bắt đầu đâm chồi) cây lúa được đánh giá về phần trăm tổn thương hoặc hư hại so với cây lúa không được

phun bốn tuần sau khi phun thuốc diệt cỏ; dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 và dòng dung nạp kết hợp HPPD và ACCaza PL1214418M2-73009 thể hiện đáp ứng tương tự chỉ ra tính dung nạp HPPD hoàn toàn được phục hồi ở dòng mới; dòng PL1214418M2-73001 được chọn để chỉ mang đột biến dung nạp HPPD từ dòng HPPD ML0831266-03093 và dòng PL1214418M2-73013 được chọn để chỉ mang tính dung nạp không cảm ứng HPPD từ dòng HPPD ML0831266-03093; P1003 là dòng gốc không đột biến đối với dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093; lưu ý rằng vượt quá 420 g hoạt chất/ha, ngay cả dòng có tính kháng di truyền cũng có thể bị tổn thương.

Fig.5A và 5B là các ảnh chụp kết quả của thử nghiệm dung nạp tính trạng; phòng trừ cỏ dại bằng thuốc diệt cỏ mesotrion được phun trước khi trồng được đánh giá; các lô đất được trồng bằng thể lai của dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093; ngay trước khi trồng, lô đất bên phải Fig.5B được nhận mesotrion bằng cách phun với liều lượng 210 g hoạt chất/ha; lô đất bên trái Fig.5A không được phun thuốc diệt cỏ trước khi trồng hoặc sau nảy mầm; các ảnh được chụp bốn tuần sau khi trồng thể hiện các khác biệt về vẻ bề ngoài của cỏ dại.

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm dung nạp tính trạng, trong đó quizalofop được phun ở tỷ lệ được chỉ rõ khoảng 30 ngày sau khi trồng (giai đoạn 3-4 lá), và lần phun thứ hai được phun theo hai đợt xử lý được chỉ rõ. Cây lúa được đánh giá về phần trăm tổn thương hoặc hư hại so với cây lúa không được phun 21 ngày sau lần phun thuốc diệt cỏ thứ nhất; dòng ML0831265-01493 là dòng dung nạp ACCaza có đột biến RTA1; dòng ML0831265-02283 cũng dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza, tuy nhiên tính dung nạp này không xuất phát từ đột biến trong gen mã hóa ACCaza, R0146 là dòng gốc đối với cả hai dòng dung nạp ACCaza; P1003 là dòng đối chứng.

Fig.7 thể hiện kết quả của thử nghiệm lập bản đồ tính trạng đối với RTA2; quần thể F2 được tạo ra từ phép lai giữa dòng vô sinh đực tế bào chất A0109 và dòng dung nạp ACCaza ML0831265-02283; các cá thể F2 trong quần thể được định kiểu gen, phun quizalofop (116 g hoạt chất/ha) 26 ngày sau khi trồng, và đánh giá tính dung nạp quizalofop 19 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ; bằng cách sử dụng phần mềm lập bản đồ QTL, QTL chính về tính dung nạp được xác nhận trên nhiễm sắc thể một (được chỉ ra bằng mũi tên).

Fig.8 là biểu đồ tán xạ thể hiện kết quả của thử nghiệm lập bản đồ đột biến đối với RTA2; quần thể F2 được tạo ra từ phép lai giữa dòng dung nạp ACCaza ML0831265-02283 và dòng gốc R0146; quần thể F2 này được định kiểu gen, phun quizalofop (116 g

hoạt chất/ha), và đánh giá tính kháng quizalofop; chỉ có các đột biến bao gồm các đột biến kháng ACCaza sẽ tách ra trong quần thể; chỉ số SNP là thước đo về tỷ lệ kết quả xác định trình tự mang biến dị từ dòng không đột biến R0146; điểm số bằng một chỉ ra rằng tất cả các kết quả xác định trình tự đều có biến dị; 19 biến dị (đột biến) có chỉ số bằng một và được nhóm với nhau trên nhiễm sắc thể một (hình tròn) chỉ ra vị trí có thể có của đột biến gây ra tính dung nạp (SEQ ID NOS 9-27).

Fig.9 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm lập bản đồ tính trạng; quần thể F2 được tạo ra từ phép lai giữa dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 (cảm ứng HPPDi) và dòng dung nạp ACCaza ML0831265-01493; quần thể này được định kiểu gen, phun mesotrion ở 105 g hoạt chất/ha, đánh giá dung nạp mesotrion, và lại phun mesotrion ở 630 g hoạt chất/ha, và đánh giá tính dung nạp mesotrion; chỉ có các cây di truyền đột biến về tính dung nạp từ dòng gốc ML0831266-03093 được coi là sống được; bằng cách sử dụng phần mềm lập bản đồ QTL, QTL chính về tính dung nạp được xác nhận trên nhiễm sắc thể một (được chỉ ra bằng mũi tên) (trục X– số nhiễm sắc thể trong hệ gen; trục Y = điểm số, tương quan với kiểu hình) (lập bản đồ đột biến, nhiễm sắc thể 1).

Fig.10 thể hiện kết quả của thử nghiệm lập bản đồ đột biến; quần thể F2 được tạo ra từ phép lai giữa dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 và dòng gốc P1003; quần thể này được định kiểu gen, phun mesotrion ở 840 g hoạt chất/ha và đánh giá tính dung nạp mesotrion; chỉ có các đột biến bao gồm đột biến dung nạp HPPD tách ra trong quần thể; chỉ số SNP là thước đo về tỷ lệ kết quả xác định trình tự mang biến dị từ dòng P1003; điểm số bằng một chỉ ra rằng tất cả các kết quả xác định trình tự đều có biến dị; 10 biến dị (đột biến) có chỉ số bằng một và được nhóm với nhau trên nhiễm sắc thể một (hình tròn) chỉ ra vị trí có thể có của đột biến gây ra tính dung nạp (SEQ ID NOS 28-37).

Fig.11 là bảng thể hiện các dòng tách được nhận dạng trong quần thể F4; quần thể F4 được tạo ra từ các cá thể chọn lọc F2 mang cả hai tính dung nạp HPPD và ACCaza từ phép lai giữa dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 và dòng dung nạp ACCaza ML0831265-01493; mỗi hàng thể hiện một dòng khác và mỗi cột là gen đánh dấu phân tử bên trong QTL đối với đột biến dung nạp HPPD trên nhiễm sắc thể 1; việc quan sát mức độ dung nạp của các dòng này đối với thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion cho phép đột biến dung nạp này được lập bản đồ cho gen cụ thể.

Fig.12A và Fig.12B minh họa tỷ lệ đáp ứng của dòng đột biến ML0831266-03093, dòng (gốc) ban đầu không đột biến P1003, và loại lúa khác R0146; mesotrion được phun

khắp các lô đất ngay sau khi trồng ở tỷ lệ 210 g hoạt chất/ha; tỷ lệ đáp ứng được áp dụng ở giai đoạn 2-3 lá; đáp ứng được ghi lại 21 ngày sau khi phun trên lá. Fig.12A = các kết quả ban đầu và Fig.12B = các kết quả tiếp theo.

Fig.13 thể hiện trình tự ADN đối với vùng mã hóa carboxyl transfereaza trong gen mã hóa ACCaza; thay đổi nucleotit duy nhất (hộp) mã hóa đột biến từ RTA1 được nhận dạng trong dòng đột biến ML0831265-01493 có ký hiệu 09PM72399 (SEQ ID NO: 3). NIPPONBARE là đối chứng (SEQ ID NO: 1); R0146 (SEQ ID NO: 2) là dòng ban đầu được xử lý bằng chất phân bào tạo ra quần thể đột biến.

Fig.14 thể hiện việc so sánh các trình tự protein đối với vùng carboxyl transferaza của gen ACCaza; dòng với mã 09PM72399 (SEQ ID NO: 5) là dòng ML0831265-01493; dòng này thể hiện sự thay đổi của axit amin duy nhất (hộp) ở vị trí 2096, so với Black-Grass; R0146 (SEQ ID NO: 5) là dòng ban đầu được xử lý bằng tác nhân gây đột biến tạo ra quần thể đột biến. [NIPPONBARE là SEQ ID NO: 4]

Fig.15 thể hiện tỷ lệ đáp ứng của dòng đột biến ML0831266-03093, dòng ban đầu không đột biến P1003, và loại lúa khác R0146. Mesotrion được phun khắp các lô đất ngay sau khi trồng ở tỷ lệ 210 g hoạt chất/ha. Tỷ lệ đáp ứng được áp dụng ở giai đoạn 2-3 lá. Đáp ứng được ghi lại 21 ngày sau khi phun trên lá.

Fig.16 là lưu đồ về kiểu lai được sử dụng để tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ theo một số phương án về cây lúa được bộc lộ trong bản mô tả này.

Các hình vẽ từ Fig.17A đến Fig.17C thể hiện: Fig.17A thể hiện 2 lá chỉ phun mesotrion 0,5X; Fig.17B thể hiện 2 lá chỉ phun mesotrion 0,5X/Quizalofop 0,5X; và Fig.17C thể hiện 2 lá chỉ phun Quizalofop 0,5X. Fig.17D là các đồ thị thể hiện % tổn thương đối với đáp ứng với Tank Mix so với các lần phun theo trình tự đối với dòng được chồng ACCaza RTA1 + HPPDi + HPPDni.

Fig.18 thể hiện vị trí, trên nhiễm sắc thể 1, của các đột biến được nhận dạng bằng quy trình MutMap, khi được thực thi đối với QTL được lập bản đồ cho vùng đó với các chất đánh dấu dãy 44k, được xác định là locut ACCaza RTA2.

Fig.19 thể hiện các phân dòng F4 tái tổ hợp cải tiến được nhận dạng bên trong quần thể F3 lớn cho phép lập bản đồ chính xác cho các đột biến đã được lập bản đồ và để nhận dạng đột biến nguyên nhân liên quan đến tính kháng thuốc diệt cỏ RTA2. Thử thách các cây F3 này bằng liều 1X Quizalofop theo đó các cây dị hợp tử biểu hiện tổn thương gia tăng so với các cây đột biến đồng hợp tử, cho phép lập bản đồ chính xác sơ bộ thu hẹp vị

trí có thể có của đột biến nguyên nhân. Tiếp theo, các họ được tạo ra từ F4 được tái sàng lọc với cùng thuốc diệt cỏ/liều để nhận dạng đột biến nguyên nhân được xác định là Chr1QMM36160202_G-A.

Các hình vẽ từ Fig.20A đến Fig.20D thể hiện số liệu % tổn thương đáp ứng và ảnh các lô đất. Vật liệu được thử nghiệm bao gồm các dòng ACCaza kết hợp kháng chất ức chế ACCaza (RTA1 + RTA2), các dòng đơn RTA1 và RTA2 và chồng RTA1+HPPDi+HPPDni. Hai đợt phun (ở giai đoạn 2 lá và trước khi tưới) sử dụng cùng tỷ lệ cho cả hai đợt phun. Chồng ACCaza thể hiện không có tổn thương 4 tuần sau phun trước khi tưới ngay cả ở tỷ lệ 4X Quizalofop. Tổ hợp tính trạng này dung nạp đợt phun Quizalofop cao hơn đáng kể so với mỗi dòng đơn đột biến dung nạp ACCaza riêng rẽ. Fig.20A thể hiện lô đất đối chứng, Fig.20B thể hiện lô đất 1X Quizalofop, Fig.20C thể hiện lô đất 4X Quizalofop với chỉ có dòng kết hợp ACCaza sống sót. (tất cả các ảnh được chụp 4 tuần sau phun trước khi tưới), Fig.20D thể hiện thứ tự lô đất (từ trái qua phải) RTA1, RTA2, RTA1+ RTA2, RTA1+ HPPD i+ HPPDni, P1003, R0146.

Tóm tắt: dòng kết hợp ACCaza (G2096S + RTA2 1) thể hiện không có tổn thương 4 tuần sau phun trước khi tưới ngay cả ở tỷ lệ ghi nhãn 4X Quizalofop.

Các hình vẽ từ Fig.21A đến Fig.21E thể hiện ảnh lô đất và % tổn thương đáp ứng đối với các dòng ACCaza RTA1, RTA2, và các chồng RTA1+RTA2 cũng như chồng RTA2+HPPDi+HPPDni, khi được thử thách bằng các liều gia tăng của thuốc diệt cỏ FOP chính. Các dòng kết hợp kháng chất ức chế ACCaza (RTA1 + RTA2) thể hiện tổn thương ít hơn đáng kể so với dòng đơn đột biến 4 tuần sau phun trước khi tưới ở tỷ lệ phun cao hơn của tất cả các thuốc diệt cỏ FOP được thử nghiệm. Trong khi tổn thương ở dòng đột biến kết hợp ACCaza cao hơn không đáng kể so với Quizalofop trong thử nghiệm này so với các thử nghiệm trước đó, tổn thương là tối thiểu ngay cả ở tỷ lệ phun cao. Khác biệt giữa các mức dung nạp ở các tổ hợp tính trạng được thử nghiệm trở nên càng rõ ràng khi phun tỷ lệ càng cao. Propaquizafop tiếp tục gây ra tỷ lệ tổn thương cao nhất ở tất cả các tổ hợp tính trạng. Fluazifop ở tỷ lệ 2X hoặc ít hơn dường như nhìn thấy được với tổ hợp tính trạng bất kỳ chứa RTA1, song ở 4X chỉ có dòng ACCaza kết hợp thể hiện tổn thương tối thiểu. Fig.21A thể hiện đối chứng không được xử lý, Fig.21B thể hiện 4X Quizalofop, Fig.21C thể hiện 4X Fluazifop, Fig.21D thể hiện 4X Propaquizafop. 4 tuần sau phun trước khi tưới. Thứ tự lô đất (từ trái qua phải) G2096S, RTA2, G2096S + RTA2, G2096S + HPPD, P1003, R0146. Fig.21E thể hiện bằng đồ thị.

Các hình vẽ từ Fig.22A đến Fig.22D thể hiện L đến R; RTA1; Fig.22A đối chứng, Fig.22B Quizalofop 1X, Fig.22C Quizalofop 2X, và Fig.22D Quizalofop 4X; Fig.22E-Fig.22H thể hiện RTA1-RTA2; Fig.22E đối chứng, Fig.22F Quizalofop 1X, Fig.22G Quizalofop 2X, và Fig.22H Quizalofop 4X. Các ảnh ở 9 tuần sau phun trước khi tưới.

Fig.23 thể hiện năng suất đáp ứng đối với các sản phẩm ACCaza RTA1, RTA2 và các dòng đột biến RTA1+RTA2, khi được thử thách bằng các thuốc diệt cỏ khác nhau thuộc họ chất ức chế ACCaza FOP Quizalofop, Fluazifop và Propaquizafop. Năng suất đáp ứng sau khi phun quizalofop ở giai đoạn 2 lá và trước khi tưới theo thứ tự.

Fig.24 thể hiện % tổn thương đáp ứng và đối với các sản phẩm ACCaza RTA1, RTA2 và các dòng đột biến RTA1+RTA2, khi được thử thách bằng các thuốc diệt cỏ khác nhau thuộc họ chất ức chế ACCaza FOP là quizalofop, fluazifop và propaquizafop sau giai đoạn tuần tự và trước khi tưới.

Mô tả chi tiết sáng chế

1. Sự kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza hiệp đồng

Việc sàng lọc quần thể đột biến trong ở RiceTec, đối với thuốc diệt cỏ FOP, cho phép nhận dạng được hai vùng nhiễm sắc thể đột biến, RTA1 và RTA2, độc lập tạo ra tính dung nạp các thuốc diệt cỏ này. Mỗi dòng đột biến dung nạp được tạo ra một cách độc lập này được cải tiến và đánh giá sau bước sàng lọc sơ bộ, để xác định tiếp các biến thể mới này, đánh giá tác dụng dung nạp của chúng, xác định đột biến nguyên nhân hoặc các đột biến quy định các kiểu hình mới và đánh giá tiềm năng thương mại của chúng. Việc hoàn thiện các nghiên cứu này cần đến vài cải tiến và thực nghiệm quần thể. Các nghiên cứu này bao gồm, dưới dạng mục tiêu chính, việc lập bản đồ liên kết gen đánh dấu ADN/QTL đối với kiểu hình để tìm ra vị trí nhiễm sắc thể; các nghiên cứu tác động gen; các nghiên cứu liều, thời gian phun và thuốc diệt cỏ để đánh giá đặc điểm sản phẩn cũng như xác định trình tự toàn hệ gen/phân tích bản đồ đột biến để xác định đột biến liên quan đến các kiểu hình này. Các nghiên cứu khác bao gồm việc chồng hai đột biến này trong nền di truyền duy nhất cũng được thực hiện để đánh giá tương tác giữa các thể đột biến được phát triển độc lập và tác dụng đối kháng hoặc hiệp đồng tiềm năng về tính dung nạp thuốc diệt cỏ FOP.

Gen dung nạp đột biến RTA1, được tìm thấy để lập bản đồ một cách chính xác vị trí của gen đích đã biết đối với họ thuốc diệt cỏ này, sự ngăn cản quá trình sinh tổng hợp lipit, locut của enzym axetyl CoA, trong đó thể hiện rõ tính kháng vị trí đích (TSR). Trong

TSR thông thường, alen đột biến có cải biến mà tạo điều kiện cho sự thay đổi axit amin trong protein được biểu hiện dẫn đến ngăn cản, hoặc phong bế, sự tương tác bình thường với thuốc diệt cỏ, theo đó ngăn cản, hoặc giới hạn, sự biểu hiện độc tính với cây. RTA1 sau đó được xác định, qua phân tích bản đồ đột biến, là đột biến điểm duy nhất trong ADN của gen ACCaza nhờ đó nucleotit Guanin trong kiểu dại được thay bằng Adenin trong thể đột biến, dẫn đến thay đổi về axit amin (G thành S) trong protein được biểu hiện tại một trong số các vị trí liên kết then chốt trong đó axetyl-coA và thuốc diệt cỏ FOP tương tác tạo ra độc tính cho cây. Thay đổi này tại vị trí liên kết then chốt trong enzym ACCaza (được tìm thấy trong lục lạp), làm giảm ái lực với thuốc diệt cỏ, ngăn cản việc phong bế hoạt tính ACCaza và khả năng gây độc cho cây. Do đó, các cây mang đột biến không chết bởi thuốc diệt cỏ. Đột biến được nhận dạng bằng cách phân tích trình tự và so khớp chính xác các đột biến kháng FOP giống hệt trong các vị trí tương đồng ở các cây trồng khác, đối với cùng gen ACCaza.

Trong trường hợp của RTA2, đột biến hoặc các đột biến liên quan đến tính dung nạp được định vị trên nhiễm sắc thể 1, như được thể hiện bằng phân tích liên kết/QTL và bằng cách xác định trình tự-lập bản đồ đột biến. Do trong vùng này của cây lúa (nhiễm sắc thể 1) không có thông báo về các gen ACCaza hoặc tương tự được sao chép hoặc tiến hóa thẳng, gen đích thuốc diệt cỏ FOP, giả thiết rằng RTA2 thể hiện tính kháng không phải ở vị trí đích (NTSR).

Các phương án về các dòng lúa đột biến có ký hiệu ML0831265-01493 (số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-12933, đột biến G2096S, sau đây ký hiệu là "RTA1") và ML0831265-02283 (số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-13619 ("RTA2")) là kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza riêng rẽ hoặc kết hợp. (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ 9370149 B2).

Bảng 1A và 1B thể hiện trình tự và thông tin di truyền đối với vùng trong RTA2 liên quan đến tính kháng thuốc diệt cỏ. Vùng này tổ hợp với RTA1 (G2096S) tạo ra tính kháng hiệp đồng hầu như độc lập đối với thuốc diệt cỏ FOP. Việc chồng lắp các kết quả thu được từ việc lập bản đồ tác dụng dung nạp thuốc diệt cỏ và việc lập bản đồ chính xác của thể tái tổ hợp F3-4, với bản đồ đột biến, đã nhận dạng được 26 đột biến nêu trên, trái ngược với cả hai tham chiếu trình tự *O. sativa (ssp indica)*, và *O. sativa (ssp japonica)*, là các nhân tố giả định trong tính dung nạp thuốc diệt cỏ không phải ở vị trí đích RTA2.

Vectơ chứa các đột biến liên quan mật thiết trên nhiễm sắc thể 1 liên quan đến tác dụng hiệp đồng tác động đến tính dung nạp thuốc diệt cỏ khi được tổ hợp với RTA1. Đột biến RTA2 trước hết được lập bản đồ cho đột biến làm thay đổi G thành A trong trình tự mã hóa axit nucleic của gen ZOS1-16 mã hóa protein ngón tay kẽm C2H2 từ *Oryza sativa* ở vị trí cặp bazơ 3660202 của cây lúa trên vùng nhiễm sắc thể 1. Vùng này, tương quan với đáp ứng hiệp đồng đối với chất ức chế ACCaza, chưa được thông báo trước đó ở cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ. Chưa có thông báo nào về vùng khác của cây lúa trên nhiễm sắc thể 1 tạo ra tính kháng quizalofop. Khi RTA2 có mặt ở cây lúa, tính kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza gia tăng, song đột biến kháng/dung nạp chất ức chế ACCaza là tốt nhất khi được tổ hợp với cây lúa cũng biểu hiện đột biến RTA1.

Do mức độ cụ thể của tính dung nạp thuốc diệt cỏ của các cây RTA1 và RTA2 riêng rẽ là vừa phải hoặc thấp, như được đề cập trước đó, các phép lai được thực hiện giữa các dòng đột biến RTA1 và RTA2 để tạo ra tổ hợp chồng của cả hai cơ chế và các tương tác có thể có giữa tổ hợp di truyền mới này được tìm kiếm. Sản phẩm chồng cuối nhanh chóng thu được bằng phép chọn lọc có trợ giúp bởi gen đánh dấu (Marker Assisted Selection: MAS) đơn giản đối với thể đơn bội kháng nhiễm sắc thể 1 bằng cách sử dụng các gen đánh dấu C1-3208396 và C1-36386713, và bằng cách sử dụng các gen đánh dấu đối với locut ACCAza trên nhiễm sắc thể 5. Các thử nghiệm về liều thuốc diệt cỏ, thời gian phun và hoạt chất, được thực hiện trên dòng đồng hợp tử kép RTA1-RTA2 chỉ ra rằng tồn tại tác dụng hiệp đồng rất mạnh giữa hai biến thể dung nạp độc lập, nhờ đó thể đột biến đồng hợp tử kép dung nạp, tại cửa sổ đầu tới hạn của đợt phun mong muốn (giai đoạn 2 lá), liều cực đại 5670 g/ha (80 ao-xơ/mẫu Anh), Quizalofop không có khả năng gây độc cho cây, có tác dụng tạo ra tính dung nạp hầu như độc lập với liều, nhờ đó hầu hết các thể đột biến ACCaza được cảm ứng hoặc tự phát được thông báo chỉ dung nạp các đợt phun liều thực địa.

Việc chồng cả hai đột biến di truyền được lấy ví dụ bằng hạt giống lưu giữ tại ATCC PTA-122646 (RL-122546-8). Tính kháng hiệp đồng chất ức chế ACCaza được quan sát thấy ở cây lúa có đột biến chồng.

Khác biệt giữa "thể cho đột biến chồng" và "chuyển hoán" (bảng 12) là ở chỗ RTA1 và RTA2 được nhận dạng độc lập từ cùng quần thể được gây đột biến R0146. Nhằm đánh giá các tác dụng hiệp đồng tiềm năng giữa hai locut độc lập, các dòng đồng hợp tử RTA1 và RTA2 được lai gần ở cấp độ F5, và thế hệ con F2 mang cả hai đột biến dung nạp thuốc

diệt cỏ đồng hợp tử được chọn để tạo ra thể cho chồng RTA1-RTA2 kép RL1225468 (PTA-122646).

Thể cho chồng RL1225468, là thể lai gần của các dòng F5 được tạo ra từ các quần thể đột biến ban đầu, mang các đột biến ngẫu nhiên qua toàn hệ gen. Để phát triển thể cho "sạch" chỉ mang các alen R0146 kiểu dại qua toàn hệ gen, ngoại trừ ở locut Chr5 ACCaza RTA1 và locut Chr1 RTA2, phép lai ngược được thực hiện để chuyển các alen đột biến vào dòng R0146 thông thường. Dòng 16USGE40004-34, là dòng chọn lọc BC3F3 từ giống lai ban đầu RL1225468/R0146, được lai ngược với R0146 ba lần, và nộp cho ATCC với số PTA-124233. Tính hiệp đồng xuất hiện trong việc sử dụng cả hai nền di truyền.

Đó là một kết quả đáng ngạc nhiên và bất ngờ khi phát hiện sự kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ được tác động bởi tổ hợp của đột biến trong enzym đích, được bộc lộ trong bản mô tả này là RTA1, với các đột biến RTA2 trong NTSR. Trên cơ sở phân tích trình tự, gen ACCaza được định vị trên nhiễm sắc thể 5 ở cây lúa. Một phần của gen này được sao chép trên nhiễm sắc thể 10, nhưng không có phần nào của gen ACCaza được thông báo trên nhiễm sắc thể 1.

So với TSR, trong đó cơ chế kháng thuốc diệt cỏ liên quan trực tiếp đến biến đổi trong protein/gen đích đã biết này, nhờ đó cơ chế kháng được kết luận rõ ràng, như với RTA1, các cơ chế NTSR khó xác định hơn nhiều, và cần có các nghiên cứu về gen lớn, tác động gen, và tương tác gen.

Giả thiết rằng NTSR đối với thuốc diệt cỏ FOP, có thể phát sinh do các cơ chế tạo ra tính kháng chuyển hóa như khoang hóa, phong bế vận động, khử độc, phong bế hoạt hóa hoặc các dạng khác ngăn cản khả năng gây độc cho cây. Tương tự, các nghiên cứu mới đây cho thấy rằng các ARN nhỏ (miARN) có thể tham gia vào các cơ chế 'điều hòa gen' dẫn đến NTSR. Nói chung, các cơ chế NTSR và tương tác phân tử liên quan đến thuốc diệt cỏ là các cơ chế phức tạp hơn so với được tìm thấy ở TSR.

Các cơ chế có thể có giải thích tác dụng hiệp đồng của các cây mang đột biến RTA1 và vùng RTA2 bao gồm phân hủy thuốc diệt cỏ bằng các quá trình sinh hóa (khử độc thuốc diệt cỏ), hoặc bằng cách giới hạn sự di chuyển thuốc diệt cỏ vào lạp lục (khoang hóa) hoặc các chức năng chuyển hóa khác ngăn cản thuốc diệt cỏ tác động đến enzym ACCaza. Việc khử độc thuốc diệt cỏ hoặc gián tiếp đóng vai trò 'chất điều hòa' trong các gen hoạt hóa tham gia vào quá trình bảo vệ tế bào như Cytochrome P450 mono-oxygenaza, glutathion transferaza, aryl axylamidiaza hoặc các enzym khác, là các cơ chế NTSR.

Có lợi đáng kể nếu chồng RTA1 và trước đây gọi là đột biến "ACCaza chưa được biết đến" (hiện nay gọi là RTA2), do tính hiệp đồng về sự kháng/dung nạp của cây lúa với cả hai đột biến trong hệ gen của chúng.

Lợi ích của các đột biến kép được minh họa trên các hình vẽ từ Fig.20 đến Fig.24.

Bảng 7 liệt kê các tiêu chuẩn để phân loại % tổn thương ở cây lúa được phun (tiếp xúc) thuốc diệt cỏ.

2. Nhận dạng đột biến nguyên nhân dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza ở dòng ML0831265-02283 (RTA2)

Thông thường, tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza được tạo ra từ đột biến trong vùng carboxyl transferaza của gen ACCaza, như là trường hợp của dòng dung nạp ML0831265-01493 (đột biến G2096S hoặc RTA1). Tuy nhiên, sau khi xác định trình tự vùng carboxyl transferaza của gen ACCaza ở dòng ML0831265-02283, không có đột biến nào được phát hiện. Kết quả này chỉ ra rằng tính dung nạp ở dòng ML0831265-02283 được tạo ra từ quá trình không phải ở vị trí đích.

Việc phát hiện đột biến nguyên nhân về tính dung nạp ở dòng ML0831265-02283 bao gồm việc lập bản đồ liên kết và lập bản đồ đột biến ("lập bản đồ mut") như được mô tả để phát hiện đột biến nguyên nhân và tính dung nạp tự nhiên đối với tính dung nạp HPPD ở dòng ML0831266-03093.

Việc lập bản đồ liên kết để tìm vùng nhiễm sắc thể hoặc QTL tạo ra tính dung nạp ở dòng ML0831265-02283 cần đến việc tách quần thể về tính trạng này. Quần thể này được tạo ra bằng cách lai dòng dung nạp với dòng tế bào chất vô sinh đực A0109. F1 thu được từ phép lai này được trồng và cho tự thụ phấn để tạo ra quần thể F2. Quần thể F2 được tách về tính dung nạp ACCaza. 800 hạt giống F2 được trồng và mô lá được thu từ các cây giống này để định kiểu gen mỗi cây. Khi cây giống đạt 3 tuần tuổi, toàn bộ quần thể F2 được phun quizalfop (116 g hoạt chất/ha). Cây giống đánh giá tính dung nạp 19 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ. Phần mềm lập bản đồ QTL chuẩn được sử dụng để phân tích kiểu gen của mỗi cá thể F2 và đáp ứng dung nạp liên quan để nhận dạng các gen đánh dấu phân tử liên quan đến tính dung nạp thuốc diệt cỏ. Sau phân tích này, vùng hệ gen (QTL) được xác nhận về tính dung nạp trên nhiễm sắc thể một (Fig.9). Các gen đánh dấu được liên kết nằm bên sườn QTL và các gen đánh dấu bên trong QTL nằm hai bên đỉnh của QTL được nhận dạng là thích hợp để chọn tính dung nạp thuốc diệt cỏ được tạo ra từ dòng ML0831265-02283. Khoảng 250 gen nằm giữa các gen đánh dấu nằm bên sườn.

Chiến lược lập bản đồ đột biến để tìm đột biến nguyên nhân như được sử dụng theo cách tương tự để tìm QTL về tính dung nạp đột biến HPPD. Bản đồ quần thể đột biến được tạo ra để tìm đột biến nguyên nhân qua xác định hệ gen bằng phương pháp xác định trình tự thế hệ kế tiếp. Dòng đột biến ML0831265-02283 được lai ngược với giống không đột biến ban đầu R0146. Thế hệ F1 của phép lai này được tự thụ phấn để tạo ra quần thể F2 tách đột biến gây ra tính dung nạp này. Chỉ có các đột biến tách ra trong quần thể này do đột biến là khác biệt hệ gen duy nhất giữa ML0831265-02283 và R0146.

Quần thể F2 được trồng dưới dạng các cá thể, và mô lá được thu và ADN được chiết từ mỗi cá thể để sử dụng cho việc định kiểu gen sau khi quần thể được định kiểu hình. Thuốc diệt cỏ ACCaza quizalofop được phun cho quần thể F2 ở giai đoạn 3-4 lá và nồng độ 116 g hoạt chất/ha. Các cá thể sống sót sau khi phun thuốc diệt cỏ được tính điểm là dung nạp và các cá thể chết được tính điểm là dễ tổn thương.

ADN được tạo ra từ nhóm gồm 20 cá thể F2 sống sót và 20 cá thể bị chết với mỗi nhóm được kết hợp với nhau và xác định trình tự cùng với cả hai dòng đột biến ML0831265-02283 và dòng giống không đột biến R0146. Việc lập bản đồ đột biến nguyên nhân dựa trên cơ sở chỉ số đánh giá tần suất của tất cả các đột biến trong khối đại diện cho các cá thể sống sót. Chỉ số này được tạo ra từ tỷ lệ kết quả xác định trình tự mang biến dị khác với dòng giống không đột biến R0146. Số kết quả xác định trình tự có biến dị càng nhiều thì chỉ số này càng gần với một và nếu tất cả các kết quả xác định trình tự đều có biến dị thì chỉ số này bằng một.

Việc phân tích các kết quả này cho thấy hai nhóm bao gồm 19 đột biến với 11 đột biến trên nhiễm sắc thể một với điểm chỉ số bằng một (Fig.10). Kết quả này xác nhận kết quả lập bản đồ liên kết QTL là các đột biến được nhận dạng ở đây đều được định vị bên trong vùng QTL được nhận dạng trên nhiễm sắc thể một bằng bản đồ liên kết. Các gen đánh dấu phân tử (SNP) được tạo ra cho mỗi đột biến (Bảng 4). Các gen đánh dấu này được sử dụng trong việc lập bản đồ chính xác để tìm đột biến nguyên nhân và để chọn giống dung nạp ACCaza được tạo ra từ dòng ML0831265-02283 trong các dòng lúa thương mại.

Như trong các thử nghiệm trước đó, tổn thương quan sát thấy ở RTA1 + RTA2 là rất thấp ở tất cả các tỷ lệ bất kể loại thuốc diệt cỏ. Fig.24 RTA1 thể hiện tổn thương phù hợp với các nghiên cứu trước đó với tỷ lệ tổn thương thấp hơn 10% với cả hai 1X Quizalofop và Propaquizafop, và tỷ lệ tổn thương khoảng 40% ở tỷ lệ phun 2X là thấp hơn

không đáng kể so với trung bình thực địa 2015. Tương tự như được quan sát thấy trước đó, tỷ lệ tổn thương đối với Fluazifop là thấp hơn nhiều so với mỗi thuốc diệt cỏ FOP còn lại. Số liệu năng suất thể hiện sự duy trì năng suất tốt ở RTA1 với cả hai tỷ lệ phun 1X và 2X Quizalofop. Tỷ lệ tổn thương cao hơn ghi nhận được đối với RTA1 ở 2X Quizalofop dường như không có tác dụng tiêu cực đến năng suất. RTA1 + RTA2 thể hiện năng suất giảm ở lô đất được xử lý so với lô đất đối chứng không được xử lý, song loại thuốc diệt cỏ hoặc tỷ lệ phun chỉ có tác dụng tối thiểu đến năng suất giữa các lô đất được xử lý.

3. Lập bản đồ đột biến để tìm đột biến nguyên nhân dung nạp HPPD

Phân tích bản đồ đột biến, bằng cách sử dụng cả hai trình tự hệ gen tham chiếu japonica (cây trồng Nipponbare) và indica (cây trồng 93-11) nhận dạng nhiễm sắc thể 1 đều liên quan đến kiểu hình dung nạp FOP.

Bản đồ quần thể đột biến được tạo ra để tìm đột biến nguyên nhân dung nạp qua xác định hệ gen bằng phương pháp xác định trình tự thế hệ kế tiếp. Dòng đột biến ML0831266-03093 được lai ngược với giống không đột biến ban đầu P1003. Thế hệ F1 của phép lai này được tự thụ phấn để tạo ra quần thể F2 tách đột biến gây ra tính dung nạp này. Chỉ có các đột biến tách ra trong quần thể này do đột biến là khác biệt hệ gen duy nhất giữa ML0831266-03093 và P1003.

Quần thể F2 được trồng dưới dạng các cá thể và mô lá được thu và ADN được chiết từ mỗi cá thể để sử dụng cho việc định kiểu gen sau khi quần thể được định kiểu hình. Trong phương pháp này, toàn bộ quần thể đều mang gen dung nạp tự nhiên làm cho quần thể dung nạp thuốc diệt cỏ mesotrion ở mức độ nhất định. Để phân biệt tính dung nạp tự nhiên từ đột biến nguyên nhân dung nạp, mesotrion được phun cho quần thể với tỷ lệ cao (840 g hoạt chất/ha) để cho tất cả các cá thể không có đột biến nguyên nhân dung nạp đều chết.

ADN được tạo ra từ nhóm gồm 20 cá thể F2 sống sót và 20 cá thể bị chết với mỗi nhóm được kết hợp với nhau và xác định trình tự cùng với cả hai dòng đột biến ML0831266-03093 và dòng giống không đột biến P1003. Việc lập bản đồ đột biến nguyên nhân dựa trên cơ sở chỉ số đánh giá tần suất của tất cả các đột biến trong khối đại diện cho các cá thể sống sót. Chỉ số này được tạo ra từ tỷ lệ kết quả xác định trình tự mang biến dị khác với dòng giống không đột biến P1003. Số kết quả xác định trình tự có biến dị càng nhiều thì chỉ số này càng gần với một và nếu tất cả các kết quả xác định trình tự đều có biến dị thì chỉ số này bằng một.

Đột biến duy nhất gây ra tính dung nạp mesotrion cao được dự đoán. Thay vào đó, số liệu thể hiện đỉnh đột biến mang điểm số bằng 1 bằng cách đưa thêm độ khó vào tìm đột biến nguyên nhân. Kết quả xác nhận rằng QTL trên nhiễm sắc thể 1 được tìm thấy qua bản đồ liên kết là vị trí hệ gen của đột biến nguyên nhân dung nạp (Fig.10). Trong đỉnh đột biến, 7 đột biến với chỉ số bằng một, không có đột biến nào là nguyên nhân rõ rệt gây ra tính dung nạp thuốc diệt cỏ mesotrion. Các gen đánh dấu được phát triển đối với đột biến để tạo điều kiện thuận lợi cho việc tìm (các) đột biến nguyên nhân kháng.

Nhóm gồm các dòng được xác nhận với các điểm tái tổ hợp được phân bố đều trong các QTL và các đột biến đã nhận dạng được (Fig.11). Các dòng này được phục hồi trong điều kiện đồng hợp tử đối với mỗi tái tổ hợp cho phép định kiểu hình tính dung nạp thuốc diệt cỏ trên nhiều cá thể (toàn lô đất). Việc phân tích các dòng này cho phép thu hẹp đột biến dung nạp và gen tự nhiên về vùng nhỏ của nhiễm sắc thể.

Nhờ chiến lược đã mô tả, các vùng hệ gen cụ thể chứa đột biến nguyên nhân dung nạp và gen dung nạp tự nhiên sẽ được biết và hữu ích để phát triển các sản phẩm thương mại. Các sản phẩm thương mại này là hữu ích cho sản xuất cây lúa do chúng sống sót trước việc phun thuốc diệt cỏ mesotrion ở tỷ lệ mà sẽ phòng trừ được các cỏ dại thịnh hành bao gồm lúa đỏ mà không gây hại cho cây lúa. Vị trí hệ gen cụ thể cho phép sử dụng các gen đánh dấu phân tử trên các vùng nằm bên sườn của mỗi QTL để chọn tính trạng dung nạp HPPD trong phát triển các sản phẩm thương mại.

Bản đồ di truyền của ba nhóm cá thể F2 bao gồm tập hợp gồm các cá thể được phun mesotrion chỉ ở 105 g hoạt chất/ha, nhóm tiếp theo được phun theo trình tự 630 g hoạt chất/ha, và nhóm cuối cùng được phun 420 g hoạt chất/ha thể hiện hai gen kiểm soát tính kháng mesotrion. Trong quần thể được phun 105 g hoạt chất/ha, QTL duy nhất được tìm thấy trên nhiễm sắc thể 2 có liên kết mạnh với gen đánh dấu SNP BG-id2004662 được tác động theo cách hầu như trội. Gen đánh dấu này và QTL nhận dạng tính dung nạp di truyền được ở dòng P1003. Gen đánh dấu này là hữu ích để lai và chọn các dòng dung nạp mesotrion mới. Việc phát hiện ra QTL này tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát triển thương mại các giống lúa mới với phương pháp mới phòng trừ cỏ dại qua việc sử dụng thuốc diệt cỏ mesotrion. Việc phát hiện ra gen đánh dấu được liên kết BG-id2004662 là phát hiện mới và chiến lược chọn lọc để lai và chọn tính dung nạp mesotrion và các thuốc diệt cỏ khác được tạo ra từ dòng P1003.

Trong hai nhóm cá thể F2 được phun mesotrion với tỷ lệ cao hơn (420 và 630 g hoạt chất/ha), QTL thứ hai được phát hiện có liên kết mạnh với gen đánh dấu SNP WG-id1002788. QTL này là vị trí di truyền đã được chứng minh của đột biến nguyên nhân về tính dung nạp mesotrion cao. Tính dung nạp kết hợp của QTL phát triển qua phép lai đột biến trên nhiễm sắc thể 1 và QTL phát hiện được ở dòng P1003 tạo ra tính dung nạp mesotrion mới và được tổ hợp với các gen đánh dấu phân tử được liên kết tạo điều kiện thuận lợi cho việc chọn giống nhanh và hiệu quả các giống lúa mới (Fig.16).

4. Cây lúa kháng cả hai chất ức chế ACCaza và HPPD

Các phương án về cây lúa kháng cả hai chất ức chế ACCaza và HPPD, bao gồm cây lúa có ký hiệu PL121448M2-80048 (số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-121362) và PL 1214418M2-73009 (ố hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-121398). (Bằng độc quyền sáng chế Mỹ 9303270 B2).

5. Phòng trừ cỏ dại

Các dòng lúa có các gen kháng thuốc diệt cỏ khác nhau, được xếp tháp hoặc chồng trên cùng nền di truyền hoặc, dưới dạng các sản phẩm đơn lẻ được sử dụng theo cách khác được người nông dân sử dụng quay vòng, là công cụ hoặc chiến lược then chốt trong việc kéo dài thời hạn hữu ích của thuốc diệt cỏ do chúng làm chậm sự phát triển của các biến thể kháng thuốc diệt cỏ trong các cỏ dại đích. Một số phương pháp có thể sử dụng để đưa các tính kháng này vào các thể lai hoặc các giống để phòng trừ cỏ dại, cũng như các phương án sản xuất hạt giống lai. Các dòng lúa được mô tả trong bản mô tả này là các phương pháp mới để phòng trừ cỏ dại ở cây lúa và có thể được triển khai ở chiến lược bất kỳ có thể có để phòng trừ cỏ dại và để sử dụng lâu dài các phương pháp này và các phương pháp phòng trừ cỏ dại khác. Cụ thể, cây lúa đột biến dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza hoặc HPPD, và dung nạp cả hai chất ức chế ACCaza và HPPD, được bộc lộ.

Nhờ việc phát triển các nguồn kháng nhiều thuốc diệt cỏ bao gồm các đột biến khác nhau tạo ra tính dung nạp nhờ tính cơ học khác nhau đối với cùng lớp thuốc diệt cỏ, có nhiều phương án khả dụng hơn để phòng trừ cỏ dại ở cây lúa. Các dòng lúa được bảo hộ có khả năng sử dụng thuốc diệt cỏ với kiểu tác động mới để phòng trừ cỏ dại. Ví dụ, khả năng sử dụng thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza kết hợp với chất ức chế HPPD, thể hiện kiểu tác động chưa được thông báo trước đó ở cây lúa. Việc sử dụng các dòng lúa này bao gồm tổ hợp các dòng kháng cùng loại thuốc diệt cỏ, song có kiểu tác động nguyên nhân khác, mang lại các phương án mới phòng trừ cỏ dại trong ruộng của người trồng do đó làm chậm

sự phát triển tính kháng cỏ dại. Một số phương pháp có thể sử dụng để đưa tính kháng này vào thể lai để phòng trừ cỏ dại cũng như các phương án sản xuất hạt giống lai, với các đột biến khác nhau.

Phương pháp kiểm soát sự sinh trưởng của cỏ dại bên cạnh cây lúa kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Một ví dụ về phương pháp như vậy là phun một hoặc nhiều thuốc diệt cỏ cho ruộng lúa ở các mức thuốc diệt cỏ mà bình thường có thể ức chế sự sinh trưởng của cây lúa. Ví dụ, ít nhất một thuốc diệt cỏ ức chế hoạt tính HPPD.

Nhằm tối đa hóa mức độ phòng trừ cỏ dại trong ruộng lúa, các thuốc diệt cỏ khác nhau có thể được cần đến để bao phủ phổ cỏ dại có mặt và, kết quả là, có thể cần đến vài đợt phun theo vòng đời cây trồng đối với một thuốc diệt cỏ cụ thể bất kỳ tùy theo sự chồng lắp giữa cửa sổ kiểm soát hữu hiệu được tạo ra bởi một đợt phun duy nhất và cửa sổ thời gian trong đó cỏ dại đích của nó có thể nảy mầm, thường lâu hơn so với thời gian phòng ngừa được tạo ra bởi đợt phun thuốc diệt cỏ duy nhất. Các điều kiện nhiệt độ và độ ẩm của đất là các yếu tố chính tác động đến cả hai cửa sổ hiệu quả của thuốc diệt cỏ, cửa sổ thời gian nảy mầm và sinh trưởng của cỏ dại. Trên cơ sở các yếu tố này, các mô hình kiểm soát thuốc diệt cỏ thường bao gồm việc phun lặp lại theo trình tự trong vòng đời cây trồng.

Trong hệ thống dung nạp thuốc diệt cỏ chuẩn, ví dụ, một hệ thống hiện được sử dụng thương mại ở cây lúa, để kháng thuốc diệt cỏ imidazolinon, đợt phun thứ nhất của thuốc diệt cỏ được thực hiện ở giai đoạn 2 lá, đợt phun thứ hai sau tối thiểu 10 ngày ngay trước khi tưới kéo dài khi cây đâm chồi. Mục đích của đợt phun thứ hai là loại trừ cỏ dại có thể đã nảy mầm sau đợt phun thứ nhất trước khi chúng có thể bị ức chế hữu hiệu bởi việc tưới. Trong một số tính trạng, bao gồm thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, thời gian phun thuốc diệt cỏ có thể là then chốt không những để phòng trừ hữu hiệu cỏ dại, mà còn để mức dung nạp được ghi nhận ở chính các cây này. Trong một tính trạng được phát triển ở RiceTec, tổn thương cây được quan sát thấy nhằm đáp lại việc phun thuốc diệt cỏ, liên quan mật thiết đến giai đoạn của cây. Ở dòng này, các đợt phun rất sớm sau nảy mầm gây tổn thương cao hơn nhiều ở giai đoạn 1 lá, với tổn thương quan sát được giảm ở mỗi giai đoạn sinh trưởng của cây qua chồi thứ nhất. Một số tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ thậm chí không dung nạp các đợt phun trước khi nảy mầm ngay cả khi tính dung nạp sau nảy mầm là cao. Đáp ứng với thuốc diệt cỏ thay đổi này liên quan đến giai đoạn sinh trưởng

của cây cần có thử nghiệm cẩn thận nhằm thiết lập giới hạn liều an toàn của sản phẩm dung nạp thuốc diệt cỏ mới.

Việc sản xuất lúa cho năng suất cao cần đến các biện pháp phòng trừ cỏ dại đặc hiệu. Một số thuốc diệt cỏ được phun dưới dạng trước khi nảy mầm, sau khi trồng nhưng trước khi cây nảy mầm; thuốc khác là sau khi nảy mầm. Trong trường hợp của cây lúa, việc phun sau khi nảy mầm có thể được thực hiện trước khi cây trồng được tưới, hoặc sau. Các lần phun ưu tiên thường là theo thời gian, theo giai đoạn phát triển của cây trồng, như được xác định bằng số lá mở ở cây đang sinh trưởng. Thời gian phun thuốc diệt cỏ là yếu tố quan trọng, không những từ khía cạnh tối đa hóa hiệu quả phòng trừ cỏ dại, mà còn từ khía cạnh làm giảm đến mức tối thiểu tác động đến cây trồng dung nạp thuốc diệt cỏ. Xem xét này xuất phát từ thực tế rằng tính kháng thuốc diệt cỏ nhờ gây đột biến, có trong tự nhiên hoặc chuyển gen thường không độc lập hoàn toàn với liều và tác dụng của thời gian phun. Các gen kháng thuốc diệt cỏ khác nhau có các đáp ứng liều khác nhau, cũng như đáp ứng với thời gian phun nhờ đó, thông thường, khả năng gây độc cho cây ở cây kháng gia tăng khi liều vượt quá mức nhất định, hoặc khả năng gây độc cho cây ở cây kháng thay đổi theo thời gian phun khác nhau đối với liều thuốc diệt cỏ đã cho.

Việc đánh giá các gen kháng thuốc diệt cỏ mới, là mục đích của sáng chế, được thực hiện với giới hạn liều thuốc diệt cỏ thích hợp bao phủ các tỷ lệ phun thường được sử dụng cho các công đoạn trồng lúa trong khi cũng tính đến các độ lệch có thể có so với các liều được khuyến cáo bởi nhà sản xuất. Bằng cách xem xét 1X, liều được nhà sản xuất khuyến cáo hoặc biện pháp tốt nhất, các liều bổ sung được đánh giá thường xuyên nhất là 2X và 4X với các thử nghiệm nhất định bao gồm các giá trị khác. Tham chiếu đến liều theo sản phẩm và hàm lượng hoạt chất được cung cấp trong Bảng 11.

Trong trường hợp của sản xuất lúa, phòng trừ lúa đỏ dại, là đích của thuốc diệt cỏ ức chế ACCza, và các cỏ dại lá rộng là đích của thuốc diệt cỏ ức chế HPPD mesotrion, được tận dụng tốt nhất trong các giai đoạn sớm của sinh trưởng thực vật, trước khi tưới, do bản thân kỹ thuật này, với sự có mặt của nước lặng, làm ức chế cỏ dại hữu hiệu, đều là trước khi thu hoạch. Tương tự, xét thấy đối với các thuốc diệt cỏ này khả năng gây độc cho cây kháng là cao hơn đối với cây con giống, trùng với cửa sổ kiểm soát tối ưu, các đánh giá về các gen kháng thuốc diệt cỏ mới này bao gồm lần phun chủ yếu ở giai đoạn 2 lá, và giai đoạn 4 lá, với việc tưới tốt hơn là xảy ra ở giai đoạn 5-6 lá.

6. Kết hợp thuốc diệt cỏ

Nhằm xem xét các tổ hợp gen kháng thuốc diệt cỏ, bất kể tổ hợp bao gồm hai hoặc nhiều kiểu tác động đối với cùng thuốc diệt cỏ, hoặc hai hoặc nhiều gen đối với thuốc diệt cỏ thuộc các họ hoặc chức năng khác nhau, các tương tác đối kháng hoặc hiệp đồng có thể được quan sát thu được từ các tương tác gen với gen, như một số phương án được mô tả trong bản mô tả này đã chứng minh. Tổ hợp của các gen đột biến mới kháng thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza RTA1 và RTA2, tạo ra tính dung nạp thuốc diệt cỏ ưu việt hơn nhiều so với tính kháng cộng gộp của hai gen hoạt động riêng rẽ, chứng tỏ tính hiệp đồng. Tính dung nạp thuốc diệt cỏ là do hai cơ chế tác động tạo ra tính kháng cùng thuốc diệt cỏ.

Tương tự, nhằm xem xét tổ hợp của các gen kháng thuốc diệt cỏ khác nhau, mỗi gen đặc hiệu với một họ thuốc diệt cỏ khác nhau, với hy vọng rằng tổ hợp này có thể cho phép bình phun trộn các thuốc diệt cỏ mà kết quả là làm giảm số lượt máy đi qua cây trồng, các tương tác hiệp đồng hoặc đối kháng có thể xảy ra giữa các sản phẩm thuốc diệt cỏ, như cũng được chứng minh bằng một số phương án được mô tả trong bản mô tả này. Tính kháng được tạo ra cho cây lúa bởi gen G2096S, khi được thử thách bằng thuốc diệt cỏ thuộc họ chất ức chế ACCaza, là cao hơn đáng kể so với tính kháng được thể hiện bởi cây lúa mang cả hai gen RTA1, cũng như các gen HPPD1i + HPPD2ni tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD mesotrion. Nếu cây này được thử thách bằng bình trộn chứa cùng liều thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza được tổ hợp với liều làm việc tương đương của mesotrion. Khi các thuốc diệt cỏ khác nhau được phun riêng rẽ, theo thứ tự bất kỳ, và khoảng thời gian được phép giữa các đợt phun, đáp ứng với thuốc diệt cỏ là giống như quan sát thấy ở các dòng mang các gen đơn lẻ tương ứng. Các tác dụng này cho thấy tương tác đối kháng giữa các chế phẩm, khi hai thuốc diệt cỏ được kết hợp trong bình để phun cho cây trồng. Quan sát này được thực hiện khi kết hợp quizalofop với mesotrion.

Vật liệu và phương pháp

Thiết lập quần thể đột biến

Chương trình chọn giống đột biến được khởi tạo để phát triển các dòng kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ độc quyền. Quần thể đột biến di truyền được tạo ra bằng cách cho khoảng 10000 hạt giống (ước tính theo trọng lượng trung bình của hạt) của ba dòng lúa bao gồm P1003, R0146, và P1062 tiếp xúc với cả hai chất gây đột biến natri azit (AZ) và metyl-nitrosoure (MNU). Các hạt giống đã xử lý được đem trồng. Các cây riêng rẽ được thu hoạch tạo ra 8281 dòng đột biến tiềm năng. Dòng được duy trì ổn định dưới dạng quần thể đột biến di truyền để sàng lọc tính trạng.

Dòng phục hồi kiểu *Indica* R0146, thể hiện sự thích nghi với các điều kiện trồng của Mỹ, được đưa vào chương trình RiceTec Breeding Program và lai với 4 dòng R phục hồi RiceTec khác để khởi tạo các quần thể cần cho việc đánh giá. Do có nguồn gốc khác so với các dòng RiceTec R hoạt tính tại thời điểm này, hy vọng rằng R0146 có thể cung cấp các gen phục hồi mới cho kho di truyền RiceTec. Vì có tính thích nghi cao, kiểu, năng suất và khả năng phục hồi, nên việc sử dụng R0146 và các dòng chọn lọc sớm của nó gia tăng ổn định trong chương trình RiceTec Breeding Program của Mỹ. Do R0146 và các dòng chọn lọc của nó trở nên ngày càng quan trọng trong dây chuyền chọn giống của Mỹ, việc ứng dụng chúng cũng được mở rộng cho chương trình chọn giống RiceTec South America trong đó chúng cũng thể hiện hiệu năng nổi bật. R0146 là dòng phục hồi nổi bật do có khả năng thích nghi rộng nhất khắp các vị trí thử nghiệm, và khả năng kết hợp cao nhất với các dòng cái khác nhau, và luôn tạo ra tổ hợp lai có hiệu năng cao. Quyết định được thực hiện là sử dụng R0146 làm dòng phục hồi duy nhất để trải qua quá trình đột biến nhằm phát hiện các tính trạng dung nạp thuốc diệt cỏ. Không có dòng nào khác tại thời điểm này mà có mức độ thâm nhập vào dây chuyền chọn giống RiceTec như vậy, điều này xác định R0146 là đối tượng tốt nhất cho ứng dụng nhanh và rộng các gen mới tìm thấy nhờ nỗ lực gây đột biến.

Tính dung nạp/kháng chất ức chế ACCaza được tăng cường

Hiệu lực của dòng đột biến ML0831265-02283 dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza.

Sau khi sàng lọc quần thể đột biến lớn, dòng ML0831265-02283 cũng sống sót khi phun thuốc diệt cỏ ACCaza quizalofop. Dòng được nhân lên để thu được hạt giống đủ cho các thử nghiệm lớn hơn để đánh giá tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza. Tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza ở dòng ML0831265-02283 được thử hiệu lực bằng cách trồng trong các lô đất ruộng (5 ft x 10 ft) gồm dòng, dòng gốc không đột biến R0146, dòng không đột biến thứ hai P1003, và dòng dung nạp ACCaza ML0831265-01493. Thuốc diệt cỏ ACCaza quizalofop được phun ở giai đoạn 4 lá ở bội số 0,5X, 1x, 2x, và 4x của tỷ lệ ghi nhãn (77 g hoạt chất/ha). 21 ngày sau khi thuốc diệt cỏ được phun, các lô đất được đánh giá % tổn thương gây ra cho cây lúa trên cơ sở các lô đối chứng không phun thuốc diệt cỏ (Fig.6). Số liệu xác nhận tính dung nạp của dòng ML0831265-02283 và thậm chí có thể mang tính dung nạp lớn hơn dòng ML0831265-01493 như được thể hiện bởi tổn thương ít hơn ở tỷ lệ 2x và 4x quizalofop.

Phát triển tính dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế HPPD và ACCaza bằng cách kết hợp tính dung nạp ở dòng ML0831266-03093 và ML0831265-01493

Thuốc diệt cỏ nhắm đích enzym HPPD, chủ yếu phòng trừ cỏ dại lá rộng. Tuy nhiên, các thử nghiệm ở cây lúa cho thấy sự phòng trừ chủ yếu cỏ dại ở cây lúa, bao gồm lúa dại đỏ, đặc biệt với thuốc diệt cỏ mesotrion.

Mặt khác, đích cỏ dại chủ yếu của thuốc diệt cỏ ACCaza là cây một lá mầm bao gồm lúa, cỏ dại, và lúa đỏ. Tuy nhiên, một số thuốc diệt cỏ ACCaza có hoạt tính thấp hơn với lúa. Hoạt tính yếu này có thể được truyền cho lúa đỏ do cây này có liên quan mật thiết. Việc kết hợp tính dung nạp HPPD và tính dung nạp ACCaza vào dòng lúa duy nhất cho phép phòng trừ cỏ dại phổ rộng cho cây lúa. Thuốc diệt cỏ HPPD phòng trừ các cỏ lá rộng và tăng cường tác dụng của thuốc diệt cỏ ACCaza để phòng trừ cỏ dại một lá mầm bao gồm lúa đỏ.

Việc kết hợp tính dung nạp HPPD và tính dung nạp ACCaza vào dòng lúa duy nhất được khởi tạo bằng dự án lập bản đồ tính dung nạp HPPD bằng cách lai dòng dung nạp HPPD ML0831266-03093 với dòng dung nạp ACCaza ML0831265-01493. Trong bản đồ quần thể, các cây F2 được chọn cho tính dung nạp HPPD bằng cách phun mesotrion trước hết ở tỷ lệ thấp (105 g hoạt chất/ha) tiếp theo là ở tỷ lệ cao (630 g hoạt chất/ha). Trong quy trình này, các gen đánh dấu phân tử cũng được phát triển cho phép chọn tiếp tính dung nạp HPPD bằng các gen đánh dấu hoặc sàng lọc tính dung nạp thuốc diệt cỏ hoặc cả hai.

Sau khi nhận dạng các cây dung nạp thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion, chúng cũng được thử nghiệm với gen đánh dấu chức năng dung nạp ACCaza cho đột biến RTA1 ở dòng gốc cho ACCaza ML0831265-01493. Thông tin để phát triển các gen đánh dấu ACCaza RTA1 là trên Fig.13, 14.

Sau quy trình này, nhóm gồm 25 cây F2 có đột biến ACCaza cho tính kháng thuốc diệt cỏ, và tính kháng thuốc diệt cỏ HPPD di truyền trên nhiễm sắc thể 1 và nhiễm sắc thể 2, ít nhất là trong điều kiện dị hợp tử, được nhận dạng. Các cây được chuyển sang ruộng khác để thu hoạch khi trưởng thành. Trong số 25 cây, 8 cây đồng hợp tử với đột biến ACCaza và một cây đồng hợp tử với đột biến ACCaza, đột biến dung nạp HPPD, và gen dung nạp không cảm ứng. 25 cây được đóng bao khi cuốc xới và hạt giống được thu hoạch khi trưởng thành từ mỗi cây riêng rẽ.

Nhóm cây trưởng thành sớm được thu hoạch sớm nhất có thể và hạt giống trồng trong nhà kính để giúp nhanh chóng tiến sang thế hệ F4. Việc chọn các cây F3 được thực

hiện bằng các gen đánh dấu phân tử nằm bên sườn đột biến dung nạp HPPD và dung nạp tự nhiên đột biến chức năng ACCaza. Các cây đồng hợp tử đối với tất cả các vùng hệ gen được chọn được chuyển sang thế hệ F5. Hạt giống F5 được xác nhận mang tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza và thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion. Trong các dòng F5, PL1214418M2-80048 được chọn do năng suất hạt giống cao và là đồng hợp tử đối với đột biến dung nạp ACCaza ở vị trí RTA1, đột biến dung nạp HPPD, và gen tự nhiên dung nạp HPPD. Hạt giống từ dòng PL1214418M2-80048 được lưu giữ tại ATCC và có số PTA-121362 (xem Bảng 12).

Dòng thứ hai được phát triển bằng cách trồng hạt giống F3 theo hàng. Cây được phun thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion và chọn cây ít hoặc không có tổn thương so với đối chứng không phun. Mô lá cũng được lấy và cây được thử nghiệm tính di truyền đột biến dung nạp ACCaza RTA1, tính dung nạp đột biến HPPD, và tính dung nạp không cảm ứng HPPD. Các cây đồng hợp tử với cả 3 gen dung nạp hoặc QTL được nhận dạng và thu hoạch. Hạt giống F4 (PL1214418M2-73009) được gom lại từ các cây mang cả 3 gen dung nạp hoặc QTL và dùng để thử nghiệm hoặc làm dòng cho mới đối với tính dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ ACCaza và HPPD. Hạt giống của nguồn PL1214418M2-73009 được lưu giữ tại ATCC và có số PTA-121398 (xem Bảng 5).

Tính dung nạp của các dòng mới kết hợp HPPD và ACCaza là tương đương và có thể chọn trong quần thể lai

Nguồn hạt giống PL1214418M2-73009 được phát triển từ phép lai giữa dòng kháng HPPD ML0831266-03093 và dòng kháng ACCaza ML0831265-01493 và đủ để cho phép thử xác nhận tính dung nạp chất ức chế HPPD và ACCaza tương đương ở các dòng mới. 2 thử nghiệm được thực hiện để đo sự phục hồi tính dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ ACCaza và HPPD ở dòng mới PL1214418M2-73009. Sự phục hồi tính dung nạp của dòng bằng cách kết hợp hai tính trạng minh họa rằng các tính trạng này có thể di truyền và có thể được sử dụng để tạo ra các giống hoặc thể lai mới mang tính kháng thuốc diệt cỏ. Các thử nghiệm này là quan trọng do nhiều khi khó phục hồi QTL phức tạp cho các tính trạng định lượng hoặc trong một số trường hợp đáp ứng tính trạng phụ thuộc vào nền di truyền. Trong thử nghiệm thứ nhất, dòng tính kháng mesotrion (thuốc diệt cỏ HPPD) được đánh giá bằng cách trồng dòng PL1214418M2-73009, dòng kháng HPPD ML0831266-03093 và dòng lúa kiểu dại P1003 và R0146 trong các lô đất (5 ft x 10 ft). Mesotrion được phun ở bội số 0,5X, 1x, 2x, và 4x của tỷ lệ phun ghi nhãn (210 g hoạt chất/ha). 2 đợt xử lý khác được bao

gồm với tỷ lệ 1x và 2x tiếp theo là đợt phun thứ hai 14 ngày sau đó với cùng tỷ lệ. Sự phục hồi hoàn toàn tính kháng HPPD từ dòng ML0831266-03093 đạt được ở dòng PL1214418M2-73009 như vốn có và dòng tính trạng ban đầu có cùng đáp ứng với các đợt phun thuốc diệt cỏ (Fig.1). Các kết quả này cho thấy rằng tính trạng kháng HPPD có thể được lai và chọn để phát triển các sản phẩm thương mại.

Thử nghiệm khác được thực hiện để xác nhận sự phục hồi tính kháng chất ức chế ACCaza từ đột biến RTA1 như ở dòng ML0831265-01493. Trong thử nghiệm này dòng mới PL1214418-73009 với tính dung nạp HPPD và ACCaza kết hợp được trồng theo hàng cùng với các dòng khác bao gồm dòng cho ban đầu ML0831265-01493 (trồng trong một lô đất), ML0831266-03093, P1003, dòng gốc R0146 đối với tính dung nạp ACCaza. Các dòng đều được thử nghiệm với thuốc diệt cỏ ACCaza fluazifop ở bội số 0,5X, 1x, 2x, và 4x của tỷ lệ phun ghi nhãn (210 g hoạt chất/ha) và quizalofop ở bội số 0,5X, 1x, 2x, và 4x của tỷ lệ phun ghi nhãn (77 g hoạt chất/ha). Trong các thử nghiệm này, ba dòng mới di truyền tính dung nạp ACCaza đều thể hiện tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza tương đương như dòng cho ML0831265-01493 (Fig.2).

Tính dung nạp thuốc diệt cỏ HPPD là phức tạp hơn so với tính dung nạp ACCaza do nó cần 2 gen khác với gen bị nhắm đích bởi thuốc diệt cỏ này. Mặc dù có tính phức tạp hơn này, tính dung nạp tương đương được phục hồi qua việc chọn cả hai gen dung nạp tự nhiên và dung nạp đột biến. Dòng gốc ACCaza ML0831265-01493 trong phép lai này rất nhạy với thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion và do đó không được mong đợi là tạo ra tính dung nạp HPPD. Sự kháng/dung nạp thuốc diệt cỏ HPPD hầu như gây ra chỉ bởi hai gen này do chúng là locut của quy trình chọn lọc, và dòng mới PL1214418M2-73009 thể hiện tính kháng tương đương. Các kết quả này cho thấy rằng tính kháng đối với cả hai chất ức chế ACCaza và HPPD được di truyền và có thể được lai trong cây lúa bất kỳ để phát triển thương lại cả hai tính kháng chất ức chế HPPD và ACCaza ở cây lúa.

Nhận dạng đóng góp tính dung nạp từ đột biến dung nạp HPPD và gen dung nạp không cảm ứng từ P1003

Trong quy trình lai để phát triển các dòng mới (PL1214418M2-80048 và PL1214418M2-73009) có sự kháng/dung nạp các thuốc diệt cỏ HPPD và ACCaza, hai dòng khác cũng được nghiên cứu để xác định đóng góp của đột biến dung nạp HPPD và gen tự nhiên dung nạp HPPD. Dòng PL1214418M2-73001 mang tính dung nạp ACCaza và chỉ có tính dung nạp HPPD, trong khi đột biến PL1214418M2-73013 mang tính dung

nạp ACCaza và chỉ có gen tự nhiên dung nạp HPPD. Các phép chọn lọc này cho phép ước tính tác dụng dung nạp của mỗi gen trong số hai gen cần cho tính dung nạp thuốc diệt cỏ HPPD. Tác dụng dung nạp của mỗi gen được đo bằng cách trồng dòng theo hàng đơn bao gồm dòng mới được phát triển PL1214418M2-73009 mang cả hai tính dung nạp HPPD từ đột biến và tính dung nạp không cảm ứng, dòng dung nạp HPPD ML0831266-0309, và dòng gốc không cảm ứng P1003. Các lô đất ruộng được phun ở giai đoạn 4 lá với thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion ở bội số 0,5X, 1x, 2x, và 4x của tỷ lệ phun ghi nhãn 210 g hoạt chất/ha.

Các lô được đánh giá 4 tuần sau khi thuốc diệt cỏ được phun. Kết quả thể hiện rằng gen dung nạp tự nhiên riêng rẽ (PL1214418M2-73013) cho mức dung nạp giống như dòng gốc P1003 (Fig.4). Kết quả này có thể được mong đợi nếu gen dung nạp tự nhiên định vị trên nhiễm sắc thể 2 định vị trong QTL nằm bên sườn các gen đánh dấu là nguồn nguyên nhân duy nhất về tính dung nạp ở dòng không đột biến P1003. Dòng PL1214418M2-73001 chỉ mang đột biến HPPD định vị trên nhiễm sắc thể 1 trong QTL nằm bên sườn các gen đánh dấu, thể hiện tính dung nạp trung gian giữa dòng không đột biến P1003 và dòng đột biến dung nạp HPPD ML0831266-0309. Kết quả này cho thấy rằng đột biến HPPD không những tăng cường tính dung nạp mà còn tạo ra mức dung nạp lớn hơn so với gen dung nạp tự nhiên. Ngoài ra, nó cũng cho thấy đột biến HPPD hoạt động độc lập so với gen dung nạp HPPD tự nhiên. Hai gen này cũng hoạt động theo cách cộng gộp như chỉ bằng cách kết hợp hai dòng ở dòng mới PL1214418M2-73009 mức dung nạp trở nên tương đương với dòng đột biến ban đầu ML0831266-0309.

Phòng trừ cỏ dại và lúa đỏ ở cây lúa có chất ức chế ACCaza và chất ức chế HPPD

Hoạt tính hoặc khả năng thuốc diệt cỏ phòng trừ cây lúa không đột biến, như dòng R0146 và P1003, là yếu tố dự đoán tốt về cách thuốc diệt cỏ sẽ phòng trừ lúa đỏ hoặc lúa hoang dại ở cây lúa. Lúa đỏ và lúa hoang dại là rất giống cây lúa, thậm chí có khả năng lai với cây lúa. Mức độ giống nhau này là lý do các cỏ dại này quá khó phòng trừ ở cây lúa. Dòng đột biến (ML0831265-01493, ML0831265-02283, ML0831266-03093, PL1214418M2-80048, và PL1214418M2-73009) được bộc lộ mang lại chiến lược phòng trừ cỏ dại đối với lúa đỏ, lúa hoang dại, các cỏ dại khác phổ biến ở cây lúa. Các dòng này giúp cho cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ mà bình thường sẽ diệt hoặc gây tổn thương làm giảm năng suất cho cây lúa.

Trong khi thử nghiệm các dòng dung nạp này, các dòng gốc cũng được thử nghiệm đóng vai trò đối chứng và là chỉ thị tiềm năng thương mại dưới dạng chiến lược phòng trừ lúa đỏ/lúa hoang dại. Các thử nghiệm này cho thấy rằng các đợt xử lý chọn lọc bằng thuốc diệt cỏ được phun riêng rẽ hoặc kết hợp và thời gian phun mang lại chiến lược phòng trừ cỏ dại mới ở cây lúa.

Cây lúa dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza nhất định, ví dụ cyhalofop được đăng ký để sử dụng ở cây lúa. Tuy nhiên, thuốc diệt cỏ ACCaza khác diệt hoặc gây tổn thương nặng cây lúa ở mức độ khác nhau. Sau khi thử nghiệm, một vài thuốc diệt cỏ khác này bao gồm fluazifop và quizalofop được phát hiện là phòng trừ tốt các cỏ dại phổ biến, như cỏ lồng vực nước, ở cây lúa. Việc phòng trừ cỏ dại phổ biến ở cây lúa cũng đạt được với mesotrion riêng rẽ, đặc biệt khi được phun trước khi trồng hoặc ở các tỷ lệ cao hơn (tỷ lệ ghi nhãn 2x của 210 g hoạt chất/ha) (Fig.5A và Fig.5B). Tỷ lệ được phun của cả hai loại thuốc diệt cỏ để phòng trừ cỏ dại là tốt trong phạm vi mức độ dung nạp của các dòng dung nạp ACCaza và HPPD bao gồm các dòng tổ hợp mang tính dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ HPPD và ACCaza.

Việc phát triển tính dung nạp HPPD và ACCaza trong dòng duy nhất (PL1214418M2-80048 và PL1214418M2-73009) tạo cơ hội cho chiến lược phòng trừ cỏ dại khác bao gồm các đợt phun thuốc diệt cỏ ACCaza và HPPD trong bình trộn hoặc đợt phun riêng rẽ ở các thời điểm khác nhau. Việc phun trước khi trồng rất hữu hiệu được thực hiện với thuốc diệt cỏ HPPD mesotrion giờ đây có thể được nối tiếp bằng thuốc diệt cỏ ACCaza được phun riêng rẽ hoặc kết hợp với thuốc diệt cỏ HPPD. Chiến lược này phòng trừ toàn bộ phổ cỏ dại ở cây lúa bằng cách phòng trừ cỏ dại lá rộng bằng thuốc diệt cỏ HPPD, và phòng trừ cỏ dại bằng thuốc diệt cỏ ACCaza. Ngoài ra, việc phòng trừ cỏ và lúa đỏ/lúa dại bằng thuốc diệt cỏ ACCaza được tăng cường đáng kể bởi hoạt tính mà thuốc diệt cỏ ức chế HPPD tạo ra. Chiến lược này được coi là đặc biệt hữu hiệu để phòng trừ lúa đỏ khi thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza được sử dụng có hoạt tính thấp hơn đối với cây lúa.

Hệ thống phòng trừ cỏ dại cụ thể này rất hữu ích ở cây lúa do một số cỏ dại, bao gồm lúa đỏ, phát triển tính dung nạp thuốc diệt cỏ hiện được sử dụng. Việc sử dụng chiến lược phòng trừ cỏ dại này cho phép xoay vòng các kiểu tác động khác nhau của thuốc diệt cỏ ở cây lúa. Bằng cách xoay vòng các kiểu tác động diệt cỏ, sự phát triển cỏ dại kháng được làm chậm lại hoặc được ngăn ngừa để cho phép sử dụng lâu dài tất cả các phương pháp phòng trừ cỏ dại có thể có.

Xác định hiệu lực của dòng đột biến ML0831266-03093 dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế HPPD

Sau khi sàng lọc sơ bộ "quần thể đột biến", dòng không bị hư hại được chọn và được thử nghiệm trong các thử nghiệm bổ sung bằng cách sử dụng các tỷ lệ khác nhau của thuốc diệt cỏ. Cụ thể, thử nghiệm về đáp ứng theo tỷ lệ được thực hiện trong đó hai tỷ lệ khác nhau của mesotrion được phun trước khi nảy mầm, cộng với lần phun trên lá bổ sung cũng được thực hiện. Thử nghiệm này phân biệt một dòng đột biến là có tính kháng ưu việt (tổn thương ít hơn) thuốc diệt cỏ mesotrion so với đối chứng (Fig.12A và Fig.12B). Thế hệ con của dòng này có ký hiệu ML0831266-03093 được duy trì dưới dạng dòng mới mang tính kháng thuốc diệt cỏ mesotrion. Dòng (ML0831266-03093) là nguồn kháng được lai ngược thành các dòng lúa độc quyền hoặc được sử dụng trực tiếp trong phép lai để phát triển các dòng lúa độc quyền mới. Các dòng được phát triển này là nguồn kháng thuốc diệt cỏ được sử dụng để phát triển các thể lai mới tạo ra kiểu tác động khác để phòng trừ cỏ dại ở cây lúa. Việc mang lại cơ hội này cho người trồng có giá trị lớn cả trong việc tạo ra năng suất cao và trong việc kéo dài thời hạn hữu ích của kỹ thuật phòng trừ cỏ dại khả dụng.

Dòng đột biến ML0831266-03093 được phát hiện là mang tính dung nạp mesotrion (thuốc diệt cỏ ức chế HPPD phổ biến) qua việc sàng lọc các dòng với các tỷ lệ khác nhau của thuốc diệt cỏ. Mức dung nạp của ML0831266-03093 được phát hiện là lớn hơn nhiều so với dòng không đột biến ban đầu (tự nhiên) P1003.

Dòng ban đầu P1003, mang tính dung nạp mesotrion tự nhiên. Tính dung nạp không cảm ứng này đôi khi ngăn cản tính kháng của dòng đột biến làm cho tính kháng tăng cường của dòng đột biến ML0831266-03093 trở nên không rõ ràng.

Việc xác định tiếp hiệu lực của của tính trạng bao gồm thử nghiệm dòng đột biến ML0831266-03093 với sự có mặt của các cỏ lúa phổ biến. Dòng đột biến hoàn toàn dung nạp tỷ lệ được phun của mesotrion trong khi quần thể cỏ thịnh hành được phòng trừ tốt bởi thuốc diệt cỏ (Fig.6A và Fig.6B). Mức phòng trừ cỏ dại này là hoàn toàn không mong đợi do mesotrion được ghi nhãn để phòng trừ cỏ lá rộng ở cây trồng một lá mầm. Kết quả này chỉ ra rằng mesotrion và các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác kết hợp với dòng ML0831266-03093 và các dòng được tạo ra, là hệ thống phòng trừ cỏ dại mới ở cây lúa. Hoạt tính cao của mesotrion đối với cỏ dại và các loại lúa nhất định chỉ ra rằng hệ thống này có thể được sử dụng để phòng trừ lúa đỏ ở cây lúa.

Mesotrion và các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác nhắm đích gen HPPD. Sự gia tăng tính dung nạp thuốc diệt cỏ có thể đạt được nhờ đột biến trong gen HPPD. Một đột biến trong trình tự gen có thể làm biến đổi cấu trúc enzym đủ để ngăn nó không bị ức chế bởi thuốc diệt cỏ, mà vẫn cho phép nó thực hiện chức năng sinh lý bình thường của nó. Giả sử đây là cơ chế dung nạp đáng tin cậy, gen HPPD được xác định trình tự bằng phương pháp Sanger ở cả hai dòng đột biến ML0831266-03093 và dòng ban đầu P1003. Ngạc nhiên là, không có đột biến nào được phát hiện trong gen HPPD. Tính dung nạp thuốc diệt cỏ ở dòng ML0831266-03093 dường như được tạo ra từ quy trình không phải ở vị trí đích.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Vị trí của đột biến có ký hiệu RTA2 liên quan đến tính dung nạp chất ức chế ACCaza

Quần thể MutMap là các cây F2 từ phép lai giữa dòng lúa R0146 X ML-083126502283F2. Các bức ảnh được chụp 16 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ.

Thuốc diệt cỏ Quizalofop được phun trên ruộng thử nghiệm. 30 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ, các cây thể hiện 'đáp ứng đen trắng' rất rõ ràng với thuốc diệt cỏ [thể hiện tính kháng thuốc diệt cỏ (điểm số là 1 hoặc 3) hoặc tính dễ tổn thương (điểm số là 7 hoặc 9) 16 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ. Các cây được tính điểm trước hết ở 16 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ và tiếp theo ở 21 ngày sau khi phun thuốc diệt cỏ.

Các cây đột biến mang 'đột biến chưa biết RTA2' là có tính kháng. Các cây 3 tuần tuổi được phun Quizalofop và đáp ứng thuốc diệt cỏ được tính điểm 21 ngày sau khi phun. Các triệu chứng dễ tổn thương đã được quan sát thấy 7 ngày sau khi phun Quizalofop, song việc tính điểm được thực hiện ở 21 ngày. Vào ngày 21, phần lớn các cây thể hiện đáp ứng 'đen trắng' rất rõ ràng với thuốc diệt cỏ, tức là, thể hiện tính kháng thuốc diệt cỏ (điểm số là 1) hoặc chết hoàn toàn (điểm số là 9). Một số cây có điểm số là 3 (hư hại ít trên lá hoặc sinh trưởng lá mới được quan sát thấy, và hầu hết các cây đều sống sót) hoặc có điểm số là 5 (một nửa mái che bị hư hại và khó dự đoán được cây có thể sống sót được hay không), hoặc có điểm số là 7 (hư hại nhiều hơn trên lá, cây sẽ không sống sót).

Sau khi phát hiện, các thể đột biến kháng ACCaza trong quần thể lúa R0146, phương pháp MutMap được sử dụng để xác định đặc điểm bằng phân tích liên kết (các) đột biến liên quan đến kiểu hình kháng Quizalofop.

Quy trình MutMap: Gây đột biến là cây lúa với trình tự hệ gen tham chiếu bằng etyl metan sulfonat (EMS). Thể đột biến được tạo ra, trong trường hợp này là kiểu hình nửa

lùn, được lai với cây kiểu dại cùng giống trước khi gây đột biến. F1 thu được được tự thụ phấn để thu được thế hệ con F2 tách ra các kiểu hình đột biến và kiểu dại. Việc lai thể đột biến này với dòng gốc kiểu dại đảm bảo phát hiện các khác biệt kiểu hình ở thế hệ F2 giữa đột biến và kiểu dại. ADN của các cây F2 biểu hiện kiểu hình đột biến được tập hợp và dùng cho việc xác định trình tự toàn hệ gen, tiếp theo là sắp hàng theo trình tự tham chiếu. Các SNP có kết quả đọc trình tự chỉ gồm các trình tự đột biến (chỉ số SNP bằng 1) được giả định là liên quan mật thiết với SNP nguyên nhân đối với kiểu hình đột biến.

Dấu hiệu mạnh nhất của các đột biến giả định liên quan đến tính kháng chất ức chế ACCaza được quan sát thấy trên Nhiễm sắc thể 1, với chuỗi đột biến trình tự có chỉ số SNP cao nhất.

Vùng nguyên nhân được định vị ở vùng trên nhiễm sắc thể 1 được nhận dạng trên Fig.18 và các bảng 1A, 1B và 2.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất cây lúa lai có tính kháng liều thấp một họ thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, FOP, bằng cách bổ sung gen kháng duy nhất trong liều alen duy nhất

Tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza bởi ML0831265-01493 được triển khai riêng rẽ trong các thể lai qua giống cái hoặc giống đực dẫn đến hạt giống lai kháng thuốc diệt cỏ. Nếu tính kháng được triển khai chỉ trong giống đực, thì ngoài việc sử dụng nó để phòng trừ cỏ dại, thuốc diệt cỏ khi được phun cho hạt giống lai sẽ diệt hạt giống lai cái tự thụ phấn lẫn vào. Mặt khác, nếu tính kháng được triển khai chỉ qua giống cái, người trồng có thể loại bỏ hạt giống đực tự thụ phấn lẫn vào. Hiệu quả của phương pháp này phụ thuộc vào tác động gen của gen kháng thuốc diệt cỏ, nhờ đó sự có mặt của alen duy nhất mà vẫn dung nạp thuốc diệt cỏ thì có thể sống được.

Người trồng có thể thay thế kiểu kháng mà họ mua và áp dụng trong ruộng của họ để làm giảm cơ hội cỏ phát triển tính kháng thuốc diệt cỏ. Thuốc diệt cỏ ức chế ACCza, chủ yếu nhờ phòng trừ cỏ dại, cũng cho phép tăng cường phòng trừ lúa đỏ ở mức độ nhất định. Ở các tỷ lệ cao hơn, nó sẽ diệt một số loại lúa nhất định. Nếu tính kháng phát sinh ở lúa đỏ do thụ phấn chéo, nó có thể vẫn được phòng trừ bằng lớp thuốc diệt cỏ khác ở vụ kế tiếp.

Ví dụ 3: Phương pháp sản xuất cây lúa lai có tính kháng liều thấp một thuốc diệt cỏ ức chế HPPD bằng cách bổ sung gen kháng duy nhất trong liều alen duy nhất

Tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD bởi ML0831266-03093 được triển khai riêng rẽ trong các thể lai qua giống cái hoặc giống đực dẫn đến hạt giống lai kháng thuốc diệt cỏ.

Nếu tính kháng được triển khai chỉ trong giống đực, thì ngoài việc sử dụng nó để phòng trừ cỏ dại, thuốc diệt cỏ khi được phun cho hạt giống lai sẽ diệt hạt giống lai cái tự thụ phấn lẫn vào. Mặt khác, nếu tính kháng được triển khai chỉ qua giống cái, người trồng có thể loại bỏ hạt giống đực tự thụ phấn lẫn vào. Hiệu quả của phương pháp này phụ thuộc vào tác động gen của gen kháng thuốc diệt cỏ, nhờ đó sự có mặt của alen duy nhất mà vẫn dung nạp thuốc diệt cỏ thì có thể sống được.

Người trồng có thể thay thế kiểu kháng mà họ mua và áp dụng trong ruộng của họ để làm giảm cơ hội cỏ phát triển tính kháng thuốc diệt cỏ. Thuốc diệt cỏ ức chế HPPD, chủ yếu nhờ phòng trừ cỏ dại, cũng cho phép tăng cường phòng trừ lúa đỏ ở mức độ nhất định. Ở các tỷ lệ cao hơn, nó sẽ diệt một số loại lúa nhất định. Nếu tính kháng phát sinh ở lúa đỏ do thụ phấn chéo, nó có thể vẫn được phòng trừ bằng lớp thuốc diệt cỏ khác ở vụ kế tiếp.

Ví dụ 4: Phương pháp sản xuất cây lúa lai có mức kháng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD hoặc ACCaza cao hơn bằng cách bổ sung gen kháng duy nhất trong liều alen kép.

Tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế HPPD bởi ML0831266-03093 hoặc tính kháng thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza bởi ML0831265-01493 được triển khai ở cả hai giống đực và cái của thể lai. Hạt giống lai thu được có thể mang tính kháng mesotrion và các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác, hoặc thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza. Tính kháng được tạo ra theo cách này là mạnh hơn và phòng trừ cỏ dại tốt hơn nhờ có khả năng áp dụng tỷ lệ cao hơn của thuốc diệt cỏ.

Ví dụ 5: Phương pháp sản xuất cây lúa lai kháng nhiều gen kháng độc lập đối với thuốc diệt cỏ duy nhất hoặc họ thuốc diệt cỏ

Hai hoặc nhiều gen độc lập tạo ra tính kháng thuốc diệt cỏ hoặc họ hoặc nhóm thuốc diệt cỏ, được triển khai trong thể lai duy nhất bằng cách bổ sung mỗi một gen riêng rẽ vào một hoặc cả hai giống của thể lai. Tùy theo tác động gen của các gen được chồng vào thể lai, chúng có thể được nhập gen vào một giống duy nhất, dẫn đến liều alen duy nhất trong thể lai thương mại, hoặc chúng có thể được bổ sung vào cả hai dòng cái và đực, dẫn đến liều alen đồng hợp tử, kép trong thể lai thương mại đối với locut đó. Việc triển khai theo cách này tạo ra hạt giống lai có tính kháng thuốc diệt cỏ cao hơn mà thể lai mang một trong hai gen kháng duy nhất ở liều alen giống hệt, do các tác dụng bổ trợ của các gen kháng khác nhau tạo ra. Việc chồng lên gen đột biến HPPDi bằng các alen HPPDni trong dòng ML0831266-03093 tiêu biểu cho trường hợp mà trong đó các locut/alen kháng độc lập khác nhau quy định tính dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế HPPD tổ hợp với nhau để tạo ra

tính kháng cao hơn so với tính kháng được tạo ra bởi một trong hai gen đơn lẻ. Tương tự, chồng ACCaza của RTA1+RTA2, trong dòng RL1225468 là ví dụ tương tự về tính kháng bổ sung khi tổ hợp hai gen độc lập kháng các thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza thuộc họ FOP.

Ví dụ 6: Phương pháp sản xuất cây lúa lai kháng các thuốc diệt cỏ thuộc các lớp thuốc diệt cỏ khác nhau, như các chất ức chế HPPD và các chất ức chế ACCaza, bằng cách bổ sung một hoặc nhiều gen kháng thuốc diệt cỏ đối với mỗi lớp thuốc diệt cỏ, như các thuốc diệt cỏ Mesotrion và FOP.

1. Tính kháng mesotrion và ít nhất một lớp thuốc diệt cỏ khác, chất ức chế ACCaza, được triển khai trong thể lai duy nhất bằng cách sử dụng giống cái mang tính kháng mesotrion (hoặc lớp thuốc diệt cỏ ACCaza khác) và giống cái mang tính kháng khác. Phương pháp này cho phép người trồng mua một lần nhưng có thể chọn được thuốc diệt cỏ để phun. Lớp thuốc diệt cỏ duy nhất có thể được sử dụng trong một mùa vụ bất kỳ và xoay vòng giữa các mùa vụ, hoặc theo cách khác cả hai thuốc diệt cỏ có thể được phun trong một mùa vụ. Ngoài ra, khi triển khai phương pháp này, các phần tử bị lẫn hạt giống tự thụ phấn của cả hai giống trong hạt giống lai nhờ việc phun cả hai thuốc diệt cỏ, hoặc loại này hoặc loại kia, được loại bỏ nhờ việc phun duy nhất một thuốc diệt cỏ.

2. Theo phương pháp triển khai khác, tính kháng mesotrion và tính kháng chất ức chế ACCaza được triển khai nhờ tạo ra thể lai với giống đực mang cả hai tính kháng. Tiếp theo, người trồng có phương án chọn lớp thuốc diệt cỏ để phun hoặc phun cả hai trong một mùa vụ. Ngoài ra, qua việc phun thuốc diệt cỏ, hiện tượng nhiễm hạt giống cái tự thụ phấn có thể được loại bỏ. Theo cách khác, cả hai tính kháng lớp thuốc diệt cỏ được tạo ra ở giống cái, mang lại cho người trồng các phương án tương tự để phòng trừ cỏ dại.

3. Phương án khác là triển khai tính kháng mesotrion cả hai giống, và tính kháng thuốc diệt cỏ khác trong một giống duy nhất, như giống đực. Tiếp theo, hạt giống lai là đồng hợp tử đối với tính kháng mesotrion mà không phải tính kháng khác. Sơ đồ kiểu này được sử dụng để thực hiện đợt phun sớm với thuốc diệt cỏ chỉ đặt vào giống đực, cho phép phòng trừ cỏ dại và loại bỏ giống cái tự thụ phấn lẫn vào. Sau đó trong mùa vụ này, mesotrion có thể được phun hoặc thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác. Thời hạn hữu ích của cả hai thuốc diệt cỏ được kéo dài nhờ việc hạn chế hoặc loại bỏ sự phát triển tính kháng cỏ dại. Trong ứng dụng khác, phương pháp này cho phép sử dụng mesotrion hoặc thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác để phòng trừ cỏ dại trong các ruộng sản xuất hạt giống, làm cho hạt giống sạch hơn.

4. Theo cách khác, thuốc diệt cỏ khác có thể được triển khai ở cả hai giống lai và chất ức chế mesotrion/HPPD được triển khai chỉ ở giống đực.

5. Các phương án khác để triển khai tính kháng thuốc diệt cỏ bao gồm các tính trạng khác như kháng các lớp thuốc diệt cỏ khác, hoặc các tính trạng khác quan trọng.

Ví dụ 7: Sản xuất hạt giống

Tính kháng thuốc diệt cỏ cũng được sử dụng để sản xuất hạt giống. Ví dụ, nếu được triển khai trong giống cái, làm cho nó có tính kháng, thì thuốc diệt cỏ được phun cho ruộng sản xuất hạt giống để diệt các cây đực trước khi đặt hạt giống để ruộng sản xuất hạt giống được thu hoạch ở quy mô lớn. Ngoài ra, độ thuần của hạt giống cũng có thể được xác nhận qua việc triển khai hai tính kháng thuốc diệt cỏ với chỉ một tính kháng trong mỗi giống. Hạt giống tự thụ phấn được phát hiện và loại bỏ bằng cách phun thuốc diệt cỏ đặt vào giống còn lại.

Ví dụ 8: Phòng trừ cỏ dại lá rộng và phòng trừ cỏ giới hạn

Tính kháng khi được triển khai ở thể lai, bằng tổ hợp bất kỳ, tạo ra tính kháng mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác. Triển khai này tạo ra kiểu tác động mới ở cây lúa để phòng trừ cỏ dại lá rộng với việc phòng trừ hạn chế ở mức nhất định các loại cỏ như lúa đỏ. Các phương án khác hoặc phòng trừ cỏ dại phổ rộng được tạo ra bằng cách triển khai ở cùng thể lai tính kháng thuốc diệt cỏ khác cho phép phòng trừ cỏ dại, như thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza. Qua triển khai các kiểu tác động khác, sự phát triển tính kháng cỏ dại dường như được ngăn ngừa nhờ việc sử dụng nhiều kiểu tác động.

Ví dụ 9: Chọn cây lúa kháng thuốc diệt cỏ bằng cách sử dụng thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ

Việc chọn vật liệu di truyền tính dung nạp mesotrion được thực hiện bằng thử nghiệm sinh học đơn giản về thuốc diệt cỏ. Tỷ lệ cao của mesotrion (ít nhất 420 g hoạt chất/ha) được phun cho phép phân biệt các cá thể dị hợp tử so với các cá thể đồng hợp tử và mức dung nạp của dòng đột biến so với mức dung nạp di truyền được trên cơ sở loại lúa nhất định. Theo một ví dụ, tỷ lệ 105 g hoạt chất/ha được phun tiếp theo ba tuần sau đó là đợt phun thứ hai 630 g hoạt chất/ha. Theo ví dụ khác, tỷ lệ 420 g hoạt chất/ha được phun trong đợt phun duy nhất. Theo ví dụ khác, việc phun thuốc diệt cỏ ở tỷ lệ 630 g hoạt chất/ha. Các đợt phun thuốc diệt cỏ được thực hiện ở giai đoạn sinh trưởng ba đến bốn lá của cây giống. Trường hợp lý tưởng là cũng trồng ở gần hoặc trong các cây là nhóm được chọn gồm các cây từ dòng cho dung nạp mesotrion đột biến ban đầu ML0831266-03093, hàng

cây kiểu dại của dòng đột biến, P1003, hàng cây của dòng tham gia dưới dạng giống khác trong phép lai này. Các dòng đối chứng này cho phép dễ dàng phân biệt sự di truyền tính dung nạp do dòng đột biến ML0831266-03093 tạo ra nhờ so sánh đáp ứng ở các cây được chọn với các dòng đối chứng. Chỉ có các cây sống được và tương đối khỏe mạnh sẽ di truyền và đồng hợp tử đối với mức dung nạp do dòng đột biến ML0831266-03093 tạo ra.

Ví dụ 10: Sản xuất cây lúa kháng cả hai thuốc diệt cỏ ức chế HPPD và ACCaza

Dòng đột biến ML0831266-03093 dung nạp mesotrion và có thể là thuốc diệt cỏ khác bao gồm các chất ức chế HPPD, được lai với dòng đột biến ML0831265-01493 dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza và cụ thể hơn là loại "fop" của thuốc diệt cỏ ACCaza. Theo một ví dụ, các cây ML0831266-03093 là giống cái và thụ phấn bởi cây từ dòng ML0831265-01493. Theo phương án khác, các giống bố mẹ được đảo ngược để cho ML0831266-03093 đóng vai trò giống thụ phấn. Hạt giống F1 thu được được thu hoạch di truyền cả hai tính dung nạp thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza. Cá thể F1 mang tính dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ ở mức trội một phần nên chúng có tính dung nạp nhất định song không có cùng mức với các dòng gốc dung nạp.

Hạt giống F1 được trồng và các cây thu được được cho tự thụ phấn để tạo ra hạt giống F2 làm cho quần thể tách tính dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza. Quần thể này được sàng lọc bằng thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ để nhận dạng các cá thể di truyền tính dung nạp từ dòng đột biến ban đầu ML0831266-03093 và đồng hợp tử về tính kháng. Tỷ lệ cao của mesotrion được sử dụng cho phép phân biệt các cá thể dị hợp tử với các cá thể đồng hợp tử và mức dung nạp của dòng đột biến so với mức dung nạp trên cơ sở loại lúa nhất định bao gồm dòng ban đầu được sử dụng cho đột biến để tạo ra dòng ML0831266-03093, là dòng P1003.

Theo một ví dụ, tỷ lệ 105 g hoạt chất/ha được sử dụng tiếp theo ba tuần sau đó là đợt phun thứ hai 630 g hoạt chất/ha. Theo ví dụ khác, tỷ lệ 420 g hoạt chất/ha được sử dụng trong đợt phun duy nhất. Theo ví dụ khác, thuốc diệt cỏ được phun ở tỷ lệ 630 g hoạt chất/ha. Các đợt phun thuốc diệt cỏ được thực hiện ở giai đoạn sinh trưởng ba đến bốn lá của cây giống. Trường hợp lý tưởng là cũng trồng ở gần hoặc trong các cây nhóm được chọn gồm các cây từ dòng cho dung nạp mesotrion đột biến ban đầu ML0831266-03093, hàng cây kiểu dại của dòng đột biến, P1003, hàng cây của dòng tham gia dưới dạng giống khác ML0831265-01493. Các dòng đối chứng này cho phép dễ dàng phân biệt sự di truyền tính dung nạp do dòng đột biến ML0831266-03093 tạo ra nhờ so sánh đáp ứng ở các cây

F2 với các dòng đối chứng này. Chỉ có các cây sống được và tương đối khỏe mạnh sẽ di truyền và đồng hợp tử đối với mức dung nạp do dòng đột biến ML0831266-03093 tạo ra.

Ví dụ 11: Thử nghiệm gen đánh dấu đồng trội để chọn và phát triển các dòng lúa dung nạp ACCaza và HPPD

Thử nghiệm về gen đánh dấu đồng trội đơn giản có thể sử dụng để chọn lọc tính di truyền đối với thuốc diệt cỏ ACCaza được tạo ra từ dòng ML0831265-01493. Gen đánh dấu này được phát triển dưới dạng gen đánh dấu đa hình nucleotit đơn và phát hiện đột biến gây bệnh ở vị trí RTA1 (số blackgrass) về tính dung nạp ACCaza ở dòng ML0831265-01493. Tất cả các cây sống sót sau thử nghiệm sinh học về mesotrion như được sử dụng trong ví dụ 8 được lấy mẫu mô, ADN được chiết bằng các phương pháp đã biết và các mẫu được thử nghiệm bằng thử nghiệm SNP. Tiếp theo, nhóm cây sống sót cũng được nhận dạng là mang gen đồng hợp tử dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza qua việc chọn lọc có trợ giúp bởi gen đánh dấu.

Các cá thể dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza được tự thụ phấn để tạo ra các thế hệ F3 và được chọn lọc tiếp về các tính trạng nông học quan trọng khác. Các dòng F3 được tự thụ phấn và sàng lọc để tạo ra dòng hoặc thứ mới có tính kháng kép đối với các thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza. Các dòng như vậy có giá trị cao do việc sử dụng cả hai thuốc diệt cỏ mang lại sự phòng trừ cỏ dại phổ rộng và triệt để hơn.

Theo phương án khác, các cá thể dung nạp cả hai mesotrion và ACCaza được sử dụng làm thể cho tính trạng trong phép lai ngược truy hồi (backcross: BC). Sau khi chọn một cá thể hoặc vài cá thể, chúng được sử dụng làm giống thụ phấn hoặc giống cái. Dòng khác ưu việt và mong muốn hơn đóng vai trò giống truy hồi mà các tính trạng này được truyền cho.

Sau phép lai thứ nhất, các cây F1 lại được lai với giống truy hồi. Hạt giống lai ngược thu được từ phép lai này và các phép lai tiếp theo với giống truy hồi được thử nghiệm bằng gen đánh dấu hoặc qua thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ đối với tính di truyền dung nạp thuốc diệt cỏ hoặc kết hợp gen đánh dấu và thử nghiệm sinh học. Trong trường hợp tốt nhất, gen đánh dấu đối với các đột biến chức năng được sử dụng. Theo cách khác, thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ đối với mesotrion được áp dụng cho hạt giống BC hoặc có thể hạt giống BC là thế hệ con được thử nghiệm để xác nhận sự di truyền tính dung nạp. Hơn thế nữa, thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ được sử dụng để nhận dạng các cá thể mà cũng đã di truyền tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza. Quy trình này được lặp lại cho

đến khi hệ gen của giống truy hồi được phục hồi cùng với hai tính trạng mới dung nạp các thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza. Sau phép lai ngược cuối cùng, các cá thể được tự thụ phấn để phục hồi tính dung nạp thuốc diệt cỏ kép ở mức độ kháng đồng hợp tử ở ít nhất một cây.

Theo phương án khác nữa, các cá thể kháng cả hai thuốc diệt cỏ mesotrion và ACCaza được lai chéo với dòng thứ ba và tiếp theo được tự thụ phấn hoặc thậm chí được lai chéo với các dòng khác. Các dòng mới thu được và chất mầm được thử nghiệm và đánh giá về các tính trạng nông học quan trọng khác. Cuối cùng, các giống hoặc các dòng đực và cái mới được phát triển tính dung nạp cả mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ HPPD khác và các thuốc diệt cỏ ACCaza thành một tổ hợp mới đối với cây lúa.

Ví dụ 12: Dòng lúa đột biến ML0831266-03093

Dòng đột biến ML0831266-03093 được chứng minh là mang mức dung nạp cao đối với thuốc diệt cỏ mesotrion vượt trên tính dung nạp được tìm thấy trong tự nhiên ở một số dòng lúa bao gồm dòng được xử lý đột biến ban đầu P1003. Dòng đột biến được trồng theo hàng hoặc theo cách khác, toàn bộ các lô đất được trồng và các hàng của dòng không đột biến (P1003) và các dòng lúa khác hoặc toàn bộ các lô đất được trồng. Mesotrion được phun trước khi nảy mầm hoặc theo cách khác, nó được phun sau nảy mầm ở giai đoạn ba đến bốn lá của cây lúa. Các tỷ lệ khác nhau của mesotrion được phun trước khi nảy mầm, trước khi nảy mầm tiếp theo là sau nảy mầm, hoặc sau nảy mầm với một lần phun duy nhất hoặc phun theo trình tự. Các lần phun sau nảy mầm được thực hiện ở giai đoạn 3-4 lá của cây lúa.

Với tỷ lệ thấp (105 g hoạt chất/ha) của mesotrion được phun, cả hai dòng đột biến cũng như dòng không đột biến ban đầu đều sống sót. Tuy nhiên, các dòng lúa khác, như dòng đột biến dung nạp ACCaza ML0831265-01493 và dòng không đột biến liên quan R0146 bị diệt trừ ở các tỷ lệ này của mesotrion. Việc phun thuốc diệt cỏ mesotrion ở các tỷ lệ cao hơn cho thấy rõ mức độ dung nạp mới do chỉ có dòng đột biến ML0831266-03093 sống sót trong khi dòng không đột biến ban đầu P1003 và tất cả các dòng được thử nghiệm khác bị diệt trừ hoặc bị tổn thương nặng. Tính dung nạp mesotrion cao hơn khiến cho dòng ML0831266-03093 có giá trị thương mại do cả hai tính dung nạp có thể được kiểm soát hoặc được lai thành các giống mới và nó có mức đủ cao để cho phép phòng trừ cỏ dại trên quy mô thương mại ở cây lúa có phun thuốc diệt cỏ mesotrion và có thể là các thuốc diệt

cỏ ức chế HPPD khác (các kết quả ban đầu, Fig.12B các kết quả mới sau 1 năm, và Fig.13- các kết quả thử nghiệm trên các dòng lúa khác nhau).

Ví dụ 13: Phép lai giữa các dòng đột biến kháng các thuốc diệt cỏ khác nhau

Phép lai giữa dòng đột biến ML0831266-03093 (ATCC PTA-13620) mang tính dung nạp mesotrion và có thể là các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác và dòng đột biến ML0831265-01493 với (ATCC PTA-12933) dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza tạo ra hạt giống F1 di truyền cả hai tính dung nạp thuốc diệt cỏ. Sau sự tự thụ phấn của các cây F1, các cá thể F2 được chọn qua thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ hoặc theo cách khác, bằng gen đánh dấu phân tử. Trong trường hợp của ACCaza, gen đánh dấu phân tử chức năng được mô tả sao cho đột biến ở vị trí G2096S (trên cơ sở hệ thống đánh số cỏ Black-Grass) được chọn. Hơn thế nữa, bằng cách sử dụng gen đánh dấu liên kết với QTL trên nhiễm sắc thể 1 và nhiễm sắc thể 2 hoặc thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ, sự phục hồi tính dung nạp mesotrion và ACCaza bao gồm các thuốc diệt cỏ HPPD khác hoặc các thuốc diệt cỏ khác.

Các cá thể được chọn đối với tính dung nạp mesotrion bao gồm các thuốc diệt cỏ HPPD khác và có thể là các thuốc diệt cỏ khác có thể được sử dụng trong phép chuyển hóa truy hồi hoặc trong phép lai để phát triển các giống và thể lai mới có mức thương mại về tính dung nạp mesotrion và các thuốc diệt cỏ khác. Việc chọn lọc bằng các thử nghiệm sinh học hoặc QTL trên nhiễm sắc thể 1 và nhiễm sắc thể 2 dẫn đến sự phục hồi tính dung nạp vốn có ở P1003 cùng với tính dung nạp đột biến để phát triển các giống và thể lai mới dung nạp thuốc diệt cỏ và tiêu biểu cho các phương án phòng trừ cỏ dại ở cây lúa. Mức dung nạp của dòng đột biến là ưu việt so với các dòng khác và phù hợp với các phương pháp ứng dụng trong thương mại khác nhau.

Các cây riêng rẽ dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ được sử dụng trong phép lai để phát triển các giống và thể lai mới dung nạp cả hai thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza, mesotrion, các thuốc diệt cỏ ức chế HPPD khác, và các thuốc diệt cỏ khác. Các giống và thể lai mới là các thương phẩm. Các thương phẩm này được sử dụng trong thương mại để sản xuất cây lúa. Trong quy trình sản xuất, cả hai ACCaza và mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ khác có thể được phun cho cây lúa để phòng trừ cỏ dại. Theo một ví dụ, mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ khác được phun trước khi trồng để phòng trừ cỏ dại nảy mầm và phòng trừ cỏ dại sót lại. Sau khi lúa nảy mầm, thuốc diệt cỏ ACCaza được phun để phòng trừ cỏ dại. Theo ví dụ khác, cả hai mesotrion hoặc thuốc diệt cỏ tương đương được phun trước khi trồng và

lần phun thứ hai được thực hiện sau nảy mầm cùng với thuốc diệt cỏ ACCaza với một hoặc hai lần phun. Theo ví dụ khác, cả hai mesotrion và thuốc diệt cỏ ACCaza hoặc các thuốc diệt cỏ khác bao gồm các thuốc diệt cỏ HPPD khác được phun sau nảy mầm với một hoặc hai lần phun. Theo cách này, chiến lược mới được thực hiện để phòng trừ toàn bộ phổ cỏ dại ở cây lúa. Ngoài ra, các thuốc diệt cỏ này chưa sử dụng trước đó trong các kiểu tác động của cây lúa. Chiến lược này do đó có ứng dụng thương mại không những để phòng trừ cỏ dại mà còn làm phương pháp kéo dài thời hạn hữu ích của chiến lược này và các chiến lược khác qua việc áp dụng nhiều kiểu tác động để phòng trừ cỏ dại.

Ví dụ 14: Đột biến kép kháng các thuốc diệt cỏ HPPD và ACCaza

Thử nghiệm về gen đánh dấu đồng trội đơn giản có thể sử dụng để chọn lọc tính di truyền đối với thuốc diệt cỏ ACCaza được tạo ra từ dòng ML0831265-01493. Gen đánh dấu này được phát triển dưới dạng gen đánh dấu đa hình nucleotit đơn và phát hiện đột biến gây bệnh ở vị trí RTA1 (số cỏ Black-Grass) về tính dung nạp ACCaza ở dòng ML0831265-01493. Tất cả các cây sống sót sau thử nghiệm sinh học về mesotrion như được sử dụng trong ví dụ 11 được lấy mẫu mô, ADN được chiết bằng các phương pháp đã biết và các mẫu được thử nghiệm bằng thử nghiệm SNP. Tiếp theo, nhóm cây sống sót cũng được nhận dạng là mang gen đồng hợp tử dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza qua việc chọn lọc có trợ giúp bởi gen đánh dấu.

Theo phương án khác, các cá thể dung nạp cả hai mesotrion và ACCaza được sử dụng làm thể cho tính trạng trong phép lai ngược truy hồi. Sau khi chọn một cá thể hoặc vài cá thể, chúng được sử dụng làm giống thụ phấn hoặc giống cái. Dòng khác ưu việt và mong muốn hơn đóng vai trò giống truy hồi mà các tính trạng này được truyền cho. Sau phép lai thứ nhất, các cây F1 lại được lai với giống truy hồi. Hạt giống lai ngược thu được từ phép lai này và các phép lai tiếp theo với giống truy hồi được thử nghiệm bằng gen đánh dấu hoặc qua thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ đối với tính di truyền dung nạp thuốc diệt cỏ hoặc kết hợp gen đánh dấu và thử nghiệm sinh học. Trong trường hợp tốt nhất, gen đánh dấu đối với các đột biến chức năng được sử dụng. Theo cách khác, thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ mesotrion được áp dụng cho hạt giống BC hoặc có thể hạt giống BC là thế hệ con được thử nghiệm để xác nhận sự di truyền tính dung nạp. Hơn thế nữa, thử nghiệm sinh học về thuốc diệt cỏ được sử dụng để nhận dạng các cá thể mà cũng đã di truyền tính dung nạp thuốc diệt cỏ ACCaza. Quy trình này được lặp lại cho đến khi hệ gen của giống truy hồi được phục hồi cùng với hai tính trạng mới dung nạp các thuốc diệt cỏ

mesotrion và ACCaza. Sau phép lai ngược cuối cùng, các cá thể được tự thụ phấn để phục hồi tính dung nạp thuốc diệt cỏ kép ở mức độ kháng đồng hợp tử ở ít nhất một cây.

Theo phương án khác nữa, các cá thể kháng cả hai mesotrion và các thuốc diệt cỏ ACCaza được lai chéo với dòng thứ ba và tiếp theo được tự thụ phấn hoặc thậm chí được lai chéo với các dòng khác. Các dòng mới thu được và chất mầm được thử nghiệm và đánh giá về các tính trạng nông học quan trọng khác. Cuối cùng, các giống hoặc các dòng đực và cái mới được phát triển với tính dung nạp cả mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ HPPD khác và các thuốc diệt cỏ ACCaza thành một tổ hợp mới đối với cây lúa.

Ví dụ 15: Phòng trừ toàn bộ phổ cỏ dại ở cây lúa dựa trên cơ sở tính kháng kép cả hai thuốc diệt cỏ ACCaza và HPPD

Trong quy trình sản xuất, cả hai thuốc diệt cỏ ACCaza và mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ khác có thể được phun cho cây lúa để phòng trừ cỏ dại. Theo một ví dụ, mesotrion hoặc các thuốc diệt cỏ khác được phun trước khi trồng để phòng trừ cỏ dại nảy mầm và phòng trừ cỏ dại sót lại. Sau khi lúa nảy mầm, thuốc diệt cỏ ACCaza được phun để phòng trừ cỏ dại. Theo ví dụ khác, cả hai mesotrion được phun trước khi trồng và lần phun thứ hai được thực hiện sau nảy mầm cùng với thuốc diệt cỏ ACCaza với một hoặc hai lần phun. Theo ví dụ khác, cả hai mesotrion và thuốc diệt cỏ ACCaza hoặc các thuốc diệt cỏ khác bao gồm các thuốc diệt cỏ HPPD khác được phun sau nảy mầm với một hoặc hai lần phun. Theo cách này, chiến lược mới được thực hiện để phòng trừ toàn bộ phổ cỏ dại ở cây lúa. Ngoài ra, các thuốc diệt cỏ này chưa từng được sử dụng với các kiểu tác động ở cây lúa. Chiến lược này do đó có ứng dụng thương mại không những để phòng trừ cỏ dại mà còn làm phương pháp kéo dài thời hạn hữu ích của chiến lược này và các chiến lược khác qua việc áp dụng nhiều kiểu tác động để phòng trừ cỏ dại.

Lưu giữ hạt giống theo Hiệp ước Budapest (xem các Bảng 5 và 12)

Việc lưu giữ hạt giống bởi Ricetec AKTIENGESELLSCHAFT được thực hiện với American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va 20110, United States of America. Ngày lưu giữ và số hiệu lưu giữ tại ATCC là: ML0831266-03093 (PTA-13620, 19.03.2013); ML0831265-01493 (PTA-12933, 31.05.2012); ML0831265-02283 (PTA-13619, 19.03.2013); PL1214418M2-80048 (PTA-121632, 30.06.2014), R4225468 (PTA-122646, 15.11.2015). Tất cả các giới hạn sẽ được loại bỏ khi cấp bằng độc quyền sáng chế, và các vật lưu giữ sẽ đáp ứng tất cả các yêu cầu được quy định tại 37 C.F.R. §§1.801-1.809, và đáp ứng các yêu cầu của Hiệp ước Budapest.

Vật lưu giữ sẽ được duy trì tại nơi lưu giữ trong khoảng thời gian 30 năm, hoặc 5 năm sau yêu cầu cuối cùng, hoặc trong thời hạn hiệu lực của bằng độc quyền sáng chế, tùy theo thời hạn nào lâu hơn, và sẽ được thay thế nếu cần trong khoảng thời gian đó.

Các định nghĩa

Trong phần mô tả và bảng kèm theo, số thuật ngữ được sử dụng. Để có cách hiểu rõ ràng và thống nhất về bản mô tả và yêu cầu bảo hộ, bao gồm phạm vi của các thuật ngữ này, các thuật ngữ sau được đưa ra:

Axetyl-Coenzym: Các enzym carboxylaza (ACCaza; EC 6.4.1.2) tổng hợp malonyl-CoA dưới dạng khởi đầu con đường tổng hợp axit béo de novo trong lạp lục. ACCaza trong lạp lục của cỏ là polypeptit đơn, đa chức, do hệ gen trong nhân mã hóa, rất lớn, được chuyển vào thể hạt qua peptit vận chuyển đầu tận cùng N. Dạng hoạt tính trong lạp lục của cỏ là protein dime cùng loại.

Các enzym ACCaza ở cỏ bị ức chế bởi ba lớp hoạt chất diệt cỏ. Hai lớp thịnh hành nhất là aryloxyphenoxypropanoat ("FOP") và xyclohexandion ("DIM"). Ngoài hai lớp này, lớp thứ ba phenylpyrazolin ("DEN") đã được mô tả.

Các đột biến nhất định trong vùng carboxyl transferaza của enzym ACCaza tạo ra cỏ kháng thuốc diệt cỏ ACCaza. Ở cỏ Black-Grass, có ít nhất 5 đột biến được mô tả tạo ra tính kháng lớp thuốc diệt cỏ ACCaza FOP hoặc DIM. Một số đột biến làm cho enzym ACCaza kháng các thuốc diệt cỏ này có thể liên quan đến thể lực suy giảm.

Alen: Alen là dạng thay thế bất kỳ của gen, tất cả các alen thường quy định một tính trạng hoặc đặc tính. Trong tế bào hoặc sinh vật lưỡng bội, hai alen của một gen đã cho chiếm các locut tương ứng trên cặp nhiễm sắc thể tương đồng.

Lai ngược: Quy trình lai thế hệ con lai với một trong số các giống bố mẹ, ví dụ, thế hệ lai thứ nhất F1 với một trong số các kiểu gen bố mẹ của thể lai F1.

Hỗn hợp trộn: Hạt giống trộn cơ học của lúa lai với hạt giống của một, hai, ba, bốn giống lúa lai hoặc hơn, giống lúa hoặc lúa lai gần để tạo ra cây trồng chứa các đặc tính của tất cả các hạt lúa giống và các cây trong hỗn hợp trộn này.

Tế bào: Tế bào như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm tế bào thực vật, dù có được phân lập hay không, khi nuôi cấy mô hoặc được đưa vào cây hoặc bộ phận của cây.

Cây trồng: Giống hoặc loài ổn định trong quá trình trồng.

Phôi: Phôi là cây nhỏ chứa trong hạt giống trưởng thành.

Hầu hết các đặc tính sinh lý và hình thái: Cây có hầu hết các đặc tính sinh lý và hình thái của thể lai hoặc cây trồng, ngoại trừ các đặc tính được tạo ra từ gen hoán chuyển.

Năng suất hạt: Trọng lượng của hạt thu hoạch được từ vùng đã cho. Năng suất hạt cũng có thể được xác định gián tiếp bằng cách nhân số lượng chùy/diện tích, cho số lượng hạt/chùm hoa, và cho trọng lượng của hạt.

Tổn thương cho cây: Được xác định bằng cách so sánh cây thử nghiệm với các đối chứng và tìm ra cây thử nghiệm không cùng chiều cao; màu sắc bất thường, tức là màu vàng chứ không phải màu xanh; hình dạng lá bình thường, xoăn, ít chồi hơn.

Locut: Locut là vị trí trên nhiễm sắc thể mà trình tự ADN chiếm chỗ; nó tạo ra một hoặc nhiều tính trạng như, ví dụ, tính vô sinh đực, tính dung nạp thuốc diệt cỏ, tính kháng côn trùng, tính kháng bệnh, tinh bột sáp, chuyển hóa axit béo biến đổi, chuyển hóa axit phytic biến đổi, chuyển hóa hydrat cacbon biến đổi và chuyển hóa protein biến đổi. Tính trạng này có thể, ví dụ, được tạo ra bởi gen có mặt trong tự nhiên được đưa vào hệ gen của giống cây này bằng cách lai ngược, đột biến tự nhiên hoặc cảm ứng, hoặc gen chuyển được đưa vào nhờ kỹ thuật biến nạp di truyền. Locut cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều alen được hợp nhất ở vị trí nhiễm sắc thể đơn.

Cảm ứng: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ cảm ứng có nghĩa là tính kháng di truyền xuất hiện sau khi xử lý bằng tác nhân gây đột biến.

Không cảm ứng: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ không cảm ứng có nghĩa là không thấy tính kháng di truyền được cảm ứng; ở vị trí khác trong hệ gen, so với tính kháng được cảm ứng.

Cây: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cây" bao gồm toàn bộ cây chưa trưởng thành hoặc trưởng thành, bao gồm cây mà từ đó hạt giống hoặc hạt hoặc bao phấn đã được loại bỏ. Hạt giống hoặc phôi mà sẽ tạo ra cây cũng được coi là cây.

Bộ phận của cây: Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bộ phận của cây" (hoặc cây lúa, hoặc bộ phận của nó) bao gồm tế bào nguyên sinh, lá, thân, rễ, đỉnh rễ, bao phấn, hạt giống, hạt, phôi, phấn hoa, noãn, lá mầm, trụ dưới lá mầm, mày, chùy, hoa, chồi, mô, tế bào, tế bào phân sinh và bộ phận tương tự.

Locut tính trạng định lượng (Quantitative Trait Loci: QTL): Các locut di truyền kiểm soát các tính trạng đo được bằng số ở mức độ nhất định mà thường được phân bố liên tục.

Tái tổ hợp/không tái tổ hợp: nếu sự tổ hợp không bố mẹ diễn ra thì cây lúa hiển nhiên là tái tổ hợp.

Tái sinh: Tái sinh chỉ sự phát triển của cây từ nuôi cấy mô.

Sự kháng/tính kháng[1]: Khả năng di truyền được của cây để sống sót và sinh sản sau khi tiếp xúc với liều thuốc diệt cỏ thường gây chết tính kháng kiểu dại có thể có mặt trong tự nhiên hoặc được cảm ứng bằng các kỹ thuật như kỹ thuật di truyền hoặc chọn lọc các biến thể được sản xuất bằng nuôi cấy mô hoặc gây đột biến.

Gen duy nhất được hoán chuyển (sự hoán chuyển): Gen duy nhất được hoán chuyển (sự hoán chuyển) bao gồm các cây được phát triển bằng kỹ thuật chọn giống cây gọi là lai ngược, trong đó hầu hết các đặc tính sinh lý và hình thái mong muốn của thể lai gần được phục hồi, trong khi giữ lại gen duy nhất được chuyển vào thể lai gần này qua việc lai và lai ngược. Thuật ngữ này cũng có thể chỉ việc đưa vào gen duy nhất nhờ kỹ thuật thao tác di truyền đã biết trong lĩnh vực này.

Chồng: Bổ sung nhiều hơn một thứ vào thể nhận tương tự. Các phương pháp đạt được trạng thái "chồng" bao gồm: các phương pháp chồng bằng vectơ hai hoặc nhiều gen trong vectơ duy nhất và biến nạp đơn để đạt được chồng; thực hiện các biến nạp theo trình tự trong cùng thể nhận bằng cách bổ sung từng tính trạng; đạt được thể lai chồng một cách đơn giản bằng các giống lai cuối mang các tính trạng khác nhau; phát triển các dòng có nhiều tính trạng bằng cách gây đột biến hoặc lai theo trình tự, và cố định trạng thái chồng trong một giống; và các biến thể của nó.

Tính hiệp đồng: Như được mô tả trong *Herbicide Handbook* of the Weed Science Society of America, Ninth Edition, 2007, p. 429, "'tính hiệp đồng' [là] tương tác của hai hoặc nhiều yếu tố sao cho tác dụng khi được kết hợp là lớn hơn so với tác dụng dự đoán trên cơ sở đáp ứng với mỗi yếu tố được áp dụng riêng rẽ."

Phương trình sau có thể được sử dụng để tính mức độ kháng/dung nạp mong đợi ở cây lúa có các tổ hợp đột biến đối với thuốc diệt cỏ, ví dụ, A và B:

$$\textit{Mức mong đợi} = A + B - (A \times B / 100)$$

A=hiệu quả quan sát được của đột biến A ở cùng nồng độ thuốc diệt cỏ;

B=hiệu quả quan sát được của đột biến B ở cùng nồng độ thuốc diệt cỏ.

Tính hiệp đồng trong trường hợp thuốc diệt cỏ có thể có nghĩa rằng việc sử dụng thuốc diệt cỏ tạo ra tác dụng phòng trừ cỏ dại gia tăng so với các tác dụng phòng trừ cỏ dại

[1] Weed Science Society of America, Weed Technology, vol. 12, issue 4 (October-December, 1998, p. 789)

của A + B có thể có khi sử dụng riêng rẽ mỗi thuốc diệt cỏ này. Hoặc tính hiệp đồng có thể được coi là mức kháng/dung nạp của cây lúa, có các đột biến tổ hợp (chồng) so với các tác dụng của cây lúa có đột biến duy nhất.

Theo một số phương án, mức độ hư hại hoặc tổn thương cho thực vật không mong muốn do thuốc diệt cỏ gây ra được đánh giá bằng cách sử dụng thang từ 0% đến 100%, khi so với đối chứng thực vật không được xử lý, trong đó 0% chỉ ra không có hư hại cho thực vật và 100% chỉ ra sự phá hủy hoàn toàn thực vật không mong muốn.

Sự dung nạp/tính dung nạp: Khả năng di truyền của một loài để sống sót và sinh sản sau khi xử lý thuốc diệt cỏ ám chỉ rằng không có chọn lọc hoặc thao tác di truyền nào tạo ra tính dung nạp của cây.

Sự kháng/dung nạp đôi khi được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này; đối với cây lúa cụ thể, thông tin kiểu gen được cung cấp đối với thuốc diệt cỏ được phun, nồng độ của thuốc diệt cỏ, và đáp ứng của cây.

Vectơ gồm các đột biến được liên quan mật thiết này kết hợp với RTA1 (G209S) tạo ra tính hiệp đồng kháng thuốc diệt cỏ FOP.

Bảng 1A: Các nucleotit đột biến liên quan đến cây lúa dung nạp chất ức chế ACCaza RTA2

Vị trí	WT	MUT	Ind. Ref	Ja. Ref	Mã gen	Chú thích
C1-32083963	C	T	Y		không	liên gen-Chr1
C1-32165584	G	A	Y		LOC_Os01g 55850	protein được biểu hiện
C1-32177487	G	A	Y	Y	?	?
C1-32459172	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-32785958	A	G		Y	?	?
C1-32821747	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-33147227	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 57350	diaxylglyxerol kinaza, giả định, được biểu hiện
C1-33201871	C	T	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-33760443	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-33760496	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-34079372	C	CT		Y	không	liên gen-Chr1
C1-34374172	G	A	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-34440547	A	G	Y		LOC_Os01g 59560	protein chứa vùng protein kinaza, được biểu hiện
C1-34482064	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 59620	histon-lysin N-metyltransferaza, SUVH1 đặc hiệu với H3 lysin-9, giả định, được biểu hiện
C1-34680949	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 59980	protein họ ngón tay kẽm, giả định, được biểu hiện
C1-34801475	T	C	Y		LOC_Os01g 60170	Protein chứa vùng DUF567, giả định, được biểu hiện
C1-34976760	C	T		Y	?	?
C1-35080808	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35498447	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 61370	protein được biểu hiện
C1-35645244	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35779866	G	A	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-35800575	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35866927	G	A	Y		LOC_Os01g 61950	protein được biểu hiện

C1-36096211	G	A	Y		LOC_Os01g 62370	Protein chứa vùng ENTH, được biểu hiện
C1-36160202	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 62460	Protein ngón tay kẽm ZOS1-16 – C2H2, được biểu hiện
C1-36386713	G	A	Y	Y	LOC_Os01g 62820	Protein chứa cấu trúc dưới phân tử A của yếu tố khởi đầu phiên mã TFIID, được biểu hiện

Vị trí	Trình tự Japonica_400bp (200 ngược, 200 xuôi)	SEQ ID NO:
C1-32083963	gccggcgcagcgagaagagtgccgaatgttggatggaggacgccgaagcgcgggaagg tcatggtggcggcgttctggctccgtccacgtcggactagcgacgcgtggtcgacgacccct gtgctgcatcctaccatgccaactttgcgtatccgtcggcgtccatcttcgccaggatgccgg ggaaggagaagaagaggcggcggcgaggccgaagaggcgaggatagggatgaggtgg cggaggaggggcgtgggaggggaggcagcgagctcccgccgccccgtcactcctgccg ctctcgtcgccccgccattccgccgagcttccgccgccctgtcgttcccgccgccccgccatt ccgccactccgccgagctcccgccgccccgcctctcccgc	38
C1-32165584	acgcgcgcgcctccattgttctcggatcaacaagctctccaagaacagcagcaaagatgaa gccttcgtcttcctccgtcggcgtctgtaccctgctggtggcggtggcctccctgcagctcctc ctcgtcgtcgccgtcgccgcctcggcgaagactgcaccggcgatgccagacgaggagttct tgggccgtctctgcgaccagcagcagggggccacgcggcggcggctcccgtggtgccag cagctgcacgcgaggcggcgccacggcggtggcggcggcggcgtcggcgtcggcaag cggcggcgggtgccgatgccgccgcccagccgcgccggcgaggagatcgacgcgcgct acgacgtgtccaagcgggtcgtgccgagcggaccgaacccg	39
C1-32177487	ttttggggtcttcccttcttattttccctgagcgtagaaaattctgtggtttccagttttccacggaa gtaaattccaattttccaatagatgtacgtcaacccttttgcttcctctccagctgcagagttgcag gtttgacgaatgcagcttatctacaaaattcccatcagagggaacacagttacagaagaacta ggggaagtacagattgcaaatccataaggatcttctttagaaccgtatacgtaaagggcttcat ggattggccactatatatgggtgtcaccctcaatcgtgaatctgcaaggtcagatatcagtatat caaatgcagattgcctcattgcagattgctgtggattgttcaggttccgggttagcccagtcac cagtcttcact	40
C1-32459172	ccacgcgagcagctggtgtttgctcatggtggcagtggtgcgcgataccagtagcgtgcgc gacgcgtcggggtggtcatcggcgagggcgagcatgtcgtcgtccagtggacgcggactc tagggtgatcacgctcggccctgtcacgctcaaaacaatactacggcacatctgattacgttg acaggatctgagaccacaccagaactatcccattccgatcatgcatgtgaaaaaaaaaacaa aggccaactattccatttagcagtaatcaagatccgatcttctcttttcttgtgaaaattcgacatg tttccggttaccaaccgaggaacacagattaattactctagtttttttcgaagagcagaagagga atattgattacccccacaaaaccc	41
C1-32785958	caacactctaaaagtttttttttttacccgttcacttgccttgttagtctatctgtactttatgatcataa atagttttataataaagcatgacggatttttgtttcaagtttggttgctgaaaaacgtacggacaa accatgaactaacttgctattttgctccacatgggtttgtctcgaagcaaccaggaattgatcaa cttcggtggtttgccaagaacatgaaacctggggataaggatttttttcgactttgctaatgctg gtcgtctggattaggaacagaacaggtattgctactgcttttattcctaagcttctaatacttctgc tcatacggatacggccatatacatacataggagtagattcgatttgacgtctcaagcagtagat gctg	42

C1-32821747	ggtaggcacggcccgacgaggcccatcgggagccgccgccgcgtgcccacgcctcatat ataaaggccaccgcgtcctctcgcctccgccagtccgcctccctcacaaccctaaccctaac cctagccgcctccgccgatccacgcacgcctccgcctccgcctccgccttgaccgctccgc ctccgcttccgcctccgtcgatccacgcctccacctccacgcgaccacgcctccatctctcca tccctctccgtcgccgtctctgatgaacgccttgccggatctaccaccgagggtcgctgcctc gccggatccgtgaccttgtctcatctccgcctctccagtctttggatcgttggccgtgctctcga tttcctctttctttttcatttttttgc	43
C1-33147227	ttcacggattgctcctcacgcgcaatggaatggcagcagcctcctcggccgtcgcccacgtg tcacgagtgcgctcaggcagctgggccttgattccttgagtctaaatgggctgcactttgattg ggctgggttcatatgagattaggggaaaaaacacgaacattccagtaaaatggggagtgtga actgtgaagaagggggtaaacggtgtgcggacgtgagacgagaaaagcatgagagaaaa cgatctgtgtgcatgcatagggctggacgaaaagctcgtgactcgttagctcgctcggttcgt gtctggctcggctcggctcggctcggctcgtttggatttgttaacgagccgagctaaggtttca gctcgttatctataacgagccagctcg	44
C1-33201871	gaaccgaatgacttgttgtatacgttgctcctgcttctctgcctgatccctctctgatgatggtgt gtgtccctttttgtttcgcttttcttaatcctctctagggcttctgatagccctccatctgtccgtccttt gcccgtttgcttcttggcctaaaccaccgaaaaggtgggtccgttttgctggacgcctggaat actcttcaactcgattggaacagcaggctccgtgtatgtgtaactatggctgtgtttagatctaa agtttagattcaaagtatagatttaaacttcagtcatttttcatcacatcaacctgtcatatacacac aactttttagtcacatcatctttaattttaaccaaaatataaattttacgctgaactaaacacagtat a	45
C1-33760443	ccctcgacctcgtcggtgggaggaggacgacggcggtggggaagaacctgaggcggca gcgagagagacaggcggtgtcgccggagcagtgaggagggaggcggcgtcgagagag agaagagagaggcgatggcgacgacgaccggatccgcgacggcgacgacggatccgc ggcgacgacaaccggatccggtggcctcctccacctccgccttggcctcctcgacctcggc caccgcgacctcctccacctccgtcttggcctcctctgcgtggcggcgagagagaggcaag cagcagcggcgagagagagagaggagaaagcggcggcggcggtggctggggaggtg gcgccggcgctcgcgggagagagagggagagggaggggaggacggcgacgg	46
C1-33760496	cggcagcgagagagacaggcggtgtcgccggagcagtgaggagggaggcggcgtcga gagagagaagagagaggcgatggcgacgacgaccggatccgcgacggcgacgacggga tccgcggcgacgacaaccggatccggtggcctcctccacctccgccttggcctcctcgacct cggccaccgcgacctcctccacctccgtcttggcctcctctgcgtggcggcgagagagagg caagcagcagcggcgagagagagagaggagaaagcggcggcggcggtggctgggga ggtggcgccggcgctcgcgggagagagagggagagggaggggaggacggcgacggc accgagtggagggagtgaggtggcgtggagcgaagaaaaaagaagaggaggg	47
C1-34079372	aagacccgcagtgcgaggatttcgaggatcaagctccagatctcgagcaaggcaagccac ctttgaacatcttgagcctatatttgaaatttaattatgttgcttgaaaaatattatgcattgatagg atcgcacttaatctgtcgtcccgtctgcaaggcagattggcggacccacctaatttgttgcattg	48

	atcctcccttgttaattgttatatcatgtccccctgtaaccatctagttgcgtctcgacattcgcgc accctgtgcgagcatcgacggacgccttcaaacttaaaatctgaaaaacaacttgggtaaaa cttgggtttacaaaagacttggaaaactcgacacctgggtcggtgcttgcgaactaaatggatt ttccaaaaccgcgga	
C1-34374172	gaacacccacacaatctcgatttgattgagaatctaggaggatactgattggcgctcaagaat ggcgtagttaatgttatgatttgccagcattctcagctgctgattctcaggctgattctacttggtt ggtagaaaatctacttatccaggaacaagcgtagggtaacttttcctttttttctcagctatgtga aaagggagaaaactcgctacactttataggaaatgaactactcttctaccgacggatatcctaa aggctatcctctggtacctcggccttacgctaactcaaaaccaaactaaaatgggttgatcgg agctattctctagaatttttgacccaaattgagcgaaggcggccacttcgcgatattgtgccaat tccagtgctcgaa	49
C1-34440547	tagcagcagatgtcatacaaacaggctttcattggaagcaataaaaatagtggacatccaaaa gatgtgtggaactatgacttctagatatcacaggcatctagcatcttgatttttattcaagactgc acataacatctttacattctagagggaaatgatccgacttaagtagtttgatagttcacctcagg gaggaagtcctttgatagtgttatagatgtctcccgaagcaccttgactgccacttcctctccatt gtccaatatgccatgataaaccataccaaatcctccttttccaatgatagactggaagttgttagt tatagtcttcaactctgtatatgtgaatcttctggtgtcagtatgcaggggagtatcctcttcatac atatcata	50
C1-34482064	gtttgggcaccgacagctccaacggaacaaagaaacgccctaagacctctaataggaagg ctgctactgacaatgagatttccttgatgcctccatccagcgatcccagggaggttgtggaagt gcttctcatgaccttcgaggcactgcggcgtaggcatcttcaattggatgagacacaagaga ctagcaaacgtgcagacctgaaggctggtgccatcatgttggccagtaatctgagggctaac attgggaagaggattggagctgtccctggagttgaagtaggggatattttctacttcaggatgg agctatgcattatcggcttgcatgcacctagcatgggtggaattgattatatgaataagtttggt gatgaggatgactctgtagcaata	51
C1-34680949	aatgaggaaaggtgagaatcggtttgttattagtaagaagaaagaccgctcactgacatcgc cacagtacaaaaggcgcagtgtgctcgagcatgctgataattccaatttcatcccatttgtccc attccctcctgattactttgccaagaaaaataagcctgtggagaattcatcagatgcaggaata gtgccagaaggccctccatcagctgaaaaattaccagaaacaaaatattcatctggaaatctg ggaaattttcagaacagctcacaggtgatgggcagtcaggcagcaaacaacatgaacaatg agaacaggaacggaaattatccacatcaaaacttgagtacaagtggttatgggtatggtgaaa gcatcacttatcagcatcaaccac	52
C1-34801475	tgatttggttgatttgtgggcgcgcgcgcgcatggcgaaggtacatcctaacgtggtgcccgt ggcggcggcggcagggccggccggcggcgagcggcgggggggaggaggaggaggag gcggcggcgctgacggtgtggcggaagtcgctgctgttcaactgcaaggggttcacggtgt tcgacgccaaggggaacctggcgtaccgcgtcgacagctacgacacggagagcggcgac gaggtcgtcctcatggacgccgccggcgccccggccttcaccgtccgcaggaagaggca	53

	gctcagcctgcagggggagcagtggctcgtgttcgccggcgaggcggacggccggcgg ccgcccgtgtacgcggtcaggcggacgggccgcggcggcggcaagt	
C1-34976760	aaaaaatatggtttcaaagttttccaaatcggtaaatctaattggagaggcctctccaattagtct taaccagagacacccacgtgctagtactttaggagttttggttgctattaatcgattgagcaagt aggggaaatattcctatcatctatgcttcaaataaagttttctcttaaattactcatccgatttacaa tccgattacaccgttgtgttcgtaataattaaatctttacaacaagatctcacatgattatattttga tgaaaaatcacaaattacttttatgatatgtctaaattacttttagatttcactaagttacttcttaga catataaaagtaaattcagtaaagcctaaaagtaattacatatattatagcagtaacttataaca	54
C1-35080808	aacgtcgacgagaaccgggctcccaactgacggtcacgcgagagctgcacgaaacgagc ctcgacgacgatcccatccgtccgtccgtcgctgcggctgctgctgctgccgccacaggcg gtcagagcctctggcacgatgccaacacgcgggcacgtggtagggcagcacgggccattc aggtggtgtttggatccagggacttaactttattctctatatttagacactaatttaaaatattaaat atagattacttacaaaactaattacataaatgaaagctaatttgtgtgataactttttaagcttaatt aatccataattagagaatgtttaatgtagcatcacataagctaatcatggattaattaggctcaat agattcgtctcgcgaatt	55
C1-35498447	cgtccgccgaagcgcacgaccggcgcggcgtggggagcggcgagtcgagcagctgcg ggagcttctcgccgtcggcgccattgcaccgcagcccctccttgtcccgcctggtgacgattt ccatgggcattgcgccgactgactgtgtcggcagcatgcatcgtctcgggcgttcaacgtgt ggaggggacgacgtataagagtacacgcgaagactgtaggtagaggtgcttttcccgcgaa aagtggcagtagcggcggttggacagtaaccttcgtgtatggttgtgtgttcatctcacgtact gttcttttgcctctcgctagctcgttcccgtgatcaaggtgcatgctcgatggccttaatggtgg aggttgccgaaaggtagcagaggaaatca	56
C1-35645244	ggatggatagtaaatataatatgaattgatctattggatcagttatatatatatatatatatatatata tatatatatatatatatatatatatatagacacacacacacacaatgaggatggtaaattagtgac aatatatgaatgtgttctattgtcaaaacgaaagggatcgatgagttatatctctaggttaattagt ttacaacgaagagttgaagctggaataaacaagtcaaaattatatctgtataacatcatagtaat gccgaccatgtacgcatccacatggccatacagcaacatcagaaacagaatttaattaattatt tgactaaacccagaatcatttgctgctgcatcgaatcgttcctctcgtcatcgccgacgcaaac atgcgc	57
C1-35779866	ctatgagttagctagctaacgtgtatgatgtccaatgattaagtgacactttttttctgtctaatata atcatccatctcatcatatcattagctccttgtgcttgtgcgttcactgttcagagaagctggttat cctccctgataagaacagccgggaggtcagtgtgctatggttttgtttagttctggaatgatcca gtcacccagcacaattgactggctgagtgttgcattaagcaaatctggaccggatttgaggga attttctcgcgcagtggagatctatgataaatctcgtaccgatccagcatagtgattcgtccgcg ggattaatactgtaactaatccatagattagcgccattattgaaacacgctttcttcttattgttgtt attat	58
C1-35800575	actctgtagtctgcaaggagcggtggcgagcagtggcgcgcgaagtcgatagggtggcga gcggacggagtggcgacggagagcctgcgggagtcgagatcgtccggggaagcaacga	59

	cggcaacgacggcagccttgtatcccgtcggcgaggtcacgctcggccattgcgcacctct cccttcgcccatcgccatcgagcccccacccacggcgcccggccatccccggcgaggag ctctgtttttggtgggtgtcggcggagttggaacgaaggagggtcgttctcggcatcgatgtc gccatctccgatcctccaccgccaccgccgccctcccccccctccattgccgacccctccccg gcgtcgagaaaatcctcgcccgacctcagcaacaagaa	
C1-35866927	tagactgcatcgccacctgccgccgaactgcgccgtgctgccgcccgccggtgccctctcc ttcacctcccgctgcatcgccgcctgccgccaagcgcacggcgaagggtaaggagtcgtg gcggcgcggggcgctcatggcggtggaggacctgctggatgttgctgctcctgttctcgcc attgtcggagtcggcgccgcccacgccgacggagaatctcaaggaggcgatgagcacgc cgaggctcggacccagcttcgtcggtgggacaaagcgggactcgatggagacggtggag ctctcctcctcctcccccaacaccacctcatgtagcttccccctcggcgcgtcagtaggtagg ggtatccatcgcttgtgcagctgcaccgagtcctcatc	60
C1-36096211	tcctggaggatgagcgtgagcgtgcgcgcaagatagcgcacgagatcaagggattcggca gcttcaacctcagcagcgcgcatgcgtcggggtcggcggcggcagccctccgcgcgggg gcgatggagcaccagtgctacggccggagcaactcgcggtacgagggcaggtggagga gggaggcctgcgtggacgacggcgacaaggagaacctgctggtggtgtcgatggccgag gcgaaggccgaggcggcggcggaggagccgcaccactaccaccacccgttctacggctt cgggcagcagcggccggaggcgatgctgctcctgagccagtagtgatcgtttgggtggatg gttcttcgtcgatcgcatcgttcgttggtttgtgatgcgtgagaa	61
C1-36160202	agtctgtggccactgatgacaggcgcagtgcaactgagctcctgaagcagatcaggcagca tgctcatgccaatggtgatggtgatcagcgtttggcacactgcttcgccaacggcctcgaggc gaggctggcaggtactggtagtcaaatttacaagaactacacgataactcggcttccatgcac tgatgtgctgaaagcgtaccagctttatttggcagcttgcccatttaagaagatctctcattacttt gccaatcaaacaattttgaatgctgtggagaaggccaagaaagttcacattgtcgattatggc atatactatggatttcagtggccgtgtcttattcagcggctatctaacaggcctggaggcccac caaagcttaggatcactgga	62
C1-36386713	gggcattggtgaaggctcagtaaccggaggtcttgtttgatggttggcaactgaattgttaatta ccaatttatttcctgtgcttctaataccagcagcatcacattctggttgttgagggtccactgata cctttacctgttgcagtttattgttttaaataatccaatcaaacttttgtttgagcttattgctgaatag cacagcagcagtacatgcaatgcaagatgcccagatgatgagaataaaggcaatggcaaa aatataagtgctagttctatttcaaaataacaaacagacaacattgcattctaaacttttataacca aacaaacaaaggaaacagggaaaattgctgaattaatgttccctttactaagtaaattctacta gaaagcact	63

Bảng 1B: Các nucleotit đột biến liên quan đến cây lúa dung nạp chất ức chế ACCaza RTA2[2]

Vị trí	WT	MUT	Ind. Ref	Ja. Ref	Mã gen	Ghi chú
C1-27445918	A	G		Y	?	?
C1-27537999	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-27744352	G	A	Y	Y	?	?
C1-27747559	AG	A		Y	?	?
C1-27747561	G	A	Y		LOC_Os01g48420	peroxiredoxin, giả định, được biểu hiện
C1-27747563	A	.		Y	?	?
C1-27792734	T	.		Y	?	?
C1-28257622	G	A	Y	Y	?	?
C1-28651555	A	G	Y		LOC_Os01g49880	protein được biểu hiện
C1-28651826	A	G	Y		LOC_Os01g49880	protein được biểu hiện
C1-29226560	G	A	Y		LOC_Os01g50880	protein giả định
C1-29278751	G	A	Y	Y	?	?
C1-29340100	G	A	Y	Y	?	?
C1-29875869	G	A	Y	Y	?	?
C1-30173016	T	C		Y	?	?
C1-30198493	G	A	Y	Y	?	?
C1-30224991	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-30225002	C	T	Y		không	liên gen-Chr1
C1-30225285	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-30429097	G	A	Y	Y	?	?
C1-30628125	G	A	Y	Y	?	?
C1-30682702	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-30876818	G	A	Y	Y	?	?
C1-30927957	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-31291611	G	A	Y	Y	?	?
C1-31375767	T	A		Y	?	?
C1-31549407	G	A	Y	Y	?	?
C1-31671724	T	C	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-31671725	A	G	Y		không	liên gen-Chr1
C1-32083963	C	T	Y		không	liên gen-Chr1
C1-32165584	G	A	Y		LOC_Os01g55850	protein được biểu hiện
C1-32177487	G	A	Y	Y	?	?
C1-32459172	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-32785958	A	G		Y	?	?

[2] Bao gồm dạng ngắn hơn trong Bảng 1A.

C1-32821747	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-33147227	G	A	Y	Y	LOC_Os01g57350	diaxylglyxerol kinaza, giả định, được biểu hiện
C1-33201871	C	T	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-33760443	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-33760496	T	C	Y		không	liên gen-Chr1
C1-34079372	C	CT		Y	không	liên gen-Chr1
C1-34374172	G	A	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-34440547	A	G	Y		LOC_Os01g59560	protein chứa vùng protein kinaza, được biểu hiện
C1-34482064	G	A	Y	Y	LOC_Os01g59620	histon-lysin N-metyltransferaza, SUVH1 đặc hiệu với H3 lysin-9, giả định, được biểu hiện
C1-34680949	G	A	Y	Y	LOC_Os01g59980	protein họ ngón tay kẽm, giả định, được biểu hiện
C1-34801475	T	C	Y		LOC_Os01g60170	Protein chứa vùng DUF567, giả định, được biểu hiện
C1-34976760	C	T		Y	?	?
C1-35080808	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35498447	G	A	Y	Y	LOC_Os01g61370	protein được biểu hiện
C1-35645244	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35779866	G	A	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-35800575	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-35866927	G	A	Y		LOC_Os01g61950	protein được biểu hiện
C1-36096211	G	A	Y		LOC_Os01g62370	Protein chứa vùng ENTH, được biểu hiện
C1-36160202	G	A	Y	Y	LOC_Os01g62460	protein ngón tay kẽm ZOS1-16 - C2H2, được biểu hiện
C1-36386713	G	A	Y	Y	LOC_Os01g62820	protein chứa cấu trúc dưới phân tử A của yếu tố khởi đầu phiên mã TFIID, được biểu hiện
C1-36447011	G	A	Y	Y	LOC_Os01g62920	homeodomain protein, giả định, được biểu hiện
C1-36630547	G	A	Y		không	liên gen-Chr1
C1-36669757	A	G	Y		?	?
C1-36747244	G	A	Y	Y	LOC_Os01g63420	OsFBL4 - Vùng hộp F và protein chứa LRR, được biểu hiện
C1-37318473	G	A	Y	Y	LOC_Os01g64280	sorting nexin 1, giả định, được biểu hiện
C1-37381689	G	A	Y		?	?
C1-37756353	A	G	Y		?	?

C1-37770409	G	A	Y	Y	LOC_Os01g65070	hydrolaza, protein chứa vùng gấp nếp alpha/beta, được biểu hiện
C1-37790329	G	A		Y	LOC_Os01g65100	yếu tố vận chuyển peptit, giả định, được biểu hiện
C1-37896676	G	A	Y	Y	LOC_Os01g65320	protein được biểu hiện
C1-38439735	A	G	Y		?	?
C1-38439976	A	G	Y		?	?
C1-38471485	G	A	Y	Y	LOC_Os01g66230	csAtPR5, giả định, được biểu hiện
C1-39383231	G	A	Y	Y	không	liên gen-Chr1
C1-39481120	A	G	Y		?	?
C1-39495966	T	C		Y	LOC_Os01g67970	protein ngón tay kẽm ZOS1-20 - C2H2, được biểu hiện
C1-39500910	G	A	Y		?	?
C1-39639526	G	A		Y	LOC_Os01g68200	protein được biểu hiện

Bảng 2: Đặc tính kiểu hình của dòng lúa đột biến thể hiện tính kháng mesotrion, so với dòng gốc không đột biến ban đầu

Ký hiệu	Số ngày đến khi 50% trổ bông	Chiều cao cây	Kiểu cây	Lông tơ	Màu vỏ	Râu	TKW, g	Năng suất/cây
Dòng gốc không đột biến	85	96,5	đứng thẳng	óng	tím trong vỏ	Không	23,15	N/A
ML0831266-03093F2	82	94	đứng thẳng	óng	tím trong vỏ	Không	24,55	4,5

Bảng 3: Số cây dung nạp sau ba thử nghiệm sinh học khác nhau về thuốc diệt cỏ được áp dụng cho các cá thể F2 thu được từ phép lai của ML0831266-03093 dung nạp mesotrion và ML0831265-01493 dung nạp thuốc diệt cỏ ức chế ACCaza

Thông số	Phun một lần mesotrion ở 105 g hoạt chất/ha		Phun một lần mesotrion ở 420 g hoạt chất/ha		Một đợt phun mesotrion ở 105 g hoạt chất/ha, tiếp theo là đợt phun thứ hai ở 630 g hoạt chất/ha	
	Dung nạp	Dễ tổn thương	Dung nạp	Dễ tổn thương	Dung nạp	Dễ tổn thương
Quan sát được (o)	64	23	26	52	28	67
Mong đợi (e)	21,75	65,25	19,5	58,5	23,75	71,25
Độ lệch (o-e)	42,25	-42,25	6,5	-6,5	4,25	-4,25
Độ lệch $(o-e)^2$	1785,06	1785,06	42,25	42,25	18,06	18,06
$(o-e)^2/e$	82	27,35	2,166	0,722	0,76	0,253
Giá trị Khi bình phương	109,35		2,88		1,013	
Độ tự do (df)	1		1		1	
Giá trị xác suất			0,08919242		0,31393809	
Giá trị Khi bình phương tới hạn tại p=0,05	3,84		3,84		3,84	

Bảng 4

Các trình tự gen đánh dấu SNP khởi đầu và kết thúc RTA2 –QTL có đột biến ACCaza

ID	Nhiễm sắc thể	Trình tự ngược	Alen	Trình tự xuôi	SEQ ID NO:
id1019752	1	ataaagatgaggtgtttgatgaattaaaggccgcagggttgaagaggccatgtagctttacagatatttccagtgaaaatgctttgcttcttgaatttga	g/t	acagcaactgatgcagctgctgcgaaagcccatattaggcgccagcttcatccagatgtctgttcccaggacaagaatacttctggtcatgaactttttg	64
id1025754	1	tcacatgatctgcaactgtcaacagtcttaccggaattggattctgaaggtggatactccacctgtccaccataagtccttatttgtcagaggttacaat	t/c	gcatgatgtgtctatactctatactgcaaagatgaatactaacaagtttttcttgggcttaaaagaagaaaaactaggaacagcctcactagtttgctag	65

Bảng 5: Tóm tắt các dòng lúa được viện dẫn trong bản mô tả này (cũng xem Bảng 12)

Dòng	Tính trạng kháng/dung nạp chất ức chế[3]	Số hiệu lưu giữ tại ATCC và ngày cấp
P1003	HPPDni	
R0146	không	
ML0831266-03093	HPPDi + HPPDni	PTA-13620 19/03/2013
ML0831265-01493	RTA1	PTA-12933 31/5/2012
ML0831265-02283	RTA2	PTA-13619 19/03/2013
PL1214418M2-73009	RTA1 + HPPDi + HPPDni	PTA-121398 18/7/2014
PL1214418M2-80048	RTA1 + HPPDi + HPPDni	PTA-121362 30/6/2014
RL1225468	RTA1 + RTA2	PTA-122646 17/11/2015
PL1214418M2-73001	RTA1 + HPPDi	
PL1214418M2-73013	RTA1 + HPPDni	

[3] HPPDi = tính kháng/dung nạp chất ức chế HPPD được cảm ứng liên quan đến sự thay đổi trong vùng di truyền được cảm ứng bằng phương pháp hóa học.
HPPDni = tính kháng/dung nạp chất ức chế HPPD tự nhiên.
RTA1 = thay thế G2096S trong enzym ACCaza do đột biến, liên quan đến tính dung nạp chất ức chế ACCaza.
RTA2 = xem các bảng 1A và 1B.

Bảng 6: Đặc tính nông học của hai dòng kháng/dung nạp cả HPPD và ACCaza (RTA1 + HPPDi + HPPDni).

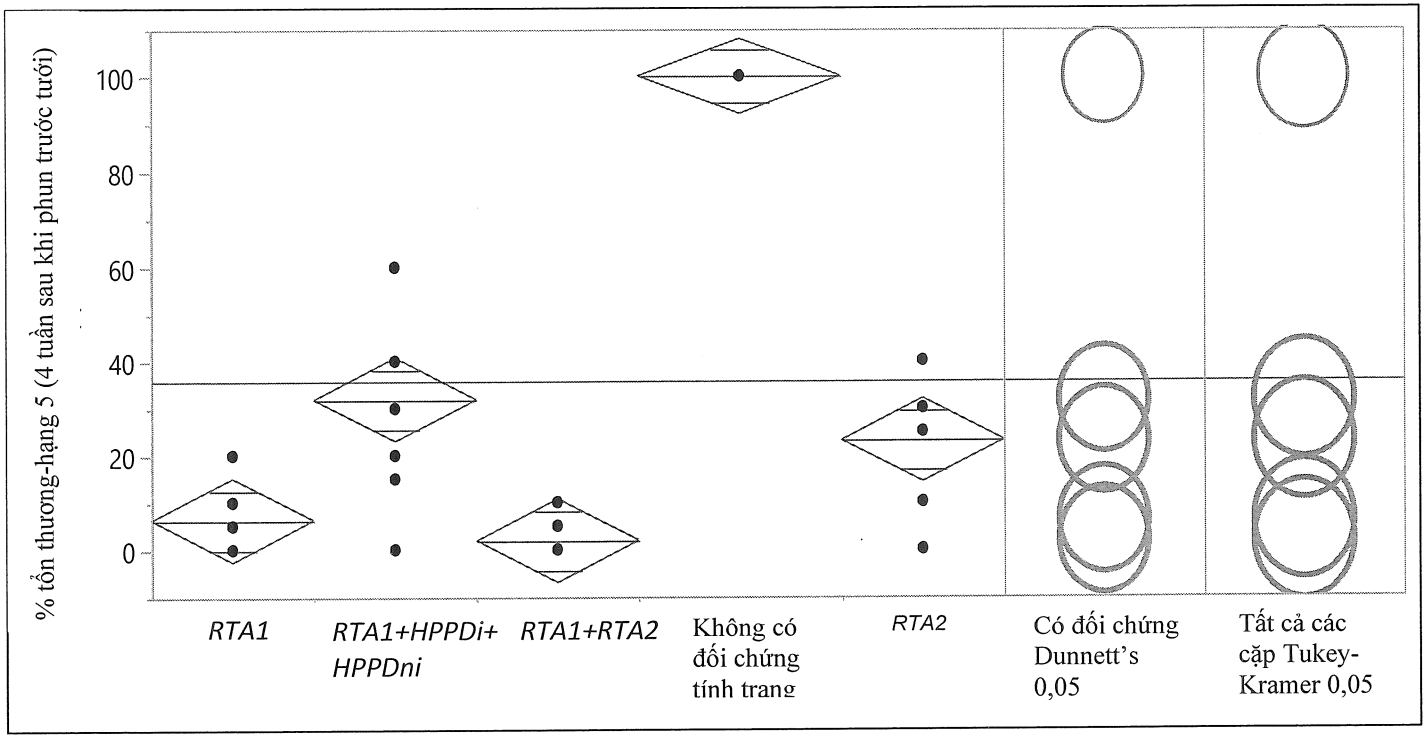
Ký hiệu	**Số ngày đến khi 50% trổ bông**	**Chiều cao cây**	**Kiểu cây**	**Lông tơ**	**Màu vỏ**	**Râu**	**Năng suất/cây**
PL1214418M2-80048	Khoảng 56-94	Khoảng 57-80 cm	đứng thẳng - trung gian	thay đổi giữa óng và mịn	thay đổi giữa xanh và tím	Không	13,39 g
PL1214418M2-73009	85	Khoảng 84-108 cm	đứng thẳng - trung gian	thay đổi giữa óng và mịn	thay đổi giữa xanh và tím	Không	NA

Bảng 7: Điểm số phân hạng tổn thương do thuốc diệt cỏ ở cây lúa

Điểm số	Mô tả xếp hạng
0	không có tổn thương nhìn thấy được
1	tổn thương quan sát thấy ở ít nhất 1 cây nhưng rất nhỏ
5	tổn thương tối thiểu được quan sát thấy trên lô đất
10	cây bị còi cọc 10% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 10% diện tích lá trong lô đất
15	cây bị còi cọc 15% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 15% diện tích lá trong lô đất
20	cây bị còi cọc 20% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 20% diện tích lá trong lô đất
25	cây bị còi cọc 25% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 25% diện tích lá trong lô đất
30	cây bị còi cọc 30% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 30% diện tích lá trong lô đất
35	cây bị còi cọc 35% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 35% diện tích lá trong lô đất
40	cây bị còi cọc 40% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 40% diện tích lá trong lô đất
45	cây bị còi cọc 45% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 45% diện tích lá trong lô đất
50	cây bị còi cọc 50% so với đối chứng, hoặc cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 50% diện tích lá trong lô đất
55	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 55% diện tích lá trong lô đất
60	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 60% diện tích lá trong lô đất
65	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 65% diện tích lá trong lô đất
70	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 70% diện tích lá trong lô đất
75	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 75% diện tích lá trong lô đất
80	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 80% diện tích lá trong lô đất
85	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 85% diện tích lá trong lô đất
90	cây bị tổn thương do thuốc diệt cỏ trên khoảng 90% diện tích lá trong lô đất
95	tất cả các cây đều bị tổn thương nặng, chết hầu hết. Mô tươi nhất định trải rộng khắp lô đất.
99	Hầu như tất cả các cây đều chết, nhưng ít nhất 1 cây có mô tươi.
100	tất cả các cây đều chết và có màu nâu. Không có mô tươi trong lô đất.

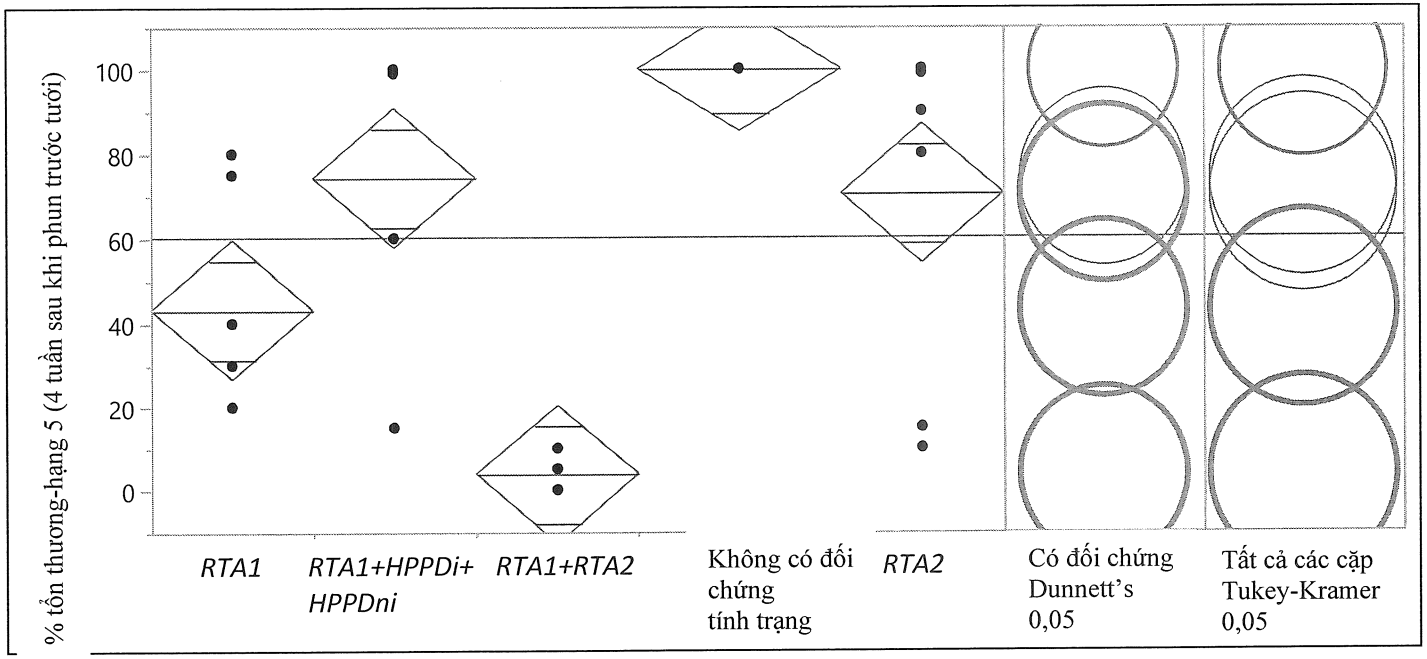
Bảng 8: Tóm tắt thống kê và so sánh trung bình về % tổn thương, cho đợt phun 1X Quizalofop trên các sản phẩm ACCaza

Phân tích % tổn thương-hạng 5 (4 tuần sau khi phun trước khi tưới) theo tính trạng, tỷ lệ thuốc diệt cỏ 2 lá (bội ghi nhãn)=1X



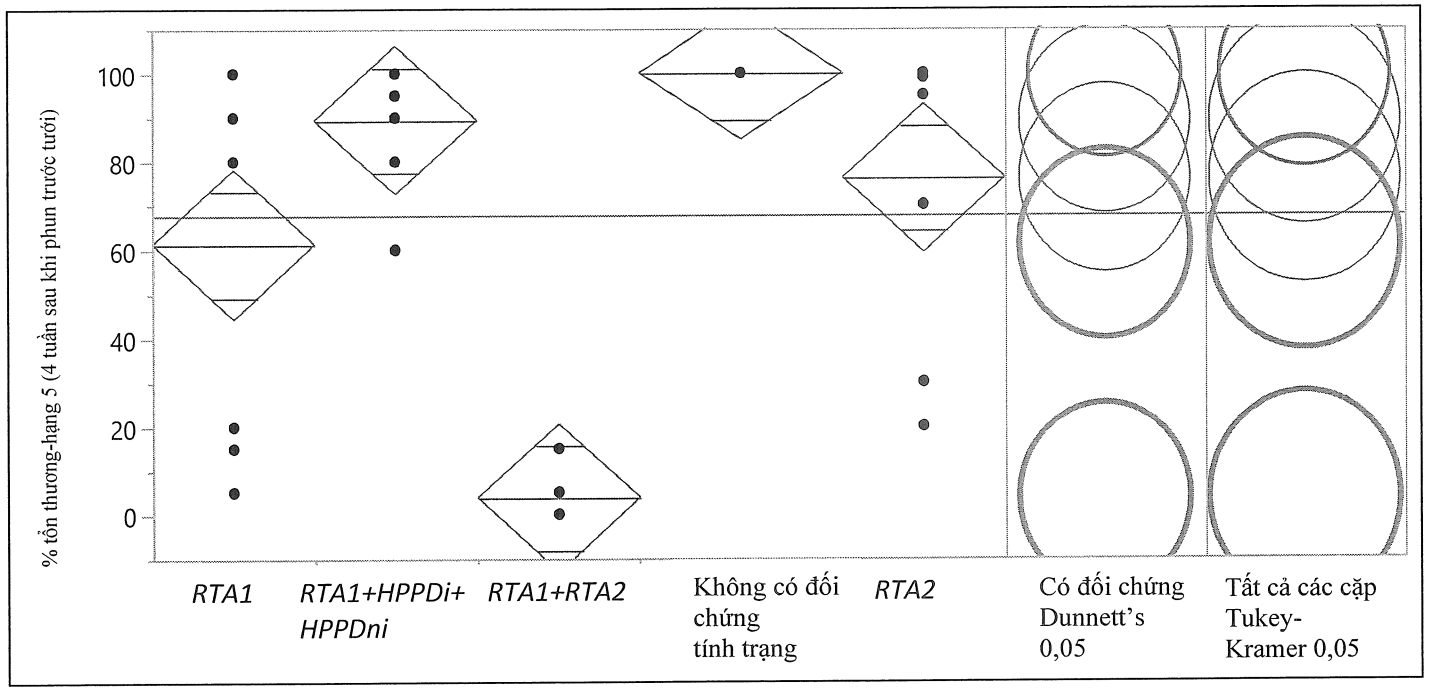
Bảng 9: Tóm tắt thống kê và so sánh trung bình về % tổn thương, cho đợt phun 2X Quizalofop trên các sản phẩm ACCaza

Phân tích % tổn thương-hạng 5 (4 tuần sau khi phun trước khi tưới) theo tính trạng, tỷ lệ thuốc diệt cỏ 2 lá (bội ghi nhãn)=2X



Bảng 10: Tóm tắt thống kê và so sánh trung bình về % tổn thương, cho đợt phun 4X Quizalofop trên các sản phẩm ACCaza

Phân tích % tổn thương-hạng 5 (4 tuần sau khi phun trước khi tưới) theo tính trạng, tỷ lệ thuốc diệt cỏ 2 lá (bội ghi nhãn)=4X



Bảng 11: Các sản phẩm thuốc diệt cỏ tham chiếu được sử dụng, và các liều

Tên sản phẩm	Hoạt chất	Nồng độ hoạt chất	Đơn vị nồng độ sản phẩm	Đơn vị tỷ lệ sử dụng	1X	2X	4X
Assure II	Quizalofop	10,54	g hoạt chất/100 ml	g hoạt chất/ha	77	154	308
Assure II	Quizalofop	10,54	g hoạt chất/100 ml	ao-xơ/mẫu Anh	10	20	40
Fusilade DX	Fluazifop	23,96	g hoạt chất/100 ml	g hoạt chất/ha	210	420	840
Fusilade DX	Fluazifop	23,96	g hoạt chất/100 ml	ao-xơ/mẫu Anh	12	24	48
proprietary	Propaquizafop	10	g hoạt chất/100 ml	g hoạt chất/ha	100	200	400
proprietary	Propaquizafop	10	g hoạt chất/100 ml	ao-xơ/mẫu Anh	13,7	27,4	54,7
Callisto	mesotrion	47,93	g hoạt chất/100 ml	g hoạt chất/ha	210	420	840
Callisto	mesotrion	47,93	g hoạt chất/100 ml	ao-xơ/mẫu Anh	6	12	24
Command	Clomazone	35,9	g hoạt chất/100 ml	g hoạt chất/ha	315	630	
Command	Clomazone	35,9	g hoạt chất/100 ml	ao-xơ/mẫu Anh	12	24	

Bảng 12: Lưu giữ hạt lúa theo hiệp ước Budapest (cũng xem Bảng 5)

Dòng lưu giữ	Số PTA	Nguồn gốc	Số liệu khác
RL1225468	PTA-122646	thể cho đột biến chồng R0146	RTA1-RTA2
16USGE40004-34	PTA-124233	Hoán chuyển R0146	RTA1-RTA2
ML0831265-01493	PTA-12933	thể cho đột biến R0146 RTA1	RTA1
ML0831265-02283	PTA-13619	thể cho đột biến R0146 RTA2	RTA2
ML0831266-03093	RTA-13620		HPPDi/ni

Tài liệu công bố

Tất cả các tài liệu công bố được viện dẫn trong đơn đều được đưa vào trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu đến phạm vi chúng đề cập các vật liệu và/hoặc phương pháp liên quan đến sáng chế

Agarwal et al., Plant Mol Biol (2007) 65:467–485. *Genome-wide identification of C2H2 zincfinger gene family in rice and their phylogeny and expression analysis*

Akira, Abe et al., *Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap Nature Biotechnology* 30,174–178 (2012), Published online 22 January 2012.

Wright, Mark H. et al., *Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in Oryza sativa. Nat. Comm 2:467 | DOI: 10.1038/ncomms1467, Published Online 13 Sep 2011*.The marker information can be accessed from The Rice Diversity Home Page and downloading the file "44K GWAS Data" (http://www.ricediversity.org/index.cfm).

Zhao, Keyan et al. (2011). *Genome-wide association mapping reveals a rich genetic architecture of complex traits in Oryza sativa. Nat Comm* 2:467 | DOI: 10.1038/ncomms1467, Published Online 13 Sep 2011

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cây lúa có hệ gen liên quan đến tính dung nạp chất ức chế ACCaza, ở liều thuốc diệt cỏ ở mức cao hơn đáng kể so với mức được dung nạp bởi các cây lúa không có hệ gen này, trong đó hệ gen này bao gồm hỗn hợp của đột biến ở nhiễm sắc thể 5 và vùng di truyền ở nhiễm sắc thể 1, và trong đó tính dung nạp hiệp đồng so với tính dung nạp được dự đoán từ đáp ứng cộng gộp của đột biến ở nhiễm sắc thể 5 và vùng di truyền của nhiễm sắc thể 1 và trong đó hệ gen này bao gồm: a) đột biến ở nhiễm sắc thể 5 mà mã hóa thay thế G2096S trong trình tự axit amin của enzym ACCaza mà bao gồm SEQ ID NO: 3; và b) ít nhất một trong các trình tự nucleotit dưới đây trong vùng di truyền của nhiễm sắc thể 1 trong đó mỗi trình tự có một đột biến duy nhất: SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; SEQ ID NO: 50; SEQ ID NO: 51; SEQ ID NO: 52; SEQ ID NO: 53; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; SEQ ID NO: 63; trong đó các trình tự bao gồm 200 bp ngược chiều và 200bp xuôi chiều của mỗi đột biến đặc hiệu, trong đó đột biến duy nhất trong mỗi trình tự ở vị trí 201.

2. Hạt từ cây lúa theo điểm 1.

3. Cây lúa có vật liệu di truyền mã hóa thay thế axit amin G2096S ở enzym ACCaza và có vùng di truyền của nhiễm sắc thể số 1 bao gồm các axit nucleic với SEQ ID NO: 38 đến 63 thu được từ các hạt giống lúa được chọn từ các số hiệu lưu giữ tại ATCC với số hiệu lưu giữ PTA-122646 hoặc 124233.

4. Hạt giống của cây lúa được chọn từ mẫu của hạt được lưu giữ dưới dạng các số hiệu lưu giữ tại ATCC là PTA-122646 và 124233.

5. Cây lúa, hoặc bộ phận của nó, được sản xuất bằng cách trồng hạt lúa theo điểm 4.

6. Phấn hoa hoặc noãn của cây lúa theo điểm 5.

7. Sản phẩm nuôi cấy mô được sản xuất từ tế bào nguyên sinh hoặc tế bào từ cây lúa theo điểm 5, trong đó tế bào hoặc tế bào nguyên sinh của sản phẩm nuôi cấy mô được sản xuất từ bộ phận của cây được chọn từ nhóm bao gồm lá, lá mầm, trụ dưới lá mầm, tế bào phân sinh, rễ, đỉnh rễ, nhụy, hoa, thân, mày và chùy.

8. Tế bào nguyên sinh được sản xuất từ cây lúa theo điểm 5.

9. Phương pháp sản xuất hạt lúa dung nạp thuốc diệt cỏ, trong đó phương pháp này bao gồm lai chéo cây theo điểm 5 với cây lúa không có thay thế axit amin G2096S ở enzym ACCaza và vùng di truyền của nhiễm sắc thể 1 với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 38-63 và chọn thế hệ con từ phép lai này có tính dung nạp thuốc diệt cỏ.

10. Cây lúa kháng thuốc diệt cỏ được sản xuất từ hạt giống thế hệ con được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 9, trong đó cây lúa bao gồm thay thế axit amin G2096S ở enzym ACCaza và vùng di truyền của nhiễm sắc thể 1 với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 38-63.

11. Cây lúa theo điểm 10 mà dung nạp chất ức chế ACCaza ở mức cao hơn mức được dung nạp bởi cây không có hệ gen kết hợp của các dòng lúa với các số hiệu lưu giữ tại ATCC với số hiệu lưu giữ là PTA-122646 hoặc 124233 mà tạo tính dung nạp thuốc diệt cỏ.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> RICETEC, INC.

<120> Cây lúa có hệ gen liên quan đến tính dung nạp chất ức chế ACCaza và phương pháp sản xuất hạt lúa này

<130> 50970-267333

<140>
<141>

<150> 62/371,582
<151> 2016-08-05

<160> 65

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 2501
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 1
cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccactg gtgagttgac
60

tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcatg ttgtcaaaat
120

aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggtcct
180

ctagtacctc tggtgcttct aaaggtgttg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag
240

agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc
300

ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat
360

ttcctagtgg tagggagatt attgttgttg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat
420

ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac
480

ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga
540

aatcttgctt ccgtgttggg tggtctgatg atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaca
600

tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgtcatagca cataagatgc
660

agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac
720

ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgctg ctattgccag tgcttattct agggcatata
780

aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg
840

ctcgacttgg catccggtgc atacagcgtc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt
900

ctgcactgaa caagcttctt gggcgggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggtc
960

ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtcc atcttactgt ttcagatgac cttgaaggcg
1020

tttctaatat attgaggtgg ctcagttatg ttcctgccta cattggtgga ccacttccag
1080

taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg
1140

atcctcgagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggtta ggtggtatgt
1200

ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca
1260

gagcaaagct tggtggaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc
1320

aaactatccc tgctgaccct ggtcagcttg attcccgtga gcaatctgtt cctcgtgctg
1380

gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc
1440

gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag
1500

atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca
1560

atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg
1620

tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgcta tgctgagagg actgcaaaag
1680

gcaatgttct ggaaccgcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg
1740

attgcatgag tcggcttgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa
1800

ataaaaatgg aagtgctgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac
1860

agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc
1920

tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt
1980

tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag
2040

ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt
2100

cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc
2160

ctgaaaacta caaggattat attcaatatc ttaaggctca aagagtatcc caatccctct
2220

caagtctttc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggtctt tccatgttac
2280

tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg
2340

agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatcgtt ctttttatgc cattatgatc
2400

ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt
2460

gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g
2501

<210> 2
<211> 2501
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 2
cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccactg gtgagttgac
60

tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcatg ttgtcaaaat
120

aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggtcct
180

ctagtacctc tggtgcttct aaaggtgttg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag
240

agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc
300

ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat
360

ttcctagtgg tagggagatt attgttgttg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat
420

ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac
480

ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga
540

aatcttgctt ccgtgttggg tggtctgatg atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaca
600

tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgtcatagca cataagatgc
660

agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac
720

ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgctg ctattgccag tgcttattct agggcatata
780

aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg
840

ctcgacttgg catccggtgc atacagcgtc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt
900

ctgcactgaa caagcttctt gggcgggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggtc
960

ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtcc atcttactgt ttcagatgac cttgaaggcg
1020

tttctaatat attgaggtgg ctcagttatg ttcctgccta cattggtgga ccacttccag
1080

taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg
1140

atcctcgagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggtta ggtggtatgt
1200

ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca
1260

gagcaaagct tggtggaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc
1320

aaactatccc tgctgaccct ggtcagcttg attcccgtga gcaatctgtt cctcgtgctg
1380

gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc
1440

gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag
1500

atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca
1560

atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg
1620

tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgcta tgctgagagg actgcaaaag
1680

gcaatgttct ggaaccgcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg
1740

attgcatgag tcggcttgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa
1800

ataaaaatgg aagtgctgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac
1860

agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc
1920

tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt
1980

tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag
2040

ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt
2100

cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc
2160

ctgaaaacta caaggattat attcaatatc ttaaggctca aagagtatcc caatccctct
2220

caagtctttc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggtctt tccatgttac
2280

tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg
2340

agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatcgtt ctttttatgc cattatgatc
2400

ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt
2460

gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g
2501

<210> 3
<211> 2501
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 3
cctgttctgc taggaataat agaactacat actgctatga ttttccactg gtgagttgac
60

tgctccctta tattcaatgc attaccatag caaattcata ttcgttcatg ttgtcaaaat
120

aagccgatga aaattcaaaa ctgtaggcat ttgaaactgc agtgaggaag tcatggtcct
180

ctagtacctc tggtgcttct aaaggtgttg aaaatgccca atgttatgtt aaagctacag
240

agttggtatt tgcggacaaa catgggtcat ggggcactcc tttagttcaa atggaccggc
300

ctgctgggct caatgacatt ggtatggtag cttggacctt gaagatgtcc actcctgaat
360

ttcctagtgg tagggagatt attgttgttg caaatgatat tacgttcaga gctggatcat
420

ttggcccaag ggaagatgca ttttttgaag ctgttaccaa cctagcctgt gagaagaaac
480

ttcctcttat ttatttggca gcaaattctg gtgctcgaat tggcatagca gatgaagtga
540

aatcttgctt ccgtgttggg tggtctgatg atggcagccc tgaacgtggg tttcagtaca
600

tttatctaag cgaagaagac tatgctcgta ttggcacttc tgtcatagca cataagatgc
660

agctagacag tggtgaaatt aggtgggtta ttgattctgt tgtgggcaag gaagatggac
720

ttggtgtgga gaatatacat ggaagtgctg ctattgccag tgcttattct agggcatata
780

aggagacatt tacacttaca tttgtgactg gaagaactgt tggaatagga gcttatcttg
840

ctcgacttgg catccggtgc atacagcgtc ttgaccagcc tattattctt acaggctatt
900

ctgcactgaa caagcttctt gggcgggaag tgtacagctc ccacatgcag ttgggtggtc
960

ccaaaatcat ggcaactaat ggtgttgtcc atcttactgt ttcagatgac cttgaaggcg
1020

tttctaatat attgaggtgg ctcagttatg ttcctgccta cattggtgga ccacttccag
1080

taacaacacc gttggaccca ccggacagac ctgttgcata cattcctgag aactcgtgtg
1140

atcctcgagc ggctatccgt ggtgttgatg acagccaagg gaaatggtta ggtggtatgt
1200

ttgataaaga cagctttgtg gaaacatttg aaggttgggc taagacagtg gttactggca
1260

gagcaaagct tggtggaatt ccagtgggtg tgatagctgt ggagactcag accatgatgc
1320

aaactatccc tgctgaccct ggtcagcttg attcccgtga gcaatctgtt cctcgtgctg
1380

gacaagtgtg gtttccagat tctgcaacca agactgcgca ggcattgctg gacttcaacc
1440

gtgaaggatt acctctgttc atcctcgcta actggagagg cttctctggt ggacaaagag
1500

atctttttga aggaattctt caggctggct cgactattgt tgagaacctt aggacataca
1560

atcagcctgc ctttgtctac attcccatgg ctgcagagct acgaggaggg gcttgggttg
1620

tggttgatag caagataaac ccagaccgca ttgagtgcta tgctgagagg actgcaaaaa
1680

gcaatgttct ggaaccgcaa gggttaattg agatcaagtt caggtcagag gaactccagg
1740

attgcatgag tcggcttgac ccaacattaa ttgatctgaa agcaaaactc gaagtagcaa
1800

ataaaaatgg aagtgctgac acaaaatcgc ttcaagaaaa tatagaagct cgaacaaaac
1860

agttgatgcc tctatatact cagattgcga tacggtttgc tgaattgcat gatacatccc
1920

tcagaatggc tgcgaaaggt gtgattaaga aagttgtgga ctgggaagaa tcacgatctt
1980

tcttctataa gagattacgg aggaggatct ctgaggatgt tcttgcaaaa gaaattagag
2040

ctgtagcagg tgagcagttt tcccaccaac cagcaatcga gctgatcaag aaatggtatt
2100

cagcttcaca tgcagctgaa tgggatgatg acgatgcttt tgttgcttgg atggataacc
2160

ctgaaaacta caaggattat attcaatatc ttaaggctca aagagtatcc caatccctct
2220

caagtctttc agattccagc tcagatttgc aagccctgcc acagggtctt tccatgttac
2280

tagataaggt aattagctta ctgatgctta tataaattct ttttcattac atatggctgg
2340

agaactatct aatcaaataa tgattataat tccaatcgtt ctttttatgc cattatgatc
2400

ttctgaaatt tccttctttg gacacttatt cagatggatc cctctagaag agctcaactt
2460

gttgaagaaa tcaggaaggt ccttggttga atcatatgat g
2501

<210> 4
<211> 674
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 4
Met Asp Arg Pro Ala Gly Leu Asn Asp Ile Gly Met Val Ala Trp Thr
1 5 10 15

Leu Lys Met Ser Thr Pro Glu Phe Pro Ser Gly Arg Glu Ile Ile Val

20 25 30

Val Ala Asn Asp Ile Thr Phe Arg Ala Gly Ser Phe Gly Pro Arg Glu
35 40 45

Asp Ala Phe Phe Glu Ala Val Thr Asn Leu Ala Cys Glu Lys Lys Leu
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ile Ala
65 70 75 80

Asp Glu Val Lys Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser
85 90 95

Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Ala
100 105 110

Arg Ile Gly Thr Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Ser Gly
115 120 125

Glu Ile Arg Trp Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu
130 135 140

Gly Val Glu Asn Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser
145 150 155 160

Arg Ala Tyr Lys Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr
165 170 175

Val Gly Ile Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln
180 185 190

Arg Leu Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Ala Leu Asn Lys
195 200 205

Leu Leu Gly Arg Glu Val Tyr Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro
210 215 220

Lys Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp
225 230 235 240

Leu Glu Gly Val Ser Asn Ile Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala
245 250 255

Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Pro Val Thr Thr Pro Leu Asp Pro Pro Asp
260 265 270

Arg Pro Val Ala Tyr Ile Pro Glu Asn Ser Cys Asp Pro Arg Ala Ala
275 280 285

Ile Arg Gly Val Asp Asp Ser Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe
290 295 300

Asp Lys Asp Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Thr Val
305 310 315 320

Val Thr Gly Arg Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala
325 330 335

Val Glu Thr Gln Thr Met Met Gln Thr Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln
340 345 350

Leu Asp Ser Arg Glu Gln Ser Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe
355 360 365

Pro Asp Ser Ala Thr Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Asp Phe Asn Arg
370 375 380

Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly
385 390 395 400

Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile
405 410 415

Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro
420 425 430

Met Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Val Asp Ser Lys
435 440 445

Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu Cys Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly

450 455 460

Asn Val Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Ile Lys Phe Arg Ser Glu
465 470 475 480

Glu Leu Gln Asp Cys Met Ser Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ile Asp Leu
485 490 495

Lys Ala Lys Leu Glu Val Ala Asn Lys Asn Gly Ser Ala Asp Thr Lys
500 505 510

Ser Leu Gln Glu Asn Ile Glu Ala Arg Thr Lys Gln Leu Met Pro Leu
515 520 525

Tyr Thr Gln Ile Ala Ile Arg Phe Ala Glu Leu His Asp Thr Ser Leu
530 535 540

Arg Met Ala Ala Lys Gly Val Ile Lys Lys Val Val Asp Trp Glu Glu
545 550 555 560

Ser Arg Ser Phe Phe Tyr Lys Arg Leu Arg Arg Arg Ile Ser Glu Asp
565 570 575

Val Leu Ala Lys Glu Ile Arg Ala Val Ala Gly Glu Gln Phe Ser His
580 585 590

Gln Pro Ala Ile Glu Leu Ile Lys Lys Trp Tyr Ser Ala Ser His Ala
595 600 605

Ala Glu Trp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Val Ala Trp Met Asp Asn Pro
610 615 620

Glu Asn Tyr Lys Asp Tyr Ile Gln Tyr Leu Lys Ala Gln Arg Val Ser
625 630 635 640

Gln Ser Leu Ser Ser Leu Ser Asp Ser Ser Ser Asp Leu Gln Ala Leu
645 650 655

Pro Gln Gly Leu Ser Met Leu Leu Asp Lys Val Ile Ser Leu Leu Met
660 665 670

Leu Ile

<210> 5
<211> 674
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 5
Met Asp Arg Pro Ala Gly Leu Asn Asp Ile Gly Met Val Ala Trp Thr
1 5 10 15

Leu Lys Met Ser Thr Pro Glu Phe Pro Ser Gly Arg Glu Ile Ile Val
20 25 30

Val Ala Asn Asp Ile Thr Phe Arg Ala Gly Ser Phe Gly Pro Arg Glu
35 40 45

Asp Ala Phe Phe Glu Ala Val Thr Asn Leu Ala Cys Glu Lys Lys Leu
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ile Ala
65 70 75 80

Asp Glu Val Lys Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser
85 90 95

Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Ala
100 105 110

Arg Ile Gly Thr Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Ser Gly
115 120 125

Glu Ile Arg Trp Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu
130 135 140

Gly Val Glu Asn Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser
145 150 155 160

Arg Ala Tyr Lys Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr
165 170 175

Val Gly Ile Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln
180 185 190

Arg Leu Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Ala Leu Asn Lys
195 200 205

Leu Leu Gly Arg Glu Val Tyr Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro
210 215 220

Lys Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp
225 230 235 240

Leu Glu Gly Val Ser Asn Ile Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala
245 250 255

Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Pro Val Thr Thr Pro Leu Asp Pro Pro Asp
260 265 270

Arg Pro Val Ala Tyr Ile Pro Glu Asn Ser Cys Asp Pro Arg Ala Ala
275 280 285

Ile Arg Gly Val Asp Asp Ser Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe
290 295 300

Asp Lys Asp Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Thr Val
305 310 315 320

Val Thr Gly Arg Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala
325 330 335

Val Glu Thr Gln Thr Met Met Gln Thr Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln
340 345 350

Leu Asp Ser Arg Glu Gln Ser Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe
355 360 365

Pro Asp Ser Ala Thr Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Asp Phe Asn Arg
370 375 380

Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly

385 390 395 400

Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile
405 410 415

Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro
420 425 430

Met Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Val Asp Ser Lys
435 440 445

Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu Cys Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Gly
450 455 460

Asn Val Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Ile Lys Phe Arg Ser Glu
465 470 475 480

Glu Leu Gln Asp Cys Met Ser Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ile Asp Leu
485 490 495

Lys Ala Lys Leu Glu Val Ala Asn Lys Asn Gly Ser Ala Asp Thr Lys
500 505 510

Ser Leu Gln Glu Asn Ile Glu Ala Arg Thr Lys Gln Leu Met Pro Leu
515 520 525

Tyr Thr Gln Ile Ala Ile Arg Phe Ala Glu Leu His Asp Thr Ser Leu
530 535 540

Arg Met Ala Ala Lys Gly Val Ile Lys Lys Val Val Asp Trp Glu Glu
545 550 555 560

Ser Arg Ser Phe Phe Tyr Lys Arg Leu Arg Arg Arg Ile Ser Glu Asp
565 570 575

Val Leu Ala Lys Glu Ile Arg Ala Val Ala Gly Glu Gln Phe Ser His
580 585 590

Gln Pro Ala Ile Glu Leu Ile Lys Lys Trp Tyr Ser Ala Ser His Ala
595 600 605

Ala Glu Trp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Val Ala Trp Met Asp Asn Pro
610 615 620

Glu Asn Tyr Lys Asp Tyr Ile Gln Tyr Leu Lys Ala Gln Arg Val Ser
625 630 635 640

Gln Ser Leu Ser Ser Leu Ser Asp Ser Ser Ser Asp Leu Gln Ala Leu
645 650 655

Pro Gln Gly Leu Ser Met Leu Leu Asp Lys Val Ile Ser Leu Leu Met
660 665 670

Leu Ile

<210> 6
<211> 674
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 6
Met Asp Arg Pro Ala Gly Leu Asn Asp Ile Gly Met Val Ala Trp Thr
1 5 10 15

Leu Lys Met Ser Thr Pro Glu Phe Pro Ser Gly Arg Glu Ile Ile Val
20 25 30

Val Ala Asn Asp Ile Thr Phe Arg Ala Gly Ser Phe Gly Pro Arg Glu
35 40 45

Asp Ala Phe Phe Glu Ala Val Thr Asn Leu Ala Cys Glu Lys Lys Leu
50 55 60

Pro Leu Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Ile Ala
65 70 75 80

Asp Glu Val Lys Ser Cys Phe Arg Val Gly Trp Ser Asp Asp Gly Ser
85 90 95

Pro Glu Arg Gly Phe Gln Tyr Ile Tyr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Ala
100 105 110

Arg Ile Gly Thr Ser Val Ile Ala His Lys Met Gln Leu Asp Ser Gly
115 120 125

Glu Ile Arg Trp Val Ile Asp Ser Val Val Gly Lys Glu Asp Gly Leu
130 135 140

Gly Val Glu Asn Ile His Gly Ser Ala Ala Ile Ala Ser Ala Tyr Ser
145 150 155 160

Arg Ala Tyr Lys Glu Thr Phe Thr Leu Thr Phe Val Thr Gly Arg Thr
165 170 175

Val Gly Ile Gly Ala Tyr Leu Ala Arg Leu Gly Ile Arg Cys Ile Gln
180 185 190

Arg Leu Asp Gln Pro Ile Ile Leu Thr Gly Tyr Ser Ala Leu Asn Lys
195 200 205

Leu Leu Gly Arg Glu Val Tyr Ser Ser His Met Gln Leu Gly Gly Pro
210 215 220

Lys Ile Met Ala Thr Asn Gly Val Val His Leu Thr Val Ser Asp Asp
225 230 235 240

Leu Glu Gly Val Ser Asn Ile Leu Arg Trp Leu Ser Tyr Val Pro Ala
245 250 255

Tyr Ile Gly Gly Pro Leu Pro Val Thr Thr Pro Leu Asp Pro Pro Asp
260 265 270

Arg Pro Val Ala Tyr Ile Pro Glu Asn Ser Cys Asp Pro Arg Ala Ala
275 280 285

Ile Arg Gly Val Asp Asp Ser Gln Gly Lys Trp Leu Gly Gly Met Phe
290 295 300

Asp Lys Asp Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Gly Trp Ala Lys Thr Val
305 310 315 320

Val Thr Gly Arg Ala Lys Leu Gly Gly Ile Pro Val Gly Val Ile Ala

325 330 335

Val Glu Thr Gln Thr Met Met Gln Thr Ile Pro Ala Asp Pro Gly Gln
340 345 350

Leu Asp Ser Arg Glu Gln Ser Val Pro Arg Ala Gly Gln Val Trp Phe
355 360 365

Pro Asp Ser Ala Thr Lys Thr Ala Gln Ala Leu Leu Asp Phe Asn Arg
370 375 380

Glu Gly Leu Pro Leu Phe Ile Leu Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly
385 390 395 400

Gly Gln Arg Asp Leu Phe Glu Gly Ile Leu Gln Ala Gly Ser Thr Ile
405 410 415

Val Glu Asn Leu Arg Thr Tyr Asn Gln Pro Ala Phe Val Tyr Ile Pro
420 425 430

Met Ala Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Val Val Val Asp Ser Lys
435 440 445

Ile Asn Pro Asp Arg Ile Glu Cys Tyr Ala Glu Arg Thr Ala Lys Ser
450 455 460

Asn Val Leu Glu Pro Gln Gly Leu Ile Glu Ile Lys Phe Arg Ser Glu
465 470 475 480

Glu Leu Gln Asp Cys Met Ser Arg Leu Asp Pro Thr Leu Ile Asp Leu
485 490 495

Lys Ala Lys Leu Glu Val Ala Asn Lys Asn Gly Ser Ala Asp Thr Lys
500 505 510

Ser Leu Gln Glu Asn Ile Glu Ala Arg Thr Lys Gln Leu Met Pro Leu
515 520 525

Tyr Thr Gln Ile Ala Ile Arg Phe Ala Glu Leu His Asp Thr Ser Leu
530 535 540

Arg Met Ala Ala Lys Gly Val Ile Lys Lys Val Val Asp Trp Glu Glu
545 550 555 560

Ser Arg Ser Phe Phe Tyr Lys Arg Leu Arg Arg Arg Ile Ser Glu Asp
565 570 575

Val Leu Ala Lys Glu Ile Arg Ala Val Ala Gly Glu Gln Phe Ser His
580 585 590

Gln Pro Ala Ile Glu Leu Ile Lys Lys Trp Tyr Ser Ala Ser His Ala
595 600 605

Ala Glu Trp Asp Asp Asp Asp Ala Phe Val Ala Trp Met Asp Asn Pro
610 615 620

Glu Asn Tyr Lys Asp Tyr Ile Gln Tyr Leu Lys Ala Gln Arg Val Ser
625 630 635 640

Gln Ser Leu Ser Ser Leu Ser Asp Ser Ser Ser Asp Leu Gln Ala Leu
645 650 655

Pro Gln Gly Leu Ser Met Leu Leu Asp Lys Val Ile Ser Leu Leu Met
660 665 670

Leu Ile

<210> 7
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 7
ataaagatga ggtgtttgat gaattaaagg ccgcagggtt gaagaggcca tgtagcttta
60

cagatatttc cagtgaaaat gctttgcttc ttgaatttga kacagcaact gatgcagctg
120

ctgcgaaagc ccatattagg cgccagcttc atccagatgt ctgttcccag gacaagaata
180

cttctggtca tgaacttttt g
201

<210> 8
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 8
tcacatgatc tgcaactgtc aacagtctta ccggaattgg attctgaagg tggatactcc
60

acctgtccac cataagtcct tatttgtcag aggttacaat ygcatgatgt gtctatactc
120

tatactgcaa agatgaatac taacaagttt ttcttgggct taaaagaaga aaaactagga
180

acagcctcac tagtttgcta g
201

<210> 9
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 9
tgtttcaagt ttggttgctg aaaaacgtac ggacaaacca tgaactaact tgctattttg
60

ctccacatgg gtttgtctcg aagcaaccag gaattgatca rcttcggtgg tttgccaaga
120

acatgaaacc tggggataag gatttttttc gactttgcta atgctggtcg tctggattag
180

gaacagaaca ggtattgcta c
201

<210> 10
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 10
agtctaaatg ggctgcactt tgattgggct gggttcatat gagattaggg gaaaaaacac
60

gaacattcca gtaaaatggg gagtgtgaac tgtgaagaag rgggtaaacg gtgtgcggac
120

gtgagacgag aaaagcatga gagaaaacga tctgtgtgca tgcatagggc tggacgaaaa
180

gctcgtgact cgttagctcg c
201

<210> 11
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 11
tagggcttct gatagccctc catctgtccg tcctttgccc gtttgcttct tggcctaaac
60

caccgaaaag gtgggtccgt tttgctggac gcctggaata ytcttcaact cgattggaac
120

agcaggctcc gtgtatgtgt aactatggct gtgtttagat ctaaagttta gattcaaagt
180

atagatttaa acttcagtca t
201

<210> 12
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 12
tgctgattct caggctgatt ctacttggtt ggtagaaaat ctacttatcc aggaacaagc
60

gtagggtaac ttttcctttt tttctcagct atgtgaaaag rgagaaaact cgctacactt
120

tataggaaat gaactactct tctaccgacg gatatcctaa aggctatcct ctggtacctc
180

ggccttacgc taactcaaaa c
201

<210> 13
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 13
cgatcccagg gaggttgtgg aagtgcttct catgaccttc gaggcactgc ggcgtaggca
60

tcttcaattg gatgagacac aagagactag caaacgtgca racctgaagg ctggtgccat
120

catgttggcc agtaatctga gggctaacat tgggaagagg attggagctg tccctggagt
180

tgaagtaggg gatattttct a
201

<210> 14
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 14
aattccaatt tcatcccatt tgtcccattc cctcctgatt actttgccaa gaaaaataag
60

cctgtggaga attcatcaga tgcaggaata gtgccagaag rccctccatc agctgaaaaa
120

ttaccagaaa caaaatattc atctggaaat ctgggaaatt ttcagaacag ctcacaggtg
180

atgggcagtc aggcagcaaa c
201

<210> 15
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 15
gttttggttg ctattaatcg attgagcaag taggggaaat attcctatca tctatgcttc
60

aaataaagtt ttctcttaaa ttactcatcc gatttacaat ycgattacac cgttgtgttc
120

gtaataatta aatctttaca acaagatctc acatgattat attttgatga aaaatcacaa
180

attactttta tgatatgtct a
201

<210> 16
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 16
gtcccgcctg gtgacgattt ccatgggcat tgcgccgact gactgtgtcg gcagcatgca
60

tcgtctcggg cgttcaacgt gtggagggga cgacgtataa ragtacacgc gaagactgta
120

ggtagaggtg cttttcccgc gaaaagtggc agtagcggcg gttggacagt aaccttcgtg
180

tatggttgtg tgttcatctc a
201

<210> 17
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 17
tgcttgtgcg ttcactgttc agagaagctg gttatcctcc ctgataagaa cagccgggag
60

gtcagtgtgc tatggttttg tttagttctg gaatgatcca rtcacccagc acaattgact
120

ggctgagtgt tgcattaagc aaatctggac cggatttgag ggaattttct cgcgcagtgg
180

agatctatga taaatctcgt a
201

<210> 18
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 18
ctgcttcgcc aacggcctcg aggcgaggct ggcaggtact ggtagtcaaa tttacaagaa
60

ctacacgata actcggcttc catgcactga tgtgctgaaa rcgtaccagc tttatttggc
120

agcttgccca tttaagaaga tctctcatta ctttgccaat caaacaattt tgaatgctgt
180

ggagaaggcc aagaaagttc a
201

<210> 19
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 19
tcacattctg gttgttgagg gtccactgat acctttacct gttgcagttt attgttttaa
60

ataatccaat caaacttttg tttgagctta ttgctgaata rcacagcagc agtacatgca
120

atgcaagatg cccagatgat gagaataaag gcaatggcaa aaatataagt gctagttcta
180

tttcaaaata acaaacagac a
201

<210> 20
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 20
tatgatgatg cttattatag cctaaggtat gtacttttaa gatttagttc gaagtaatgc
60

ccatctggca agttaattcc agcattaacg tgttctaaaa rccactctac ttatgagaag
120

ccgggccacc acattcatac attacagcca gaaacaacaa atccaggaag ttaatacgtg
180

attaagaatg catcaaacaa g
201

<210> 21
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 21
tcgatatgtt gggtttttc tctttactag tagcatgcca tctagtgtgc atcttacgta
60

gtggaatatt atcgggcacc caatattcgg ctcgcacaaa rctccgagga cgaggaggag
120

gacgactaat ttggcagctc agctcacctg cacggctgca ctgtgctgtg cccggtgggc
180

gaagccattt cacccgcggg c
201

<210> 22
<211> 201

<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 22
tctgaaaacg catggccgaa ataagatgca agaacacctg caaaataatc tcaggatcag
60

tccaggtacg cattctctac tgttatctac tgaaccagag rggaaaaaaa caaaaactag
120

gatgaatgca gtgtcacttt gctgcttgta attctctgaa tttctgaatg aaagaaaaga
180

aaagaaaaga agcgaaactg g
201

<210> 23
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 23
cttaaattct catgttttat tcccgttgca acgaacggtc atttctttta gtgtccataa
60

atagctataa gaggcatcga tcatcgcagc aagccgactg rgtgtggcgc ctacgtgatc
120

gttggtttgt ttcgcttgtt tgggcataca gctatgagaa ctttgttggg ggcccatact
180

acttatcatc atgtgtctaa t
201

<210> 24
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 24
gaactaaaca cacccggaat gtgatggatc cgaatctgct gtagttgata ctgtgaatgt
60

aacttgtagg cctcatttga ttttctagaa aaaaatggag raaaaacata ggaataagaa
120

tcctatgtga attggtactg ttcatccctt tgatttgtag gaattgaaca aaggaaaagc
180

atggggaaaa aaatcctatg a
201

<210> 25
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 25
agcgccacgc cgcggccagc gccgtggtgt tctccgggtg gcatcgcttg agctacatca
60

ccaccgatgg ccacttaaag tccgttgagc tcgatcgcca ratccggcgg ctccacaggg
120

ccgtcggcaa cgcggtcgtc gacgacaagt acttggtctt cgggaccggc tccacccacc
180

tgatcaacgc gctggtgtac g
201

<210> 26
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 26
acgggcggta ccagctacct gtcacagaca tgtgggccca gcttaacgct aacgcgctga
60

tggccccaca tggcagcgac ctgccccctc tgtccctccg ytccacgggc gcaccgagcg
120

tccaccgccc cccgcgatat ccgggggttt aggcgatatt tagccacgag agggggaggg
180

gagagtagga gaccgacgct t
201

<210> 27
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 27
agaaagactt gctttagctt tattgtttct tttccatatt ctatattctt gaaaaggact
60

gcaaagctct tctagtatat gcaattagct gctttggaag rcacttcaaa agggatgaag
120

gaaagaaggc tgtcatatca attactcaat catgaccaga tcatcgatct gatgcagtta
180

aaaatttcat taattttgcc a
201

<210> 28
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 28
atcgatgtaa ttagtgatgt caatcaatgg tccagatggc atttggagtc ttcgagcctt
60

atctttagtg tcacttgcat tttcagttcc aaatgaacat ctggaagaag gcttggatat
120

ctttggaatt tcattgatag gatgaaaatc tcttgccgca tgaagcctga cggagtttcc
180

gttagccaaa gtggcatcag rtacagcata ttccaaggaa tctgtgtgct tcctatcagg
240

ttttgctgga atggaaaatt gtgctggctc agttttgctg ttccccctac ttttcaataa
300

atcaggttca ccttcttttc gcagaccagt tgaattttgt atattctctt tacaagcaga
360

tgctgaagag tggcctaata aattatttgg tgaaacctct a
401

<210> 29
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 29
taaccttata gtgggacaag gactgaaaag cagttcctct tgctttaacc cagagagggt
60

caacattttt ctccctgtaa gttccaatgc tccacaatat ttgtatcaag tgttttgagg
120

ttccaggata tgcttcagaa tccattgctc cccatctcaa tagaatgcat aagctgaaaa
180

ggcaagaaaa agtggaataa raaatagatt ttctacaagc acatgatcat tggtgggcac
240

tgcccacaga taaaactagc tagctctcgg cagtcttacc catgggaaac agtaggatct
300

atcgaaaaat caagcagctg ctttgatata actttccagg cagtatagaa atctggcaaa
360

gagattagca gctcacctca gaagtgaaat ttggagggca a
401

<210> 30
<211> 398
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 30
ccaagcggag acatcgcttc catgagcaat tcacggtttt tcactagatc tctcaccctt
60

tctctgatcc attctggacc agcctctaat gcgtagagcg ccaggcgctg cccgatgatg
120

gaagcacaga taggtatgtt atcttgcact ttgagcagct gtgcatgaag accgtcagct
180

tcgtttgggt gggcaatmtg cagcagtcag ctcatcagtt cttgtaagac tcactgatca
240

acacagattg tgcagccact aagttactta tactgcattg ctatggtgat aatttaaggg
300

aatgccctgg taaaagattc aagtggatgc gggaaattca tgaaactgaa agaactcaat
360

attgactctt acatcagcat tttcaagcct aagcagag
398

<210> 31
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 31
tttaaatcaa atcttaaaaa tataaatcat aaataactat caagttgttg agtttaaaaa
60

tataaaaatt atataaatat atttgtcttg aaaaatactt tcataaaagt atacatatat
120

cactttttaa taaatatttt tataaaaaca agaagtcaaa gttatgtttt agagaccgcg
180

tctctgttct aaacgacttc ytttataagt atggagggag tatccatttc acatatactt
240

atggtcttgt ttacatccca acaaatttta gccaaaaaca tcacatcaaa tatttagcca
300

catgtatagg acattaaata taaaaaaaca attacacagt ttgcatgtaa attgcgagac
360

gaatcttttg agcctaatta cgccattatt tgacaatgtg g
401

<210> 32
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 32
cggaactatg actaactcct ctccgtaagc ttctttgtaa tatgtattgc tgctgtactt
60

ggtctcatta tctccttaca gatatatata catttttgc agggtatatc cacttcatct
120

tctccgtgac attgagacta gggtttggct cctggccgtg gagtcagaga gtcagtgtaa
180

agctgacgga gaatatgcac yttccagtgt tactcaaaat ctagctactg gaaacaatac
240

caatattata gaacaaacag ctgatgttat cacaaaaata gacaatagta tgagttcacc
300

acggatgaga ataacagaaa ggaatggtat aagggacaac accaccccat cattccatca
360

acatttgcaa ctctttgagt ctaatggcga aggcgtacat a
401

<210> 33
<211> 375
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 33
caactactga caacaagtgc catgtctaaa tttctgaaca tgcacacaac acacaaatga
60

tgaatatggt gaaaccgcaa ttagcattag aaagttttaa ctctagaaat caatttccaa
120

gttgtaatcc ccatactccc aacccagaag ggaaaaaaaa caactccaaa acccycaact
180

tttaaaaatg tgggaacaat caaaccatat gcttgagata tacccacaaa gccatcggcg
240

gccgcttaca gcagagtaca ccctcatctt gcacgcctcc gaagaagcag gagccgtgat
300

caacacgagc atcttgtcct gctccacccc acacagtgac gagtctaggg cacgacgaag
360

gcgcgctcct aaacc
375

<210> 34
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 34
cttcctgtcg tgagtgactg ggtggtgggc tcaatcggcc tggcccgata cgatgcaagc
60

gcgtggctgg gcaggagatc ggacggtgct gattgttggg gcgacgtggc cgcgtgggcg
120

aatgaatagt gaacagtacc gacgtgaggt ttataggatt ttatatgact aggggtgaac
180

gttggataga agggaatgtg ytagtgctgt tctgaacctc ttgcgcatac attaacatgt
240

tttatctaat ctaataaaca tgattaaatt tagcgtttgc ttttacagta gtagaaatat
300

gaaattgaac aatggttagt ctgaggaatc ataagcctat gatctagctg gagtcttctc
360

cggtttaagc taccaattga aacatattaa ttgatgcctg a
401

<210> 35
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 35
aatgtgctca acttcatata tatgtgtgtt gagcacatag ctcatatata agatcaatgg
60

ttagatcaat ggtttttggg ttagatcaat ggttgagcac atagctcata tatatgtgtg
120

ctcaacggct cacacacaac ttcatatata tgtacccaaa aaagcactat tagatcaatg
180

gttataattg tttcaccacg raatattcaa ctttactcaa tgttttgttt aacaagttcc
240

ttttggtcac ttgccaattt ttctagatca tacagtacaa tctattgatc acaattcaca
300

ttgaataact aggtcaagcc attctgtaca tgcccatgca tgaacttact gtactaatat
360

tatcttagat taatttatcc tgaaacttat agtcatatgt g
401

<210> 36
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<220>
<221> đặc tính hỗn hợp
<222> (102)..(102)
<223> Có mặt hoặc không có mặt

<400> 36
gcatgaaagc tgagaccatc accaggttga tcgttgttgc tgctattata agatgccaaa
60

atcggcaaat cggtcattca ctcaaggatt ggacacaaga caaaaaaaaa gtaacaggta
120

gcagactttc aactaacctg gcatgaaagc ttggattgtc actggtttga ttgttgctgc
180

tgctgttatg aaagctgtat a
201

<210> 37
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 37
acgttgctta ggtagcacct tgatttaatc aaatgctagc tagttgatgc caggtggcac
60

actgcggacg gatttgtttg tcagtttccc tgcattacac wttgtacagg agtgtactac
120

atccacatac aatgaacagt agtagtagca gcagctatat actccagttg cctagtcgta
180

cacaaagtat aattaatcac a
201

<210> 38
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 38
gccggcgcag cgagaagagt gccgaatgtt ggatggagga cgccgaagcg cgggaaggtc
60

atggtggcgg cgttctggct ccgtccacgt cggactagcg acgcgtggtc gacgacccct
120

gtgctgcatc ctaccatgcc aactttgcgt atccgtcggc gtccatcttc gccaggatgc
180

cggggaagga gaagaagagg cggcggcgag gccgaagagg cgaggatagg gatgaggtgg
240

cggaggaggg gcgtgggagg ggaggcagcg agctcccgcc gccccgtcac tcctgccgct
300

ctcgtcgccc cgccattccg ccgagcttcc gccgccctgt cgttcccgcc gccccgccat
360

tccgccactc cgccgagctc ccgccgcccc gcctctcccg c
401

<210> 39
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 39
acgcgcgcgc ctccattgtt ctcggatcaa caagctctcc aagaacagca gcaaagatga
60

agccttcgtc ttcctccgtc ggcgtctgta ccctgctggt ggcggtggcc tccctgcagc
120

tcctcctcgt cgtcgccgtc gccgcctcgg cgaagactgc accggcgatg ccagacgagg
180

agttcttggg ccgtctctgc gaccagcagc agggggccac gcggcggcgg ctcccgtggt
240

gccagcagct gcacgcgagg cggcgccacg gcggtggcgg cggcggcgtc ggcgtcggca
300

agcggcggcg ggtgccgatg ccgccgccca gccgcgccgg cgaggagatc gacgcgcgct
360

acgacgtgtc caagcgggtc gtgccgagcg gaccgaaccc g
401

<210> 40
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 40
ttttggggtc ttcccttctt attttccctg agcgtagaaa attctgtggt ttccagtttt
60

ccacggaagt aaattccaat tttccaatag atgtacgtca acccttttgct tcctctccag
120

ctgcagagtt gcaggtttga cgaatgcagc ttatctacaa aattcccatc agagggaaca
180

cagttacaga agaactaggg gaagtacaga ttgcaaatcc ataaggatct tctttagaac
240

cgtatacgta aagggcttca tggattggcc actatatatg ggtgtcaccc tcaatcgtga
300

atctgcaagg tcagatatca gtatatcaaa tgcagattgc ctcattgcag attgctgtgg
360

attgttcagg ttccgggtta gcccagtcac cagtcttcac t
401

<210> 41
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 41
ccacgcgagc agctggtgtt tgctcatggt ggcagtggtg cgcgatacca gtagcgtgcg
60

cgacgcgtcg gggtggtcat cggcgagggc gagcatgtcg tcgtccagtg gacgcggact
120

ctagggtgat cacgctcggc cctgtcacgc tcaaaacaat actacggcac atctgattac
180

gttgacagga tctgagacca caccagaact atcccattcc gatcatgcat gtgaaaaaaa
240

aaacaaaggc caactattcc atttagcagt aatcaagatc cgatcttctc ttttcttgtg
300

aaaattcgac atgtttccgg ttaccaaccg aggaacacag attaattact ctagtttttt
360

cgaagagcag aagaggaata ttgattaccc ccacaaaacc c
401

<210> 42
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 42
caacactcta aaagtttttt ttttacccgt tcacttgcct tgttagtcta tctgtacttt
60

atgatcataa atagttttat aataaagcat gacggatttt tgtttcaagt ttggttgctg
120

aaaaacgtac ggacaaacca tgaactaact tgctattttg ctccacatgg gtttgtctcg
180

aagcaaccag gaattgatca acttcggtgg tttgccaaga acatgaaacc tggggataag
240

gatttttttc gactttgcta atgctggtcg tctggattag gaacagaaca ggtattgcta
300

ctgcttttat tcctaagctt ctaatacttc tgctcatacg gatacggcca tatacataca
360

taggagtaga ttcgatttga cgtctcaagc agtagatgct g
401

<210> 43
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 43
ggtaggcacg gcccgacgag gcccatcggg agccgccgcc gcgtgcccac gcctcatata
60

taaaggccac cgcgtcctct cgcctccgcc agtccgcctc cctcacaacc ctaaccctaa
120

ccctagccgc ctccgccgat ccacgcacgc ctccgcctcc gcctccgcct tgaccgctcc
180

gcctccgctt ccgcctccgt cgatccacgc ctccacctcc acgcgaccac gcctccatct
240

ctccatccct ctccgtcgcc gtctctgatg aacgccttgc cggatctacc accgagggtc
300

gctgcctcgc cggatccgtg accttgtctc atctccgcct ctccagtctt tggatcgttg
360

gccgtgctct cgatttcctc tttctttttc atttttttg c
401

<210> 44
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 44
ttcacggatt gctcctcacg cgcaatggaa tggcagcagc ctcctcggcc gtcgcccacg
60

tgtcacgagt gcgctcaggc agctgggcct tgattccttg agtctaaatg ggctgcactt
120

tgattgggct gggttcatat gagattaggg gaaaaaacac gaacattcca gtaaaatggg
180

gagtgtgaac tgtgaagaag ggggtaaacg gtgtgcggac gtgagacgag aaaagcatga
240

gagaaaacga tctgtgtgca tgcatagggc tggacgaaaa gctcgtgact cgttagctcg
300

ctcggttcgt gtctggctcg gctcggctcg gctcggctcg tttggatttg ttaacgagcc
360

gagctaaggt ttcagctcgt tatctataac gagccagctc g
401

<210> 45
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 45
gaaccgaatg acttgttgta tacgttgctc ctgcttctct gcctgatccc tctctgatga
60

tggtgtgtgt ccctttgtt tcgcttttct taatcctctc tagggcttct gatagccctc
120

catctgtccg tcctttgccc gtttgcttct tggcctaaac caccgaaaag gtgggtccgt
180

tttgctggac gcctggaata ctcttcaact cgattggaac agcaggctcc gtgtatgtgt
240

aactatggct gtgtttagat ctaaagttta gattcaaagt atagatttaa acttcagtca
300

tttttcatca catcaacctg tcatatacac acaacttttt agtcacatca tctttaattt
360

taaccaaaat ataaatttta cgctgaacta aacacagtat a
401

<210> 46
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 46
ccctcgacct cgtcggtggg aggaggacga cggcggtggg gaagaacctg aggcggcagc
60

gagagagaca ggcggtgtcg ccggagcagt gaggagggag gcggcgtcga gagagagaag
120

agagaggcga tggcgacgac gaccggatcc gcgacggcga cgacggatcc gcggcgacga
180

caaccggatc cggtggcctc ctccacctcc gccttggcct cctcgacctc ggccaccgcg
240

acctcctcca cctccgtctt ggcctcctct gcgtggcggc gagagagagg caagcagcag
300

cggcgagaga gagagaggag aaagcggcgg cggcggtggc tggggaggtg gcgccggcgc
360

tcgcgggaga gagagggaga gggaggggag gacggcgacg g
401

<210> 47
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 47

cggcagcgag agagacaggc ggtgtcgccg gagcagtgag gagggaggcg gcgtcgagag
60

agagaagaga gaggcgatgg cgacgacgac cggatccgcg acggcgacga cggatccgcg
120

gcgacgacaa ccggatccgg tggcctcctc cacctccgcc ttggcctcct cgacctcggc
180

caccgcgacc tcctccacct ccgtcttggc ctcctctgcg tggcggcgag agagaggcaa
240

gcagcagcgg cgagagagag agaggagaaa gcggcggcgg cggtggctgg ggaggtggcg
300

ccggcgctcg cgggagagag agggagaggg aggggaggac ggcgacggca ccgagtggag
360

ggagtgaggt ggcgtggagc gaagaaaaaa gaagaggagg g
401

<210> 48
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 48
aagacccgca gtgcgaggat ttcgaggatc aagctccaga tctcgagcaa ggcaagccac
60

ctttgaacat cttgagccta tatttgaaat ttaattatgt tgcttgaaaa atattatgca
120

ttgataggat cgcacttaat ctgtcgtccc gtctgcaagg cagattggcg gacccaccta
180

atttgttgca ttgatcctcc cttgttaatt gttatatcat gtccccctgt aaccatctag
240

ttgcgtctcg acattcgcgc accctgtgcg agcatcgacg gacgccttca aacttaaaat
300

ctgaaaaaca acttgggtaa aacttgggtt tacaaaagac ttggaaaact cgacacctgg
360

gtcggtgctt gcgaactaaa tggattttcc aaaaccgcgg a
401

<210> 49
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 49
gaacacccac acaatctcga tttgattgag aatctaggag gatactgatt ggcgctcaag
60

aatggcgtag ttaatgttat gatttgccag cattctcagc tgctgattct caggctgatt
120

ctacttggtt ggtagaaaat ctacttatcc aggaacaagc gtagggtaac ttttcctttt
180

tttctcagct atgtgaaaag ggagaaaact cgctacactt tataggaaat gaactactct
240

tctaccgacg gatatcctaa aggctatcct ctggtacctc ggccttacgc taactcaaaa
300

ccaaactaaa atgggttgat cggagctatt ctctagaatt tttgacccaa attgagcgaa
360

ggcggccact tcgcgatatt gtgccaattc cagtgctcga a
401

<210> 50
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 50
tagcagcaga tgtcatacaa acaggctttc attggaagca ataaaaatag tggacatcca
60

aaagatgtgt ggaactatga cttctagata tcacaggcat ctagcatctt gatttttatt
120

caagactgca cataacatct ttacattcta gagggaaatg atccgactta agtagtttga
180

tagttcacct cagggaggaa gtcctttgat agtgttatag atgtctcccg aagcaccttg
240

actgccactt cctctccatt gtccaatatg ccatgataaa ccataccaaa tcctcctttt
300

ccaatgatag actggaagtt gttagttata gtcttcaact ctgtatatgt gaatcttctg
360

gtgtcagtat gcaggggagt atcctcttca tacatatcat a
401

<210> 51
<211> 401

<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 51
gtttgggcac cgacagctcc aacggaacaa agaaacgccc taagacctct aataggaagg
60

ctgctactga caatgagatt tccttgatgc ctccatccag cgatcccagg gaggttgtgg
120

aagtgcttct catgaccttc gaggcactgc ggcgtaggca tcttcaattg gatgagacac
180

aagagactag caaacgtgca gacctgaagg ctggtgccat catgttggcc agtaatctga
240

gggctaacat tgggaagagg attggagctg tccctggagt tgaagtaggg gatattttct
300

acttcaggat ggagctatgc attatcggct tgcatgcacc tagcatgggt ggaattgatt
360

atatgaataa gtttggtgat gaggatgact ctgtagcaat a
401

<210> 52
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 52
aatgaggaaa ggtgagaatc ggtttgttat tagtaagaag aaagaccgct cactgacatc
60

gccacagtac aaaaggcgca gtgtgctcga gcatgctgat aattccaatt tcatcccatt
120

tgtcccattc cctcctgatt actttgccaa gaaaaataag cctgtggaga attcatcaga
180

tgcaggaata gtgccagaag gccctccatc agctgaaaaa ttaccagaaa caaaatattc
240

atctggaaat ctgggaaatt ttcagaacag ctcacaggtg atgggcagtc aggcagcaaa
300

caacatgaac aatgagaaca ggaacggaaa ttatccacat caaaacttga gtacaagtgg
360

ttatgggtat ggtgaaagca tcacttatca gcatcaacca c
401

<210> 53
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 53
tgatttggtt gatttgtggg cgcgcgcgcg catggcgaag gtacatccta acgtggtgcc
60

cgtggcggcg gcggcagggc cggccggcgg cgagcggcgg ggggaggagg aggaggaggc
120

ggcggcgctg acggtgtggc ggaagtcgct gctgttcaac tgcaaggggt tcacggtgtt
180

cgacgccaag gggaacctgg cgtaccgcgt cgacagctac gacacggaga gcggcgacga
240

ggtcgtcctc atggacgccg ccggcgcccc ggccttcacc gtccgcagga agaggcagct
300

cagcctgcag ggggagcagt ggctcgtgtt cgccggcgag gcggacggcc ggcggccgcc
360

cgtgtacgcg gtcaggcgga cgggccgcgg cggcggcaag t
401

<210> 54
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 54
aaaaaatatg gtttcaaagt tttccaaatc ggtaaatcta attggagagg cctctccaat
60

tagtcttaac cagagacacc cacgtgctag tactttagga gttttggttg ctattaatcg
120

attgagcaag taggggaaat attcctatca tctatgcttc aaataaagtt ttctcttaaa
180

ttactcatcc gatttacaat ccgattacac cgttgtgttc gtaataatta aatctttaca
240

acaagatctc acatgattat attttgatga aaaatcacaa attactttta tgatatgtct
300

aaattacttt tagatttcac taagttactt cttagacata taaaagtaaa ttcagtaaag
360

cctaaaagta attacatata ttatagcagt aacttataac a
401

<210> 55
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 55
aacgtcgacg agaaccgggc tcccaactga cggtcacgcg agagctgcac gaaacgagcc
60

tcgacgacga tcccatccgt ccgtccgtcg ctgcggctgc tgctgctgcc gccacaggcg
120

gtcagagcct ctggcacgat gccaacacgc gggcacgtgg tagggcagca cgggccattc
180

aggtggtgtt tggatccagg gacttaactt tattctctat atttagacac taatttaaaa
240

tattaaatat agattactta caaaactaat tacataaatg aaagctaatt tgtgtgataa
300

ctttttaag cttaattaat ccataattag agaatgttta atgtagcatc acataagcta
360

atcatggatt aattaggctc aatagattcg tctcgcgaat t
401

<210> 56
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 56
cgtccgccga agcgcacgac cggcgcggcg tggggagcgg cgagtcgagc agctgcggga
60

gcttctcgcc gtcggcgcca ttgcaccgca gcccctcctt gtcccgcctg gtgacgattt
120

ccatgggcat tgcgccgact gactgtgtcg gcagcatgca tcgtctcggg cgttcaacgt
180

gtggagggga cgacgtataa gagtacacgc gaagactgta ggtagaggtg cttttcccgc
240

gaaaagtggc agtagcggcg gttggacagt aaccttcgtg tatggttgtg tgttcatctc
300

acgtactgtt cttttgcctc tcgctagctc gttcccgtga tcaaggtgca tgctcgatgg
360

ccttaatggt ggaggttgcc gaaaggtagc agaggaaatc a
401

<210> 57
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 57
ggatggatag taaatataat atgaattgat ctattggatc agttatatat atatatatat
60

atatatatat atatatatat atatatatat atatatagac acacacacac acaatgagga
120

tggtaaatta gtgacaatat atgaatgtgt tctattgtca aaacgaaagg gatcgatgag
180

ttatatctct aggttaatta gtttacaacg aagagttgaa gctggaataa acaagtcaaa
240

attatatctg tataacatca tagtaatgcc gaccatgtac gcatccacat ggccatacag
300

caacatcaga aacagaattt aattaattat ttgactaaac ccagaatcat ttgctgctgc
360

atcgaatcgt tcctctcgtc atcgccgacg caaacatgcg c
401

<210> 58
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 58
ctatgagtta gctagctaac gtgtatgatg tccaatgatt aagtgacact ttttttctgt
60

ctaatataat catccatctc atcatatcat tagctccttg tgcttgtgcg ttcactgttc
120

agagaagctg gttatcctcc ctgataagaa cagccgggag gtcagtgtgc tatggttttg
180

tttagttctg gaatgatcca gtcacccagc acaattgact ggctgagtgt tgcattaagc
240

aaatctggac cggatttgag ggaattttct cgcgcagtgg agatctatga taaatctcgt
300

accgatccag catagtgatt cgtccgcggg attaatactg taactaatcc atagattagc
360

gccattattg aaacacgctt tcttcttatt gttgttatta t
401

<210> 59
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 59
actctgtagt ctgcaaggag cggtggcgag cagtggcgcg cgaagtcgat agggtggcga
60

gcggacggag tggcgacgga gagcctgcgg gagtcgagat cgtccgggga agcaacgacg
120

gcaacgacgg cagccttgta tcccgtcggc gaggtcacgc tcggccattg cgcacctctc
180

ccttcgccca tcgccatcga gcccccaccc acggcgcccg gccatccccg gcgaggagct
240

ctgtttttgg tgggtgtcgg cggagttgga acgaaggagg gtcgttctcg gcatcgatgt
300

cgccatctcc gatcctccac cgccaccgcc gccctccccc cctccattgc cgacccctcc
360

ccggcgtcga gaaaatcctc gcccgacctc agcaacaaga a
401

<210> 60
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 60
tagactgcat cgccacctgc cgccgaactg cgccgtgctg ccgcccgccg gtgccctctc
60

cttcacctcc cgctgcatcg ccgcctgccg ccaagcgcac ggcgaagggt aaggagtcgt
120

ggcggcgcgg ggcgctcatg gcggtggagg acctgctgga tgttgctgct cctgttctcg
180

ccattgtcgg agtcggcgcc gcccacgccg acggagaatc tcaaggaggc gatgagcacg
240

ccgaggctcg gacccagctt cgtcggtggg acaaagcggg actcgatgga gacggtggag
300

ctctcctcct cctcccccaa caccacctca tgtagcttcc ccctcggcgc gtcagtaggt
360

aggggtatcc atcgcttgtg cagctgcacc gagtcctcat c
401

<210> 61
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 61
tcctggagga tgagcgtgag cgtgcgcgca agatagcgca cgagatcaag ggattcggca
60

gcttcaacct cagcagcgcg catgcgtcgg ggtcggcggc ggcagccctc cgcgcggggg
120

cgatggagca ccagtgctac ggccggagca actcgcggta cgagggcagg tggaggaggg
180

aggcctgcgt ggacgacggc gacaaggaga acctgctggt ggtgtcgatg gccgaggcga
240

aggccgaggc ggcggcggag gagccgcacc actaccacca cccgttctac ggcttcgggc
300

agcagcggcc ggaggcgatg ctgctcctga gccagtagtg atcgtttggg tggatggttc
360

ttcgtcgatc gcatcgttcg ttggtttgtg atgcgtgaga a
401

<210> 62
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 62
agtctgtggc cactgatgac aggcgcagtg caactgagct cctgaagcag atcaggcagc
60

atgctcatgc caatggtgat ggtgatcagc gtttggcaca ctgcttcgcc aacggcctcg
120

aggcgaggct ggcaggtact ggtagtcaaa tttacaagaa ctacacgata actcggcttc
180

catgcactga tgtgctgaaa gcgtaccagc tttatttggc agcttgccca tttaagaaga
240

tctctcatta ctttgccaat caaacaattt tgaatgctgt ggagaaggcc aagaaagttc
300

acattgtcga ttatggcata tactatggat ttcagtggcc gtgtcttatt cagcggctat
360

ctaacaggcc tggaggccca ccaaagctta ggatcactgg a
401

<210> 63
<211> 401
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 63
gggcattggt gaaggctcag taaccggagg tcttgtttga tggttggcaa ctgaattgtt
60

aattaccaat ttatttcctg tgcttctaat accagcagca tcacattctg gttgttgagg
120

gtccactgat acctttacct gttgcagttt attgttttaa ataatccaat caaacttttg
180

tttgagctta ttgctgaata gcacagcagc agtacatgca atgcaagatg cccagatgat
240

gagaataaag gcaatggcaa aaatataagt gctagttcta tttcaaaata acaaacagac
300

aacattgcat tctaaacttt tataaccaaa caaacaaagg aaacagggaa aattgctgaa
360

ttaatgttcc ctttactaag taaattctac tagaaagcac t
401

<210> 64
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 64
ataaagatga ggtgtttgat gaattaaagg ccgcagggtt gaagaggcca tgtagcttta
60

cagatatttc cagtgaaaat gctttgcttc ttgaatttga kacagcaact gatgcagctg
120

ctgcgaaagc ccatattagg cgccagcttc atccagatgt ctgttcccag gacaagaata
180

cttctggtca tgaacttttt g
201

<210> 65
<211> 201
<212> ADN
<213> Oryza sativa

<400> 65
tcacatgatc tgcaactgtc aacagtctta ccggaattgg attctgaagg tggatactcc
60

acctgtccac cataagtcct tatttgtcag aggttacaat ygcatgatgt gtctatactc
120

tatactgcaa agatgaatac taacaagttt ttcttgggct taaaagaaga aaaactagga
180

acagcctcac tagtttgcta g
201

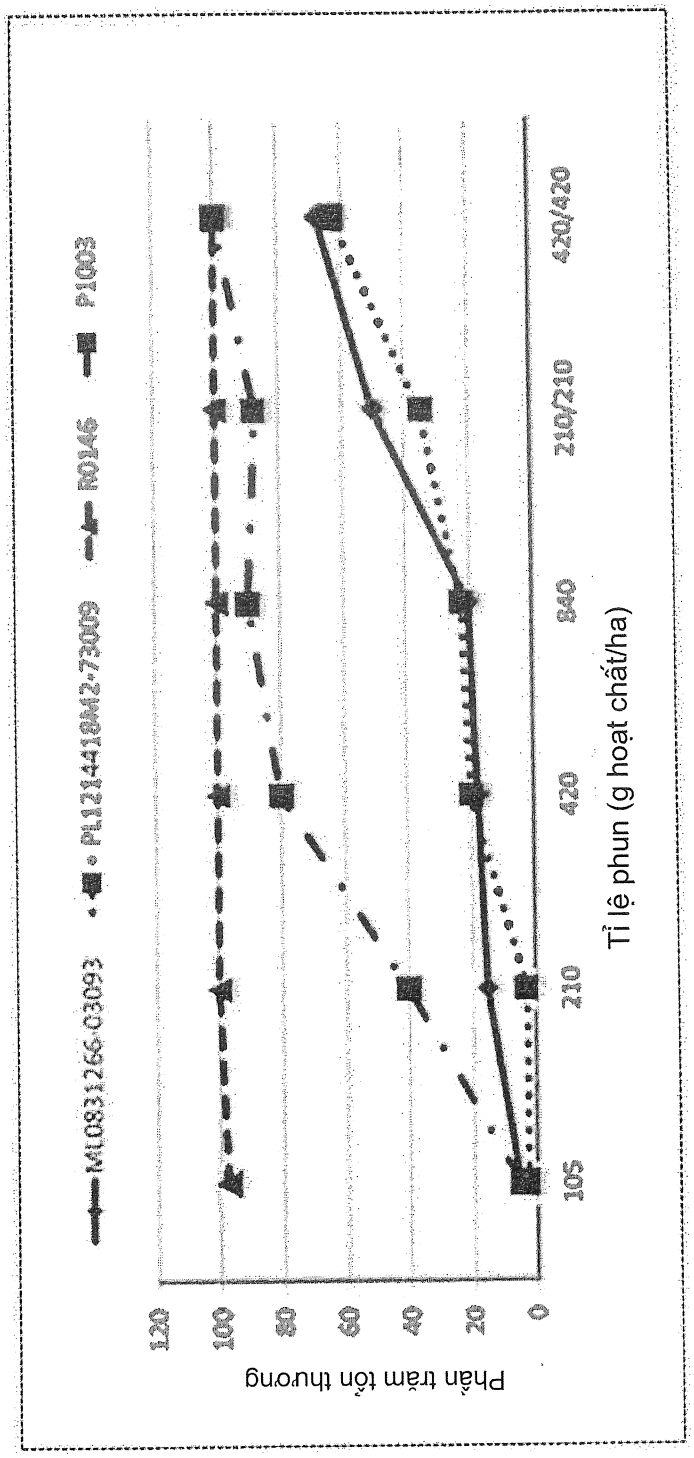

ML08311266-03093
PL12144180M2-73009
R0146
P1003
Phần trăm tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
105
210
420
840
210/210
420/420
Tỉ lệ phun (g hoạt chất/ha)

FIG. 1

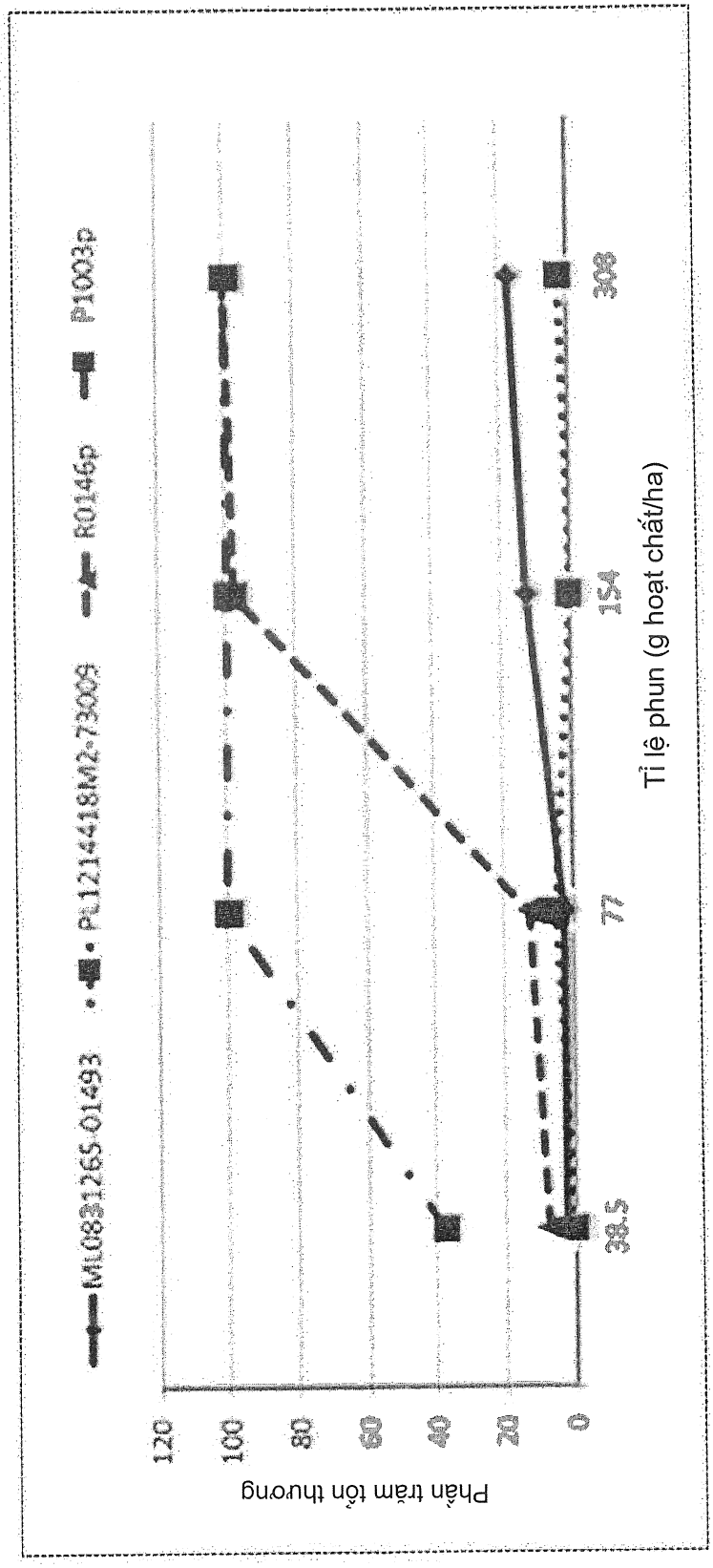

ML08831265-01493
PL1214418M2-73009
R0146p
P1003p
Phần trăm tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
38.5
77
154
308
Tỉ lệ phun (g hoạt chất/ha)

FIG. 2

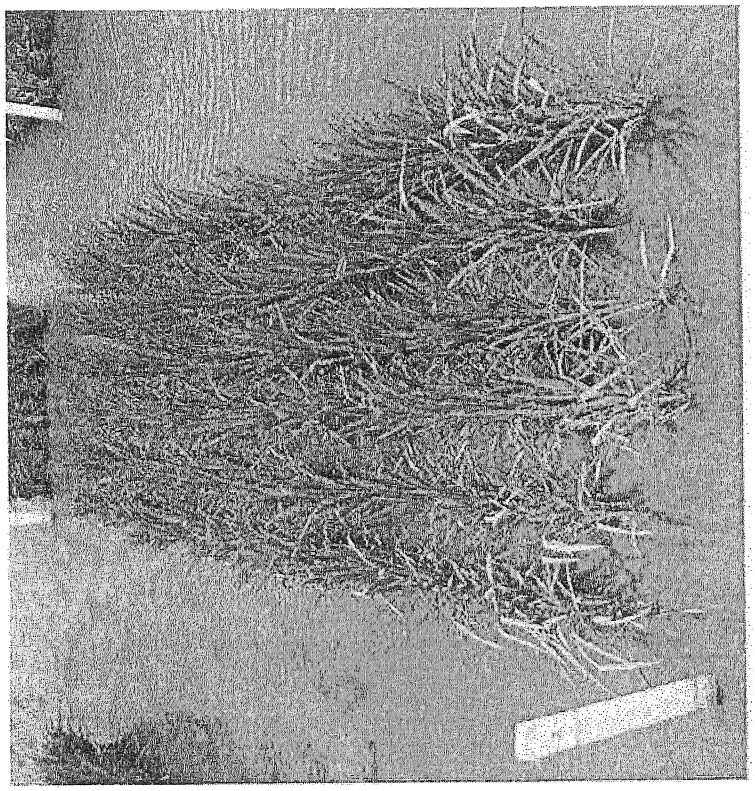


FIG. 3B

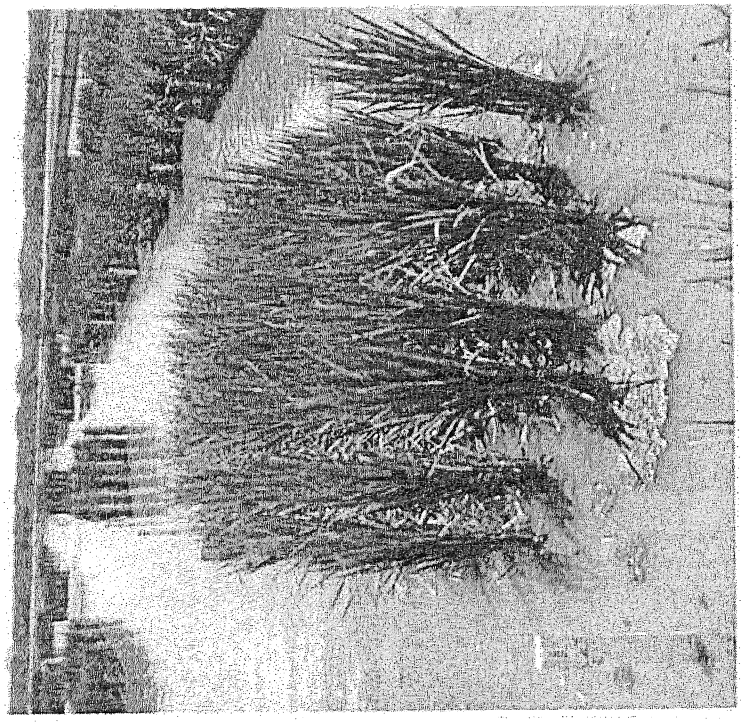


FIG. 3A

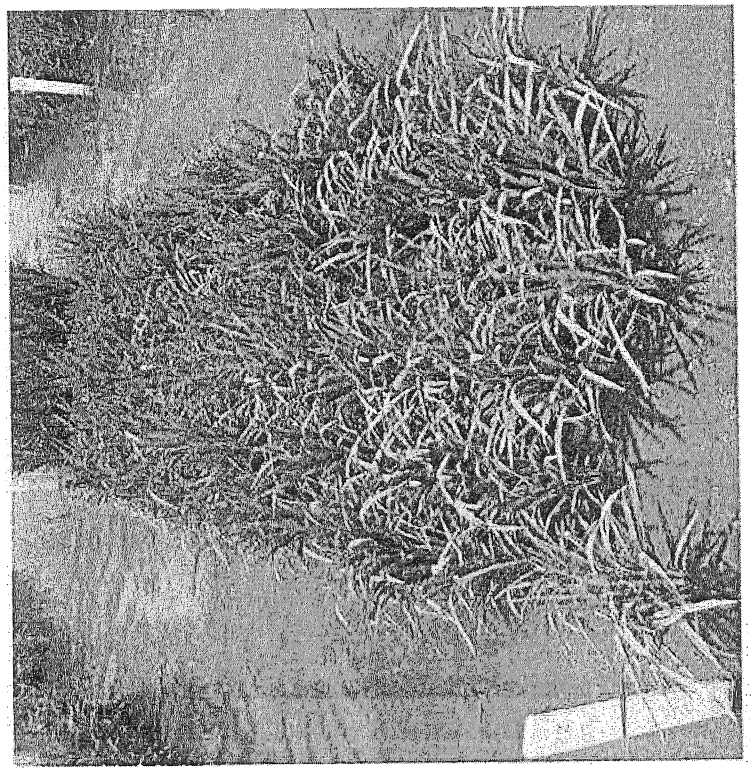


FIG. 3D

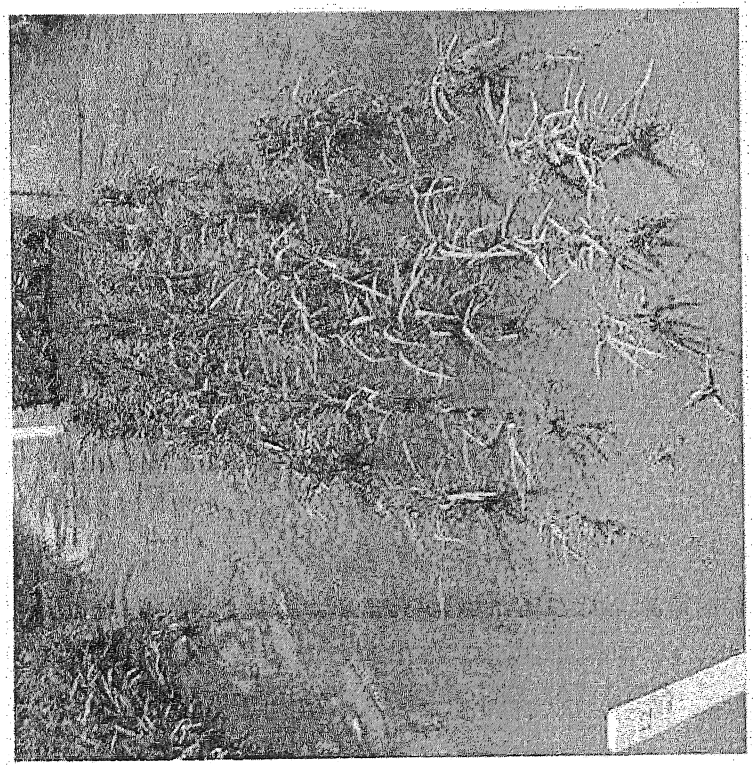


FIG. 3C

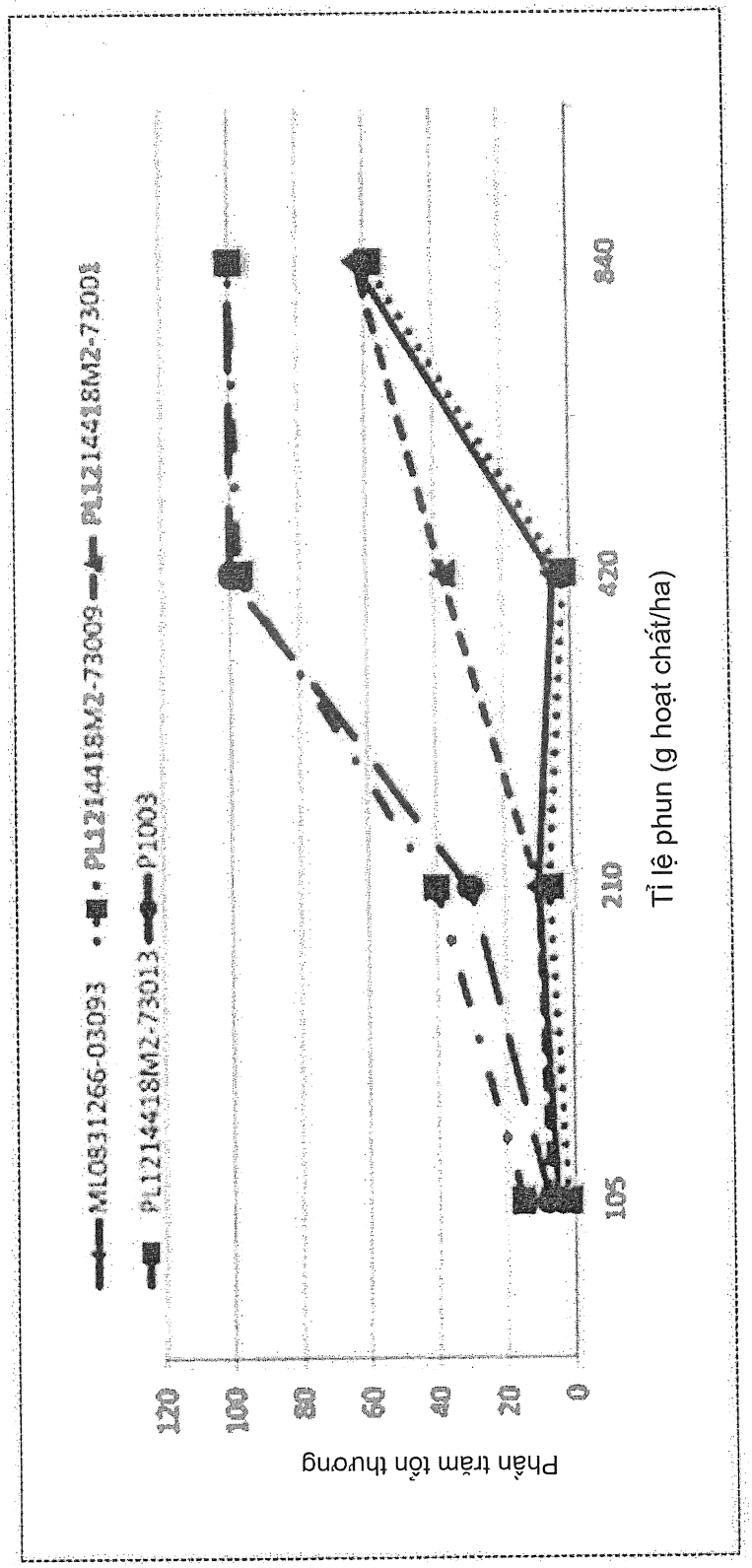

ML0831266-03093
PL12214418M2-73009
PL12214418M2-73008
PL12214418M2-73013
P1003
Phần trăm tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
105
210
420
840
Tỉ lệ phun (g hoạt chất/ha)

FIG. 4

FIG. 5B

FIG. 5A

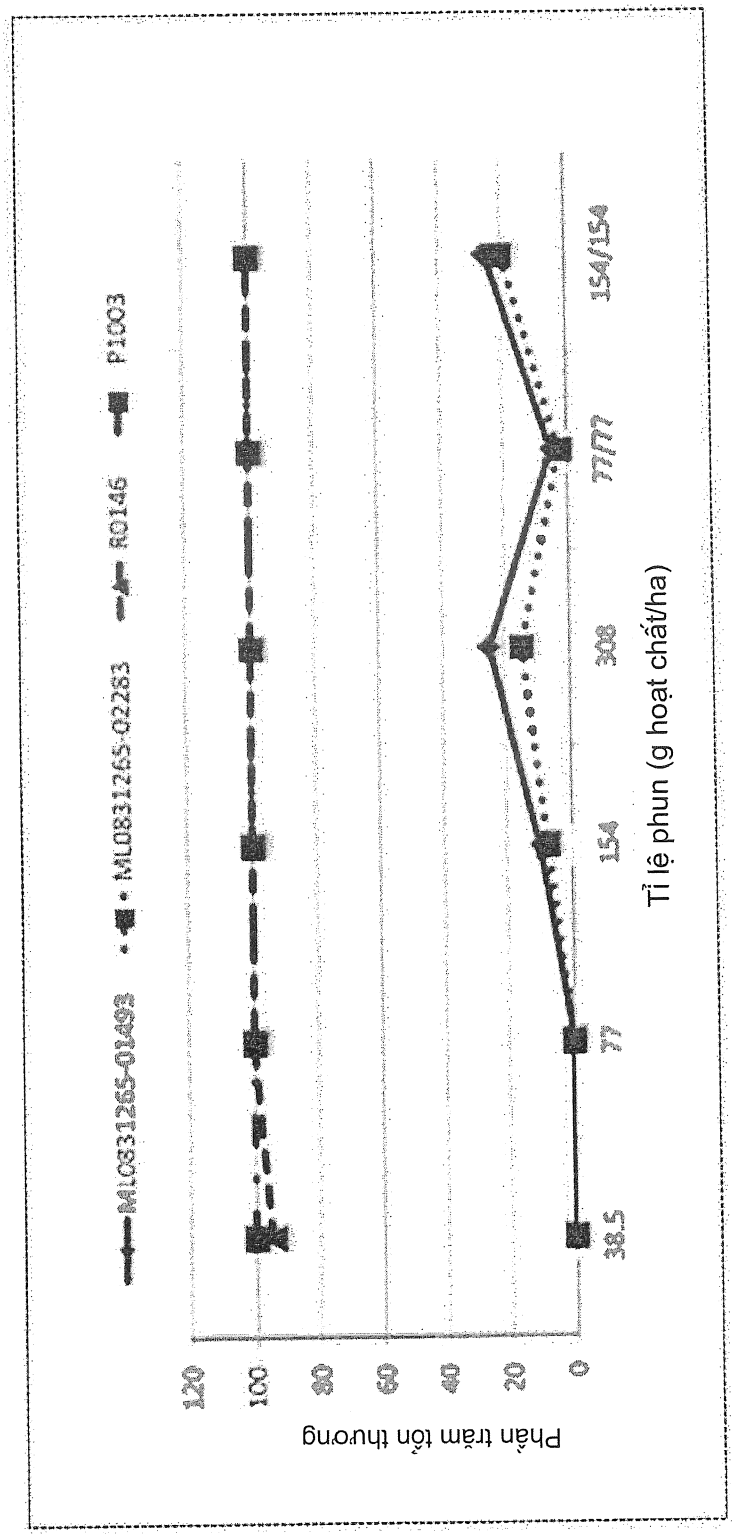

ML0831265-01493
ML0831265-02263
R0146
P1003
Phần trăm tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
38.5
77
154
308
77/77
154/154
Tỉ lệ phun (g hoạt chất/ha)

FIG. 6

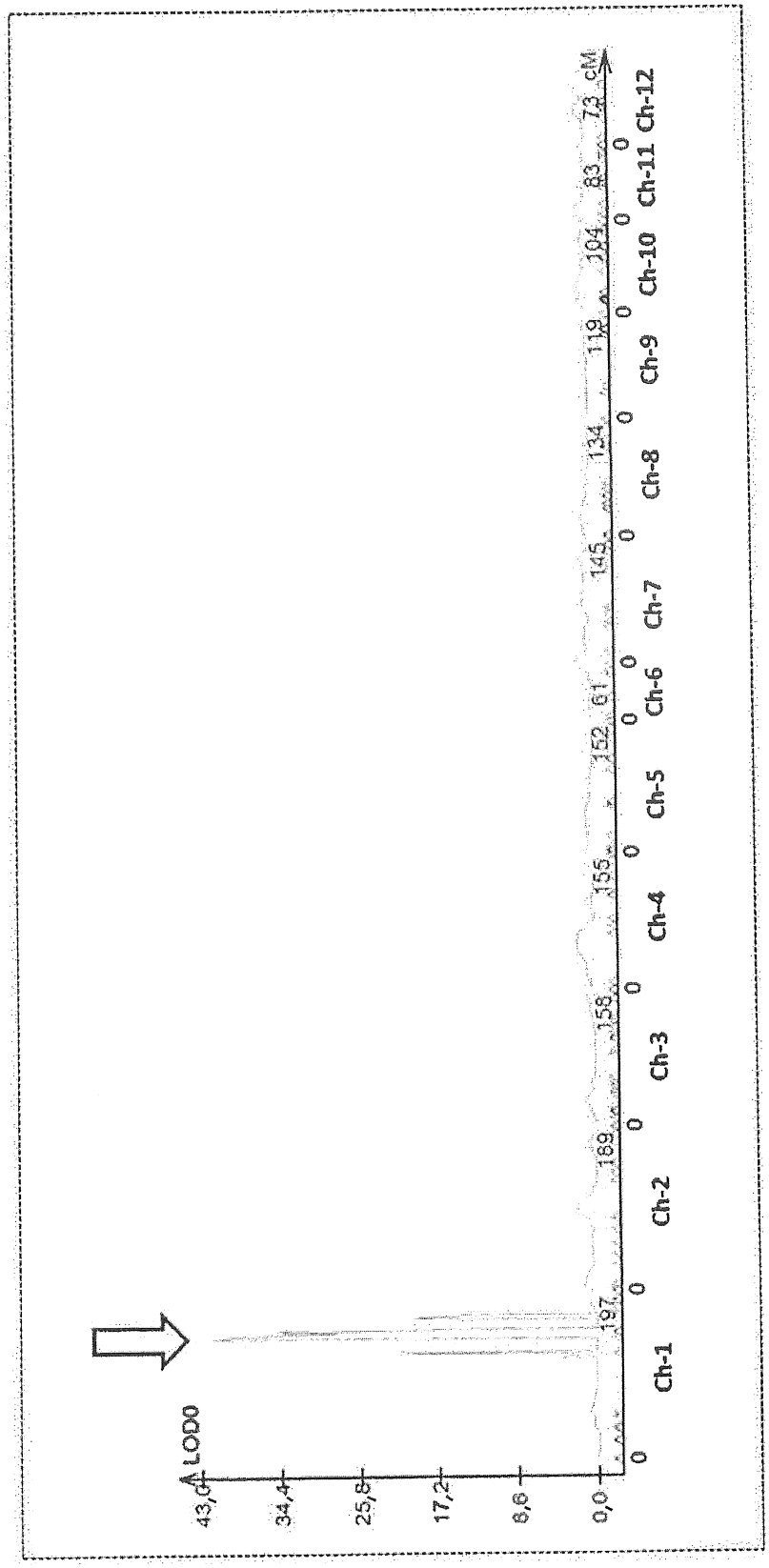

LOD0
43,0
34,4
25,8
17,2
8,6
0,0
0
197
189
158
155
152
61
145
134
119
104
83
73
cM
Ch-1
Ch-2
Ch-3
Ch-4
Ch-5
Ch-6
Ch-7
Ch-8
Ch-9
Ch-10
Ch-11
Ch-12

FIG. 7

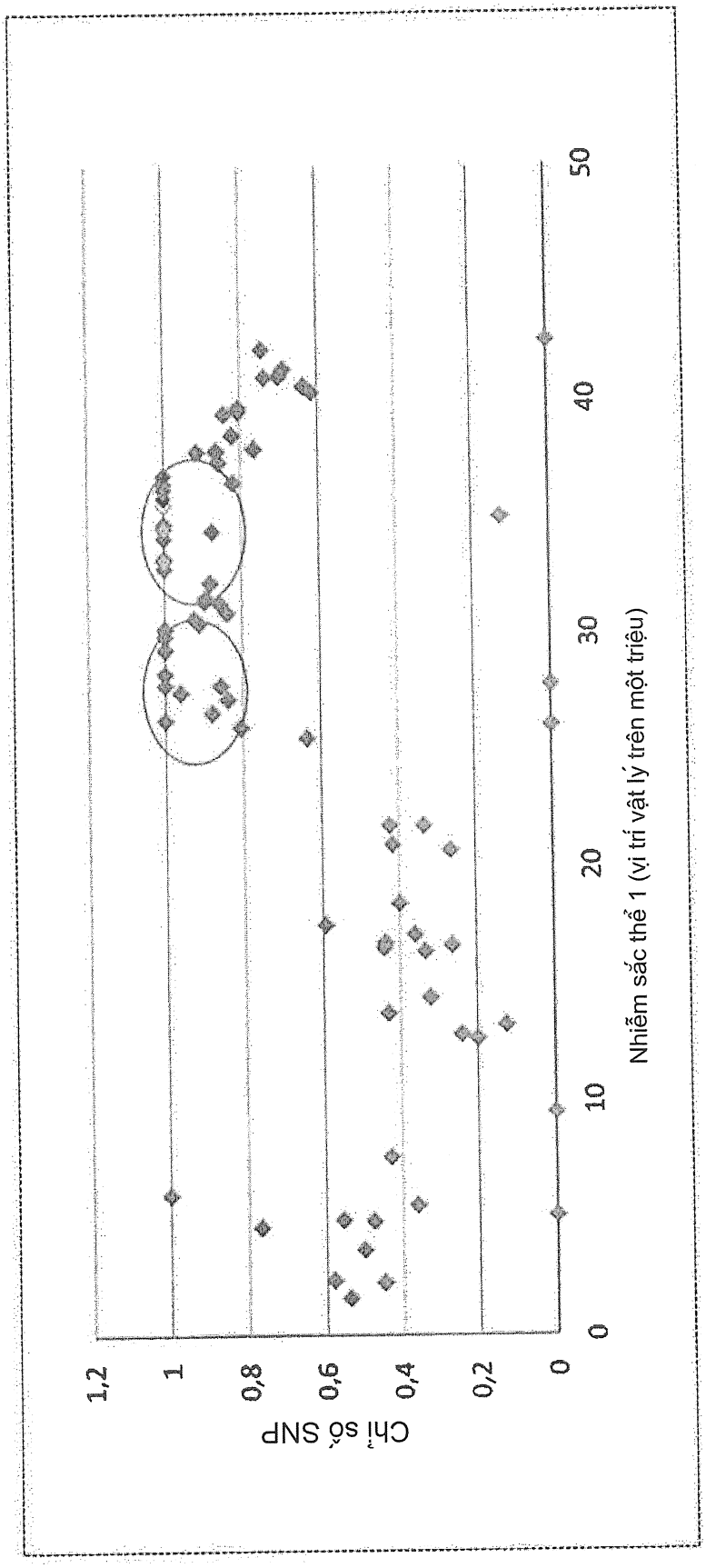

Chỉ số SNP
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
10
20
30
40
50
Nhiễm sắc thể 1 (vị trí vật lý trên một triệu)

FIG. 8

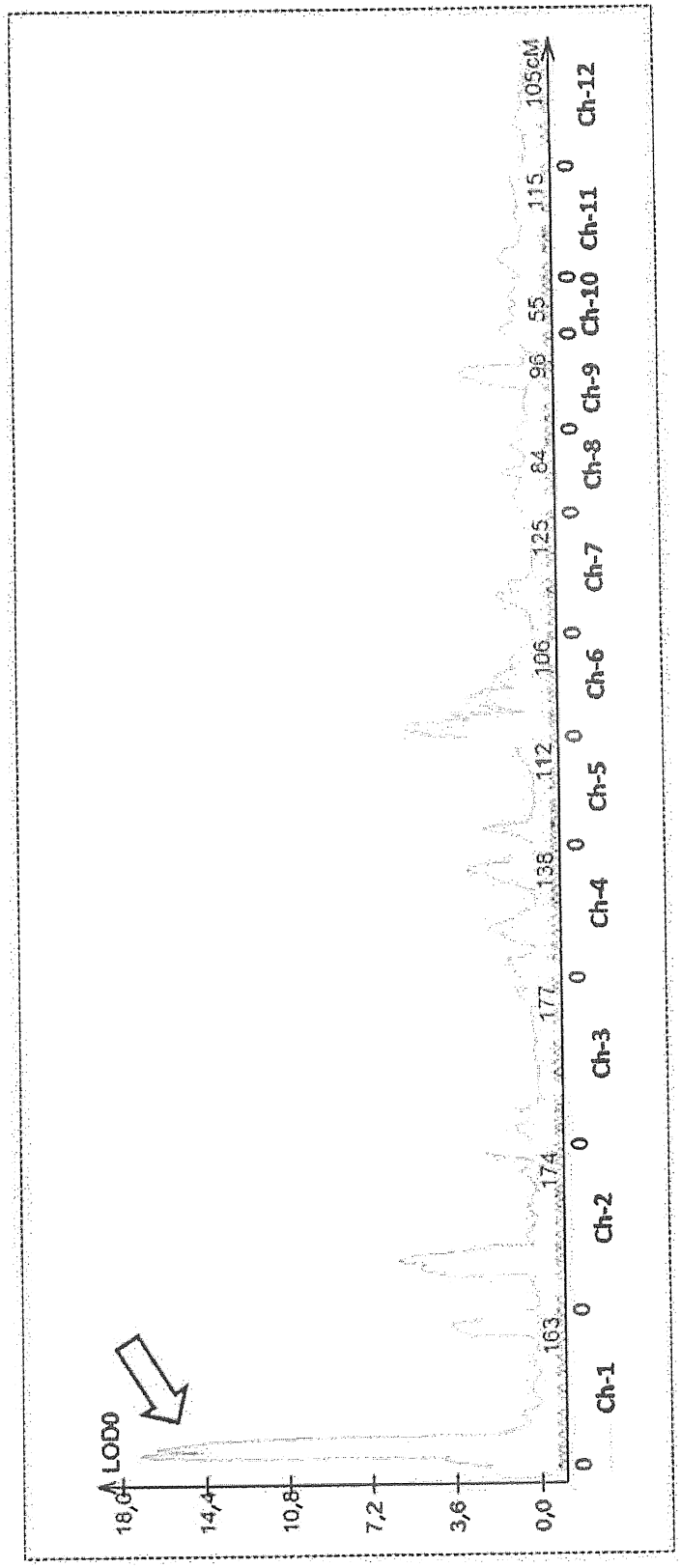

18,0
14,4
10,8
7,2
3,6
0,0
LOD0
0
Ch-1
163
0
Ch-2
174
0
Ch-3
177
0
Ch-4
138
0
Ch-5
112
0
Ch-6
106
0
Ch-7
125
0
Ch-8
84
0
Ch-9
96
0
Ch-10
55
0
Ch-11
115
0
Ch-12
105cM

FIG. 9

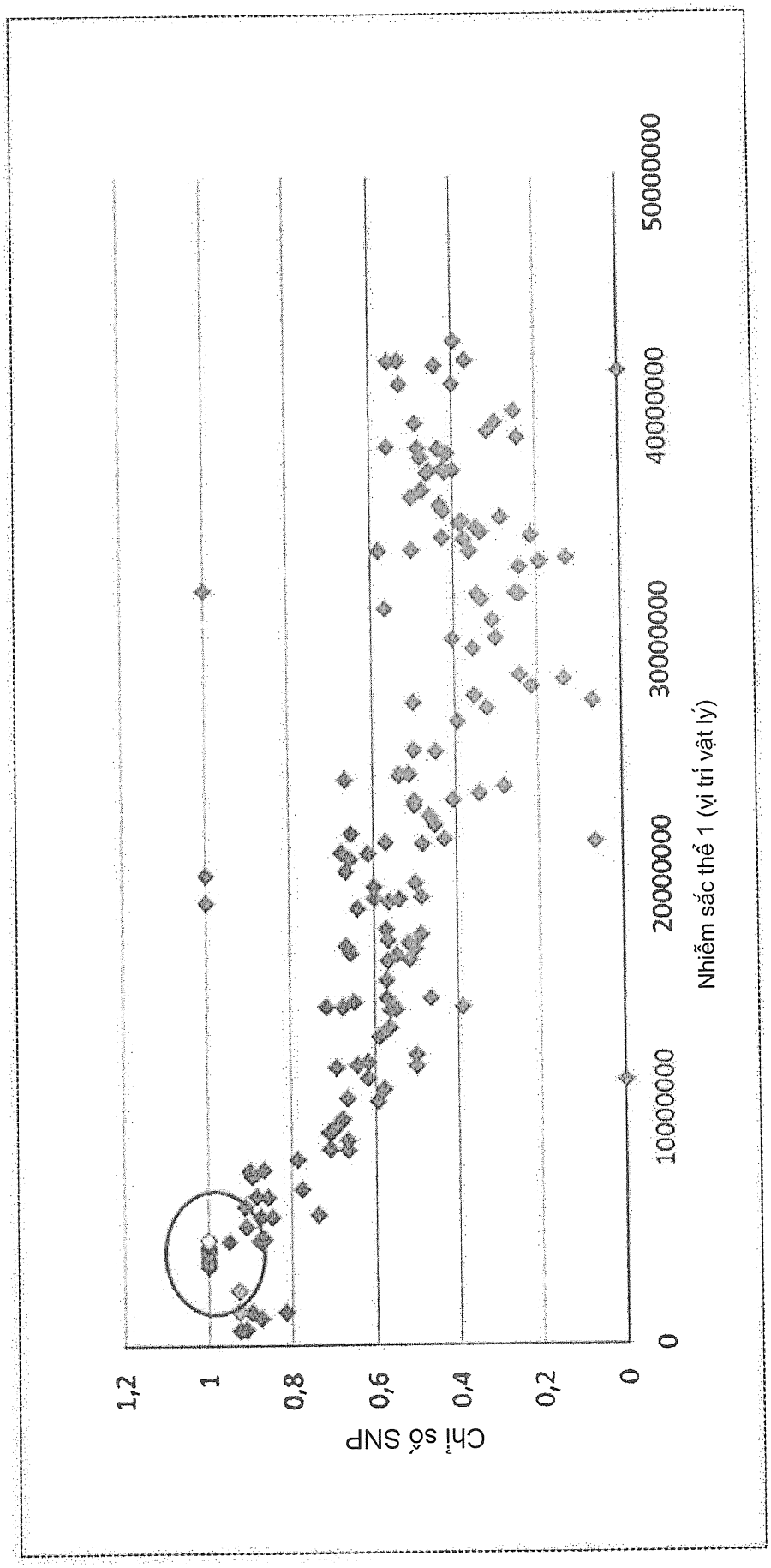

Chỉ số SNP
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
10000000
20000000
30000000
40000000
50000000
Nhiễm sắc thể 1 (vị trí vật lý)

FIG. 10

Dòng tách F4 từ tải tổ hợp QTL trên NST 1 — ML0831266-03093 (HPPDi-HPPDnijxML0831265-01493(RTA1)

Loc Seq#	Notes	id1002788	id1002809	id1002833	id1002842	id1002871	id1002896	id1002906	C1-3568176	id1002928	id1002936	id1002947	id1002962	id1002979	id1003026	id1003037	id1003064	id1003102	id1003163	id1003225	id1003245	id1003251	id1003261	id1003271	id1003279	id1003304	id1003325	id1003348	id1003370	id1003376	C1-4052710	id1003386	id1003397	id1003423	id1003456	id1003483	id1003490
76030	L-017	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76039	L-017	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76054	L-017	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76007	L-017	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76068	L-017	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76325	PI-061	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146	P1003	P1003	P1003	P1003	P1003	R0146
76380	PI-093	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76089	L-017	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76367	PI-093	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76315	PI-061	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76032	L-017	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76097	L-017	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76377	PI-093	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146
76049	L-017	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146	R0146

FIG. 11

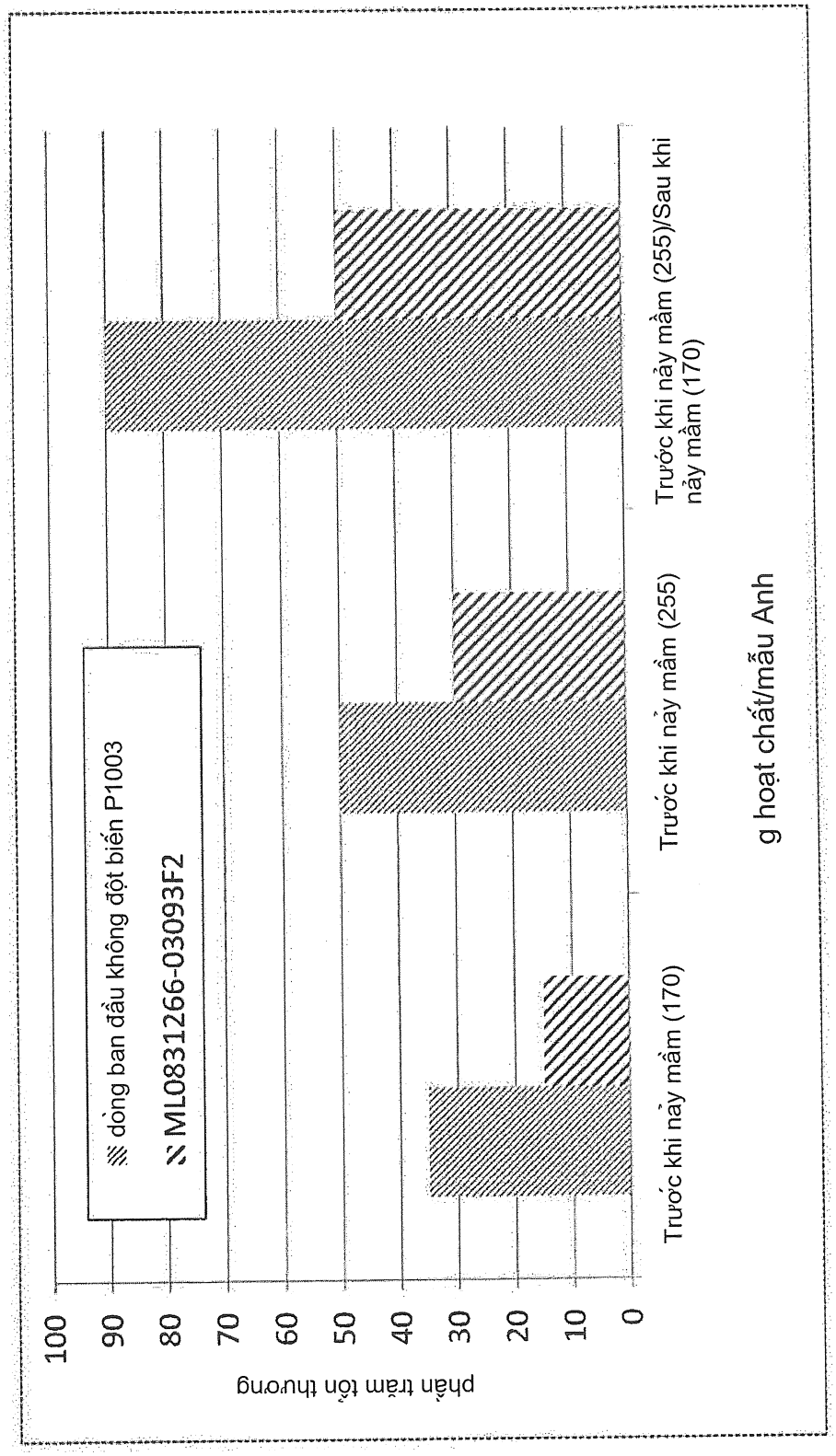

dòng ban đầu không đột biến P1003
ML0831266-03093F2
phần trăm tổn thương
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Trước khi nảy mầm (170)
Trước khi nảy mầm (255)
Trước khi nảy mầm (255)/Sau khi nảy mầm (170)
g hoạt chất/mẫu Anh

FIG. 12A

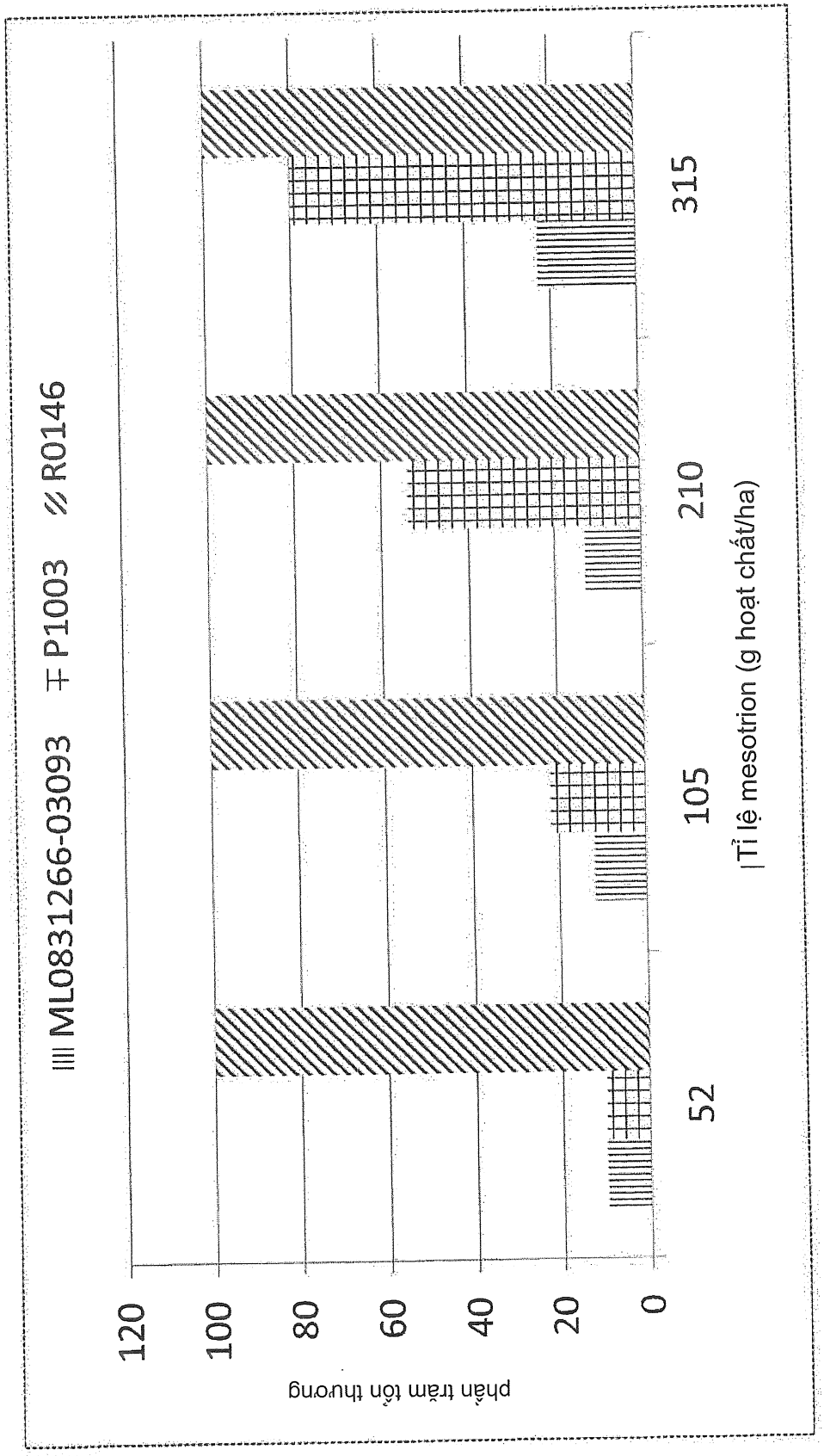

ML0831266-03093
P1003
R0146
120
100
80
60
40
20
0
phần trăm tổn thương
52
105
210
315
Tỉ lệ mesotrion (g hoạt chất/ha)

FIG. 12B

```
NIPPONBARE   CCTGTTCTGC TAGGAATAAT AGAACTACAT ACTGCTATGA TTTTCCACTG GTGAGTTGAC
R0146        CCTGTTCTGC TAGGAATAAT AGAACTACAT ACTGCTATGA TTTTCCACTG GTGAGTTGAC
09PM72399    -------TGC TAGGAATAAT AGAACTACAT ACTGCTATGA TTTTCCACTG GTGAGTTGAC

NIPPONBARE   TGCTCCCTTA TATTCAATGC ATTACCATAG CAAATTCATA TTCGTTCATG TTGTCAAAAT
R0146        TGCTCCCTTA TATTCAATGC ATTACCATAG CAAATTCATA TTCGTTCATG TTGTCAAAAT
09PM72399    TGCTCCCTTA TATTCAATGC ATTACCATAG CAAATTCATA TTCGTTCATG TTGTCAAAAT

NIPPONBARE   AAGCCGATGA AAATTCAAAA CTGTAGGCAT TTGAAACTGC AGTGAGGAAG TCATGGTCCT
R0146        AAGCCGATGA AAATTCAAAA CTGTAGGCAT TTGAAACTGC AGTGAGGAAG TCATGGTCCT
09PM72399    AAGCCGATGA AAATTCAAAA CTGTAGGCAT TTGAAACTGC AGTGAGGAAG TCATGGTCCT

NIPPONBARE   CTAGTACCTC TGGTGCTTCT AAAGGTGTTG AAAATGCCCA ATGTTATGTT AAAGCTACAG
R0146        CTAGTACCTC TGGTGCTTCT AAAGGTGTTG AAAATGCCCA ATGTTATGTT AAAGCTACAG
09PM72399    CTAGTACCTC TGGTGCTTCT AAAGGTGTTG AAAATGCCCA ATGTTATGTT AAAGCTACAG

NIPPONBARE   AGTTGGTATT TGCGGACAAA CATGGGTCAT GGGGCACTCC TTTAGTTCAA ATGGACCGGC
R0146        AGTTGGTATT TGCGGACAAA CATGGGTCAT GGGGCACTCC TTTAGTTCAA ATGGACCGGC
09PM72399    AGTTGGTATT TGCGGACAAA CATGGGTCAT GGGGCACTCC TTTAGTTCAA ATGGACCGGC

NIPPONBARE   CTGCTGGGCT CAATGACATT GGTATGGTAG CTTGGACCTT GAAGATGTCC ACTCCTGAAT
R0146        CTGCTGGGCT CAATGACATT GGTATGGTAG CTTGGACCTT GAAGATGTCC ACTCCTGAAT
09PM72399    CTGCTGGGCT CAATGACATT GGTATGGTAG CTTGGACCTT GAAGATGTCC ACTCCTGAAT

NIPPONBARE   TTCCTAGTGG TAGGGAGATT ATTGTTGTTG CAAATGATAT TACGTTCAGA GCTGGATCAT
R0146        TTCCTAGTGG TAGGGAGATT ATTGTTGTTG CAAATGATAT TACGTTCAGA GCTGGATCAT
09PM72399    TTCCTAGTGG TAGGGAGATT ATTGTTGTTG CAAATGATAT TACGTTCAGA GCTGGATCAT

NIPPONBARE   TTGGCCCAAG GGAAGATGCA TTTTTTGAAG CTGTTACCAA CCTAGCCTGT GAGAAGAAAC
R0146        TTGGCCCAAG GGAAGATGCA TTTTTTGAAG CTGTTACCAA CCTAGCCTGT GAGAAGAAAC
09PM72399    TTGGCCCAAG GGAAGATGCA TTTTTTGAAG CTGTTACCAA CCTAGCCTGT GAGAAGAAAC

NIPPONBARE   TTCCTCTTAT TTATTTGGCA GCAAATTCTG GTGCTCGAAT TGGCATAGCA GATGAAGTGA
R0146        TTCCTCTTAT TTATTTGGCA GCAAATTCTG GTGCTCGAAT TGGCATAGCA GATGAAGTGA
09PM72399    TTCCTCTTAT TTATTTGGCA GCAAATTCTG GTGCTCGAAT TGGCATAGCA GATGAAGTGA

NIPPONBARE   AATCTTGCTT CCGTGTTGGG TGGTCTGATG ATGGCAGCCC TGAACGTGGG TTTCAGTACA
R0146        AATCTTGCTT CCGTGTTGGG TGGTCTGATG ATGGCAGCCC TGAACGTGGG TTTCAGTACA
09PM72399    AATCTTGCTT CCGTGTTGGG TGGTCTGATG ATGGCAGCCC TGAACGTGGG TTTCAGTACA

NIPPONBARE   TTTATCTAAG CGAAGAAGAC TATGCTCGTA TTGGCACTTC TGTCATAGCA CATAAGATGC
R0146        TTTATCTAAG CGAAGAAGAC TATGCTCGTA TTGGCACTTC TGTCATAGCA CATAAGATGC
09PM72399    TTTATCTAAG CGAAGAAGAC TATGCTCGTA TTGGCACTTC TGTCATAGCA CATAAGATGC

NIPPONBARE   AGCTAGACAG TGGTGAAATT AGGTGGGTTA TTGATTCTGT TGTGGGCAAG GAAGATGGAC
R0146        AGCTAGACAG TGGTGAAATT AGGTGGGTTA TTGATTCTGT TGTGGGCAAG GAAGATGGAC
09PM72399    AGCTAGACAG TGGTGAAATT AGGTGGGTTA TTGATTCTGT TGTGGGCAAG GAAGATGGAC

NIPPONBARE   TTGGTGTGGA GAATATACAT GGAAGTGCTG CTATTGCCAG TGCTTATTCT AGGGCATATA
R0146        TTGGTGTGGA GAATATACAT GGAAGTGCTG CTATTGCCAG TGCTTATTCT AGGGCATATA
09PM72399    TTGGTGTGGA GAATATACAT GGAAGTGCTG CTATTGCCAG TGCTTATTCT AGGGCATATA

NIPPONBARE   AGGAGACATT TACACTTACA TTTGTGACTG GAAGAACTGT TGGAATAGGA GCTTATCTTG
R0146        AGGAGACATT TACACTTACA TTTGTGACTG GAAGAACTGT TGGAATAGGA GCTTATCTTG
09PM72399    AGGAGACATT TACACTTACA TTTGTGACTG GAAGAACTGT TGGAATAGGA GCTTATCTTG

NIPPONBARE   CTCGACTTGG CATCCGGTGC ATACAGCGTC TTGACCAGCC TATTATTCTT ACAGGCTATT
R0146        CTCGACTTGG CATCCGGTGC ATACAGCGTC TTGACCAGCC TATTATTCTT ACAGGCTATT
09PM72399    CTCGACTTGG CATCCGGTGC ATACAGCGTC TTGACCAGCC TATTATTCTT ACAGGCTATT

NIPPONBARE   CTGCACTGAA CAAGCTTCTT GGGCGGGAAG TGTACAGCTC CCACATGCAG TTGGGTGGTC
R0146        CTGCACTGAA CAAGCTTCTT GGGCGGGAAG TGTACAGCTC CCACATGCAG TTGGGTGGTC
09PM72399    CTGCACTGAA CAAGCTTCTT GGGCGGGAAG TGTACAGCTC CCACATGCAG TTGGGTGGTC

NIPPONBARE   CCAAAATCAT GGCAACTAAT GGTGTTGTCC ATCTTACTGT TTCAGATGAC CTTGAAGGCG
R0146        CCAAAATCAT GGCAACTAAT GGTGTTGTCC ATCTTACTGT TTCAGATGAC CTTGAAGGCG
09PM72399    CCAAAATCAT GGCAACTAAT GGTGTTGTCC ATCTTACTGT TTCAGATGAC CTTGAAGGCG
```

FIG. 13

```
NIPPONBARE   TTTCTAATAT ATTGAGGTGG CTCAGTTATG TTCCTGCCTA CATTGGTGGA CCACTTCCAG
R0146        TTTCTAATAT ATTGAGGTGG CTCAGTTATG TTCCTGCCTA CATTGGTGGA CCACTTCCAG
09PM72399    TTTCTAATAT ATTGAGGTGG CTCAGTTATG TTCCTGCCTA CATTGGTGGA CCACTTCCAG

NIPPONBARE   TAACAACACC GTTGGACCCA CCGGACAGAC CTGTTGCATA CATTCCTGAG AACTCGTGTG
R0146        TAACAACACC GTTGGACCCA CCGGACAGAC CTGTTGCATA CATTCCTGAG AACTCGTGTG
09PM72399    TAACAACACC GTTGGACCCA CCGGACAGAC CTGTTGCATA CATTCCTGAG AACTCGTGTG

NIPPONBARE   ATCCTCGAGC GGCTATCCGT GGTGTTGATG ACAGCCAAGG GAAATGGTTA GGTGGTATGT
R0146        ATCCTCGAGC GGCTATCCGT GGTGTTGATG ACAGCCAAGG GAAATGGTTA GGTGGTATGT
09PM72399    ATCCTCGAGC GGCTATCCGT GGTGTTGATG ACAGCCAAGG GAAATGGTTA GGTGGTATGT

NIPPONBARE   TTGATAAAGA CAGCTTTGTG GAAACATTTG AAGGTTGGGC TAAGACAGTG GTTACTGGCA
R0146        TTGATAAAGA CAGCTTTGTG GAAACATTTG AAGGTTGGGC TAAGACAGTG GTTACTGGCA
09PM72399    TTGATAAAGA CAGCTTTGTG GAAACATTTG AAGGTTGGGC TAAGACAGTG GTTACTGGCA

NIPPONBARE   GAGCAAAGCT TGGTGGAATT CCAGTGGGTG TGATAGCTGT GGAGACTCAG ACCATGATGC
R0146        GAGCAAAGCT TGGTGGAATT CCAGTGGGTG TGATAGCTGT GGAGACTCAG ACCATGATGC
09PM72399    GAGCAAAGCT TGGTGGAATT CCAGTGGGTG TGATAGCTGT GGAGACTCAG ACCATGATGC

NIPPONBARE   AAACTATCCC TGCTGACCCT GGTCAGCTTG ATTCCCGTGA GCAATCTGTT CCTCGTGCTG
R0146        AAACTATCCC TGCTGACCCT GGTCAGCTTG ATTCCCGTGA GCAATCTGTT CCTCGTGCTG
09PM72399    AAACTATCCC TGCTGACCCT GGTCAGCTTG ATTCCCGTGA GCAATCTGTT CCTCGTGCTG

NIPPONBARE   GACAAGTGTG GTTTCCAGAT TCTGCAACCA AGACTGCGCA GGCATTGCTG GACTTCAACC
R0146        GACAAGTGTG GTTTCCAGAT TCTGCAACCA AGACTGCGCA GGCATTGCTG GACTTCAACC
09PM72399    GACAAGTGTG GTTTCCAGAT TCTGCAACCA AGACTGCGCA GGCATTGCTG GACTTCAACC

NIPPONBARE   GTGAAGGATT ACCTCTGTTC ATCCTCGCTA ACTGGAGAGG CTTCTCTGGT GGACAAAGAG
R0146        GTGAAGGATT ACCTCTGTTC ATCCTCGCTA ACTGGAGAGG CTTCTCTGGT GGACAAAGAG
09PM72399    GTGAAGGATT ACCTCTGTTC ATCCTCGCTA ACTGGAGAGG CTTCTCTGGT GGACAAAGAG

NIPPONBARE   ATCTTTTTGA AGGAATTCTT CAGGCTGGCT CGACTATTGT TGAGAACCTT AGGACATACA
R0146        ATCTTTTTGA AGGAATTCTT CAGGCTGGCT CGACTATTGT TGAGAACCTT AGGACATACA
09PM72399    ATCTTTTTGA AGGAATTCTT CAGGCTGGCT CGACTATTGT TGAGAACCTT AGGACATACA

NIPPONBARE   ATCAGCCTGC CTTTGTCTAC ATTCCCATGG CTGCAGAGCT ACGAGGAGGG GCTTGGGTTG
R0146        ATCAGCCTGC CTTTGTCTAC ATTCCCATGG CTGCAGAGCT ACGAGGAGGG GCTTGGGTTG
09PM72399    ATCAGCCTGC CTTTGTCTAC ATTCCCATGG CTGCAGAGCT ACGAGGAGGG GCTTGGGTTG

NIPPONBARE   TGGTTGATAG CAAGATAAAC CCAGACCGCA TTGAGTGCTA TGCTGAGAGG ACTGCAAAAG
R0146        TGGTTGATAG CAAGATAAAC CCAGACCGCA TTGAGTGCTA TGCTGAGAGG ACTGCAAAAG
09PM72399    TGGTTGATAG CAAGATAAAC CCAGACCGCA TTGAGTGCTA TGCTGAGAGG ACTGCAAAAA

NIPPONBARE   GCAATGTTCT GGAACCGCAA GGGTTAATTG AGATCAAGTT CAGGTCAGAG GAACTCCAGG
R0146        GCAATGTTCT GGAACCGCAA GGGTTAATTG AGATCAAGTT CAGGTCAGAG GAACTCCAGG
09PM72399    GCAATGTTCT GGAACCGCAA GGGTTAATTG AGATCAAGTT CAGGTCAGAG GAACTCCAGG

NIPPONBARE   ATTGCATGAG TCGGCTTGAC CCAACATTAA TTGATCTGAA AGCAAAACTC GAAGTAGCAA
R0146        ATTGCATGAG TCGGCTTGAC CCAACATTAA TTGATCTGAA AGCAAAACTC GAAGTAGCAA
09PM72399    ATTGCATGAG TCGGCTTGAC CCAACATTAA TTGATCTGAA AGCAAAACTC GAAGTAGCAA

NIPPONBARE   ATAAAAATGG AAGTGCTGAC ACAAAATCGC TTCAAGAAAA TATAGAAGCT CGAACAAAAC
R0146        ATAAAAATGG AAGTGCTGAC ACAAAATCGC TTCAAGAAAA TATAGAAGCT CGAACAAAAC
09PM72399    ATAAAAATGG AAGTGCTGAC ACAAAATCGC TTCAAGAAAA TATAGAAGCT CGAACAAAAC

NIPPONBARE   AGTTGATGCC TCTATATACT CAGATTGCGA TACGGTTTGC TGAATTGCAT GATACATCCC
R0146        AGTTGATGCC TCTATATACT CAGATTGCGA TACGGTTTGC TGAATTGCAT GATACATCCC
09PM72399    AGTTGATGCC TCTATATACT CAGATTGCGA TACGGTTTGC TGAATTGCAT GATACATCCC

NIPPONBARE   TCAGAATGGC TGCGAAAGGT GTGATTAAGA AAGTTGTGGA CTGGGAAGAA TCACGATCTT
R0146        TCAGAATGGC TGCGAAAGGT GTGATTAAGA AAGTTGTGGA CTGGGAAGAA TCACGATCTT
09PM72399    TCAGAATGGC TGCGAAAGGT GTGATTAAGA AAGTTGTGGA CTGGGAAGAA TCACGATCTT

NIPPONBARE   TCTTCTATAA GAGATTACGG AGGAGGATCT CTGAGGATGT TCTTGCAAAA GAAATTAGAG
R0146        TCTTCTATAA GAGATTACGG AGGAGGATCT CTGAGGATGT TCTTGCAAAA GAAATTAGAG
09PM72399    TCTTCTATAA GAGATTACGG AGGAGGATCT CTGAGGATGT TCTTGCAAAA GAAATTAGAG
```

FIG. 13 (tiếp)

```
NIPPONBARE   CTGTAGCAGG TGAGCAGTTT TCCCACCAAC CAGCAATCGA GCTGATCAAG AAATGGTATT
R0146        CTGTAGCAGG TGAGCAGTTT TCCCACCAAC CAGCAATCGA GCTGATCAAG AAATGGTATT
09PM72399    CTGTAGCAGG TGAGCAGTTT TCCCACCAAC CAGCAATCGA GCTGATCAAG AAATGGTATT

NIPPONBARE   CAGCTTCACA TGCAGCTGAA TGGGATGATG ACGATGCTTT TGTTGCTTGG ATGGATAACC
R0146        CAGCTTCACA TGCAGCTGAA TGGGATGATG ACGATGCTTT TGTTGCTTGG ATGGATAACC
09PM72399    CAGCTTCACA TGCAGCTGAA TGGGATGATG ACGATGCTTT TGTTGCTTGG ATGGATAACC

NIPPONBARE   CTGAAAACTA CAAGGATTAT ATTCAATATC TTAAGGCTCA AAGAGTATCC CAATCCCTCT
R0146        CTGAAAACTA CAAGGATTAT ATTCAATATC TTAAGGCTCA AAGAGTATCC CAATCCCTCT
09PM72399    CTGAAAACTA CAAGGATTAT ATTCAATATC TTAAGGCTCA AAGAGTATCC CAATCCCTCT

NIPPONBARE   CAAGTCTTTC AGATTCCAGC TCAGATTTGC AAGCCCTGCC ACAGGGTCTT TCCATGTTAC
R0146        CAAGTCTTTC AGATTCCAGC TCAGATTTGC AAGCCCTGCC ACAGGGTCTT TCCATGTTAC
09PM72399    CAAGTCTTTC AGATTCCAGC TCAGATTTGC AAGCCCTGCC ACAGGGTCTT TCCATGTTAC

NIPPONBARE   TAGATAAGGT AATTAGCTTA CTGATGCTTA TATAAATTCT TTTTCATTAC ATATGGCTGG
R0146        TAGATAAGGT AATTAGCTTA CTGATGCTTA TATAAATTCT TTTTCATTAC ATATGGCTGG
09PM72399    TAGATAAGGT AATTAGCTTA CTGATGCTTA TATAAATTCT TTTTCATTAC ATATGGCTGG

NIPPONBARE   AGAACTATCT AATCAAATAA TGATTATAAT TCCAATCGTT CTTTTTATGC CATTATGATC
R0146        AGAACTATCT AATCAAATAA TGATTATAAT TCCAATCGTT CTTTTTATGC CATTATGATC
09PM72399    AGAACTATCT AATCAAATAA TGATTATAAT TCCAATCGTT CTTTTTATGC CATTATGATC

NIPPONBARE   TTCTGAAATT TCCTTCTTTG GACACTTATT CAGATGGATC CCTCTAGAAG AGCTCAACTT
R0146        TTCTGAAATT TCCTTCTTTG GACACTTATT CAGATGGATC CCTCTAGAAG AGCTCAACTT
09PM72399    TTCTGAAATT TCCTTCTTTG GACACTTATT CAGATGGATC CCTCTAGAAG AGCTCAACTT

NIPPONBARE   GTTGAAGAAA TCAGGAAGGT CCTTGGTTGA ATCATATGAT G
R0146        GTTGAAGAAA TCAGGAAGGT CCTTGGTTGA ATCATATGAT G
09PM72399    GTTGAAGAAA TCAGGAAGGT CCTTGGTTGA ATCATATGAT G
```

FIG. 13 (tiếp)

```
NIPPONBARE   AFETAVRKSW SSSTSGASKG VENAQCYVKA TELVFADKHG SWGTPLVQMD RPAGLNDIGM
R0146        AFETAVRKSW SSSTSGASKG VENAQCYVKA TELVFADKHG SWGTPLVQMD RPAGLNDIGM
09PM72399    AFETAVRKSW SSSTSGASKG VENAQCYVKA TELVFADKHG SWGTPLVQMD RPAGLNDIGM

NIPPONBARE   VAWTLKMSTP EFPSGREIIV VANDITFRAG SFGPREDAFF EAVTNLACEK KLPLIYLAAN
R0146        VAWTLKMSTP EFPSGREIIV VANDITFRAG SFGPREDAFF EAVTNLACEK KLPLIYLAAN
09PM72399    VAWTLKMSTP EFPSGREIIV VANDITFRAG SFGPREDAFF EAVTNLACEK KLPLIYLAAN

NIPPONBARE   SGARIGIADE VKSCFRVGWS DDGSPERGFQ YIYLSEEDYA RIGTSVIAHK MQLDSGEIRW
R0146        SGARIGIADE VKSCFRVGWS DDGSPERGFQ YIYLSEEDYA RIGTSVIAHK MQLDSGEIRW
09PM72399    SGARIGIADE VKSCFRVGWS DDGSPERGFQ YIYLSEEDYA RIGTSVIAHK MQLDSGEIRW

NIPPONBARE   VIDSVVGKED GLGVENIHGS AAIASAYSRA YKETFTLTFV TGRTVGIGAY LARLGIRCIQ
R0146        VIDSVVGKED GLGVENIHGS AAIASAYSRA YKETFTLTFV TGRTVGIGAY LARLGIRCIQ
09PM72399    VIDSVVGKED GLGVENIHGS AAIASAYSRA YKETFTLTFV TGRTVGIGAY LARLGIRCIQ

NIPPONBARE   RLDQPIILTG YSALNKLLGR EVYSSHMQLG GPKINATNGV VHLTVSDDLE GVSNILRWLS
R0146        RLDQPIILTG YSALNKLLGR EVYSSHMQLG GPKINATNGV VHLTVSDDLE GVSNILRWLS
09PM72399    RLDQPIILTG YSALNKLLGR EVYSSHMQLG GPKINATNGV VHLTVSDDLE GVSNILRWLS

NIPPONBARE   YVPAYIGGPL PVTTPLDPPD RPVAYIPENS CDPRAAIRGV DDSQGKWLGG MFDKDSFVET
R0146        YVPAYIGGPL PVTTPLDPPD RPVAYIPENS CDPRAAIRGV DDSQGKWLGG MFDKDSFVET
09PM72399    YVPAYIGGPL PVTTPLDPPD RPVAYIPENS CDPRAAIRGV DDSQGKWLGG MFDKDSFVET

NIPPONBARE   FEGWAKTVVT GRAKLGGIPV GVIAVETQTM MQTIPADPGQ LDSREQSVPR AGQVWFPDSA
R0146        FEGWAKTVVT GRAKLGGIPV GVIAVETQTM MQTIPADPGQ LDSREQSVPR AGQVWFPDSA
09PM72399    FEGWAKTVVT GRAKLGGIPV GVIAVETQTM MQTIPADPGQ LDSREQSVPR AGQVWFPDSA

NIPPONBARE   TKTAQALLDF NREGLPLFIL ANWRGFSGGQ RDLFEGILQA GSTIVENLRT YNQPAFVYIP
R0146        TKTAQALLDF NREGLPLFIL ANWRGFSGGQ RDLFEGILQA GSTIVENLRT YNQPAFVYIP
09PM72399    TKTAQALLDF NREGLPLFIL ANWRGFSGGQ RDLFEGILQA GSTIVENLRT YNQPAFVYIP

NIPPONBARE   MAAELRGGAW VVVDSKINPD RIECYAERIA HGWVLEPQGL IEIKFRSEEL QDCMSRLDPT
R0146        MAAELRGGAW VVVDSKINPD RIECYAERIA HGWVLEPQGL IEIKFRSEEL QDCMSRLDPT
09PM72399    MAAELRGGAW VVVDSKINPD RIECYAERIA RSWVLEPQGL IEIKFRSEEL QDCMSRLDPT

NIPPONBARE   LIDLKAKLEV ANKNGSADTK SLQENIEART KQLMPLYTQI AIRFAELHDT SLRMAAKGVI
R0146        LIDLKAKLEV ANKNGSADTK SLQENIEART KQLMPLYTQI AIRFAELHDT SLRMAAKGVI
09PM72399    LIDLKAKLEV ANKNGSADTK SLQENIEART KQLMPLYTQI AIRFAELHDT SLRMAAKGVI

NIPPONBARE   KKVVDWEESR SFFYKRLRRR ISEDVLAKEI RAVAGEQFSH QPAIELIKKW YSASHAAEWD
R0146        KKVVDWEESR SFFYKRLRRR ISEDVLAKEI RAVAGEQFSH QPAIELIKKW YSASHAAEWD
09PM72399    KKVVDWEESR SFFYKRLRRR ISEDVLAKEI RAVAGEQFSH QPAIELIKKW YSASHAAEWD

NIPPONBARE   DDDAFVAWMD NPENYKDYIQ YLKAQRVSQS LSSLSDSSSD LQALPQGLSM LLDKV
R0146        DDDAFVAWMD NPENYKDYIQ YLKAQRVSQS LSSLSDSSSD LQALPQGLSM LLDKV
09PM72399    DDDAFVAWMD NPENYKDYIQ YLKAQRVSQS LSSLSDSSSD LQALPQGLSM LLDKV
```

FIG. 14

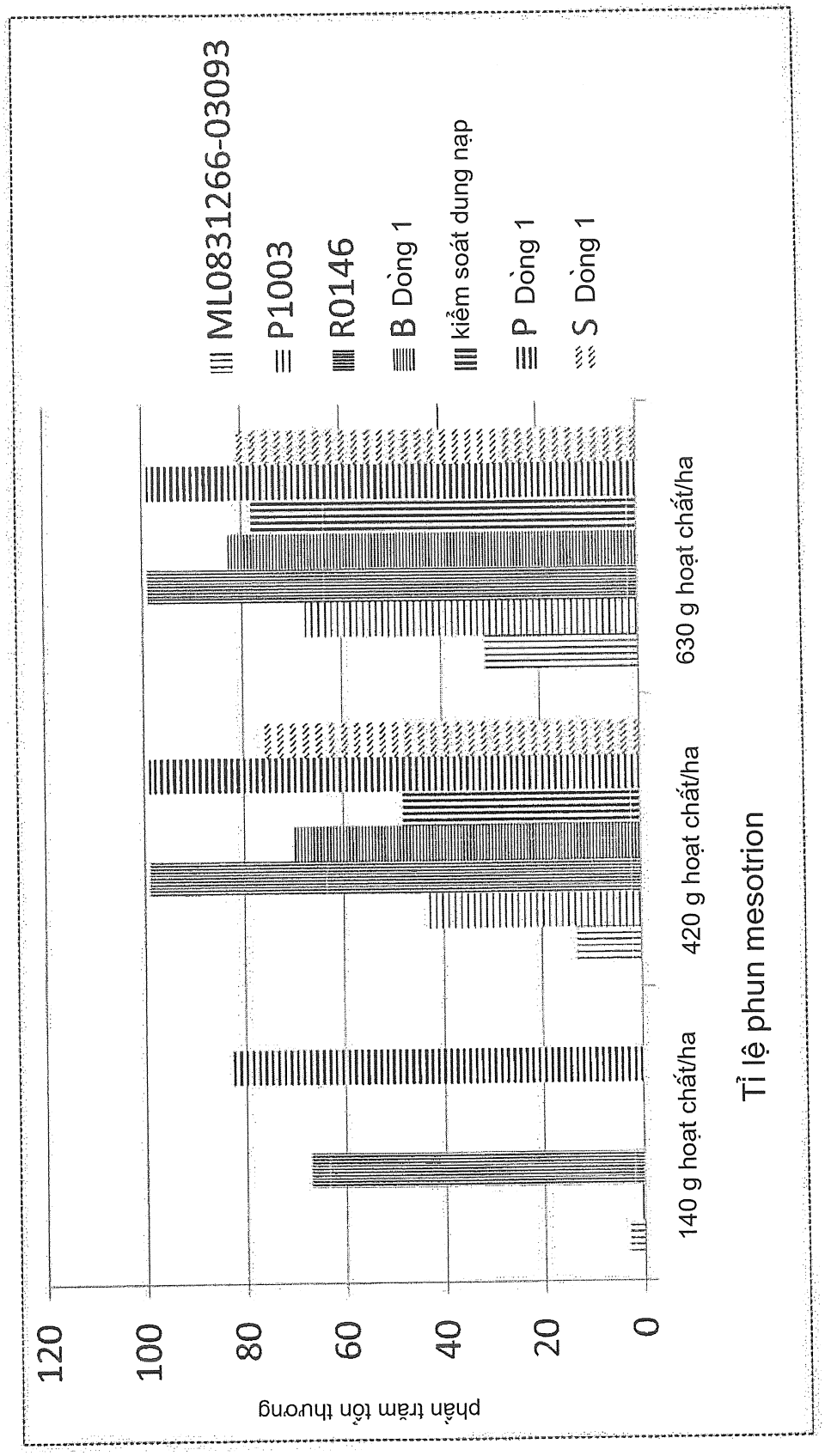

120
100
80
60
40
20
0
phần trăm tổn thương
140 g hoạt chất/ha
420 g hoạt chất/ha
630 g hoạt chất/ha
Tỉ lệ phun mesotrion
ML0831266-03093
P1003
R0146
B Dòng 1
kiểm soát dung nạp
P Dòng 1
S Dòng 1

FIG. 15

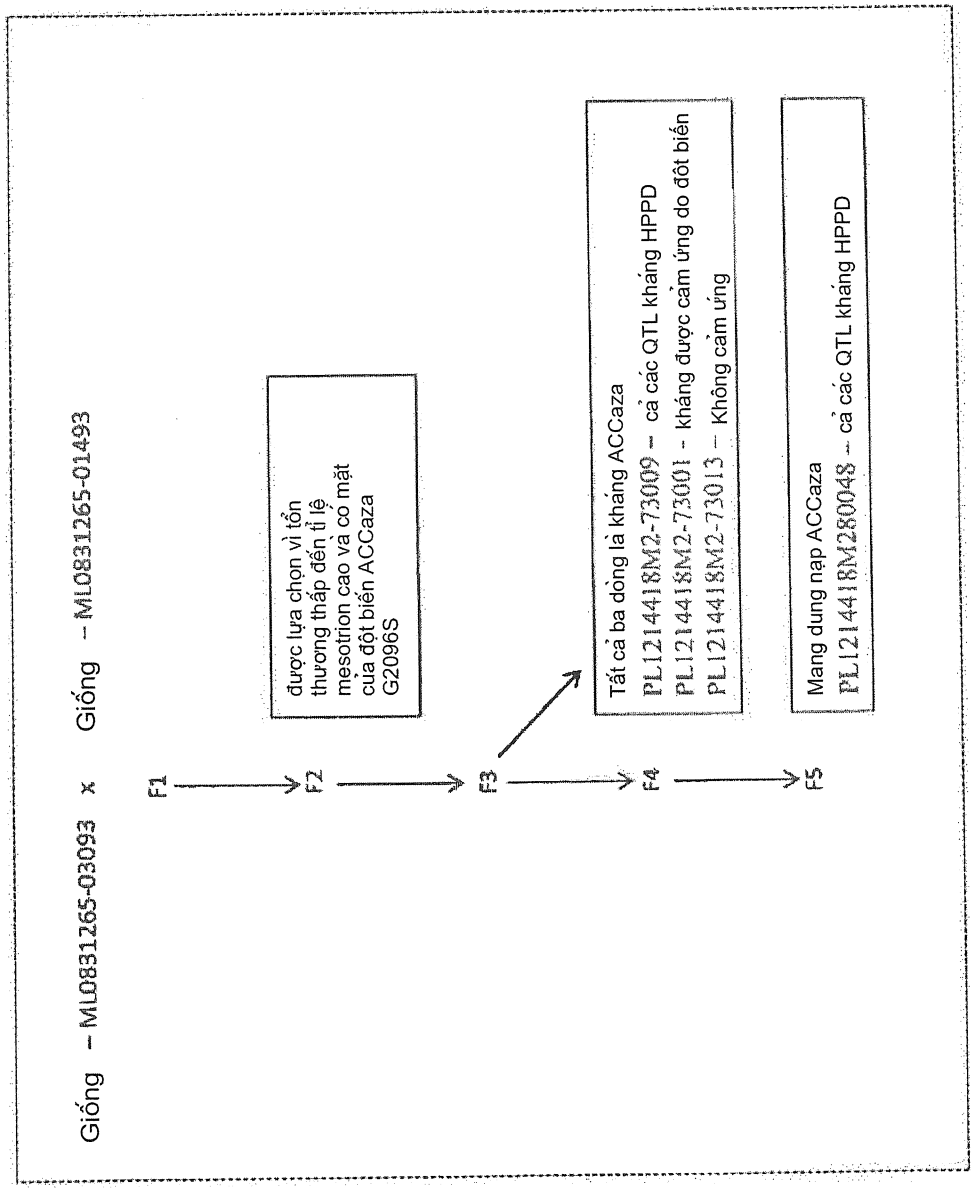

Giống – ML0831265-03093 x Giống – ML0831265-01493
F1
F2
được lựa chọn vì tổn thương thấp đến tỉ lệ mesotrion cao và có mặt của đột biến ACCaza G2096S
F3
F4
Tất cả ba dòng là kháng ACCaza
PL1214418M2-73009 – cả các QTL kháng HPPD
PL1214418M2-73001 - kháng được cảm ứng do đột biến
PL1214418M2-73013 – Không cảm ứng
F5
Mang dung nạp ACCaza
PL1214418M2860048 – cả các QTL kháng HPPD

FIG. 16

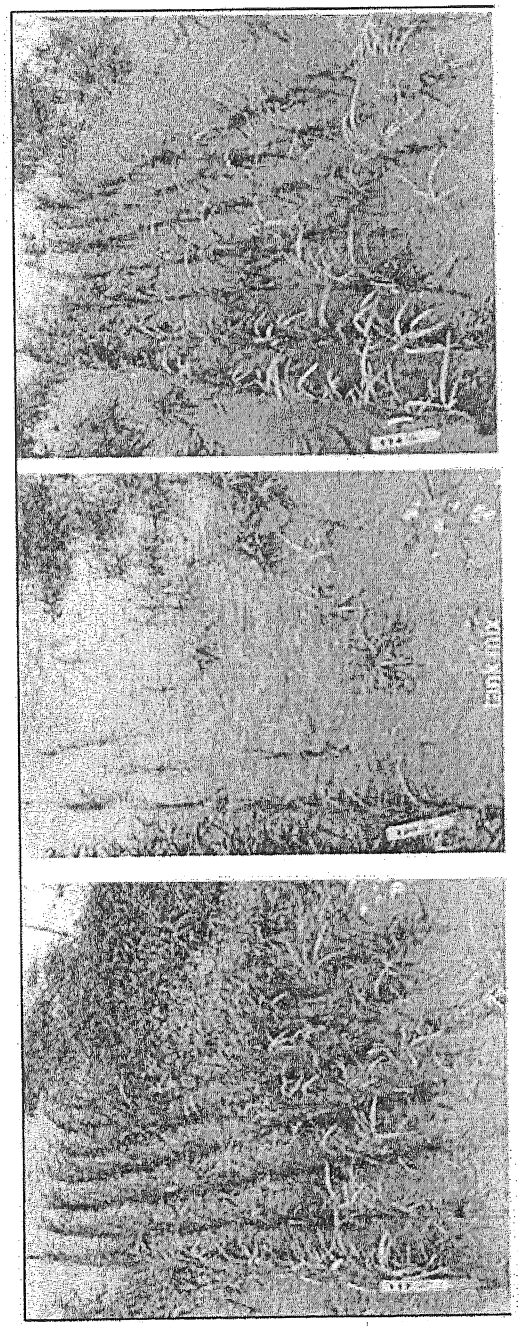


FIG. 17A FIG. 17B FIG. 17C

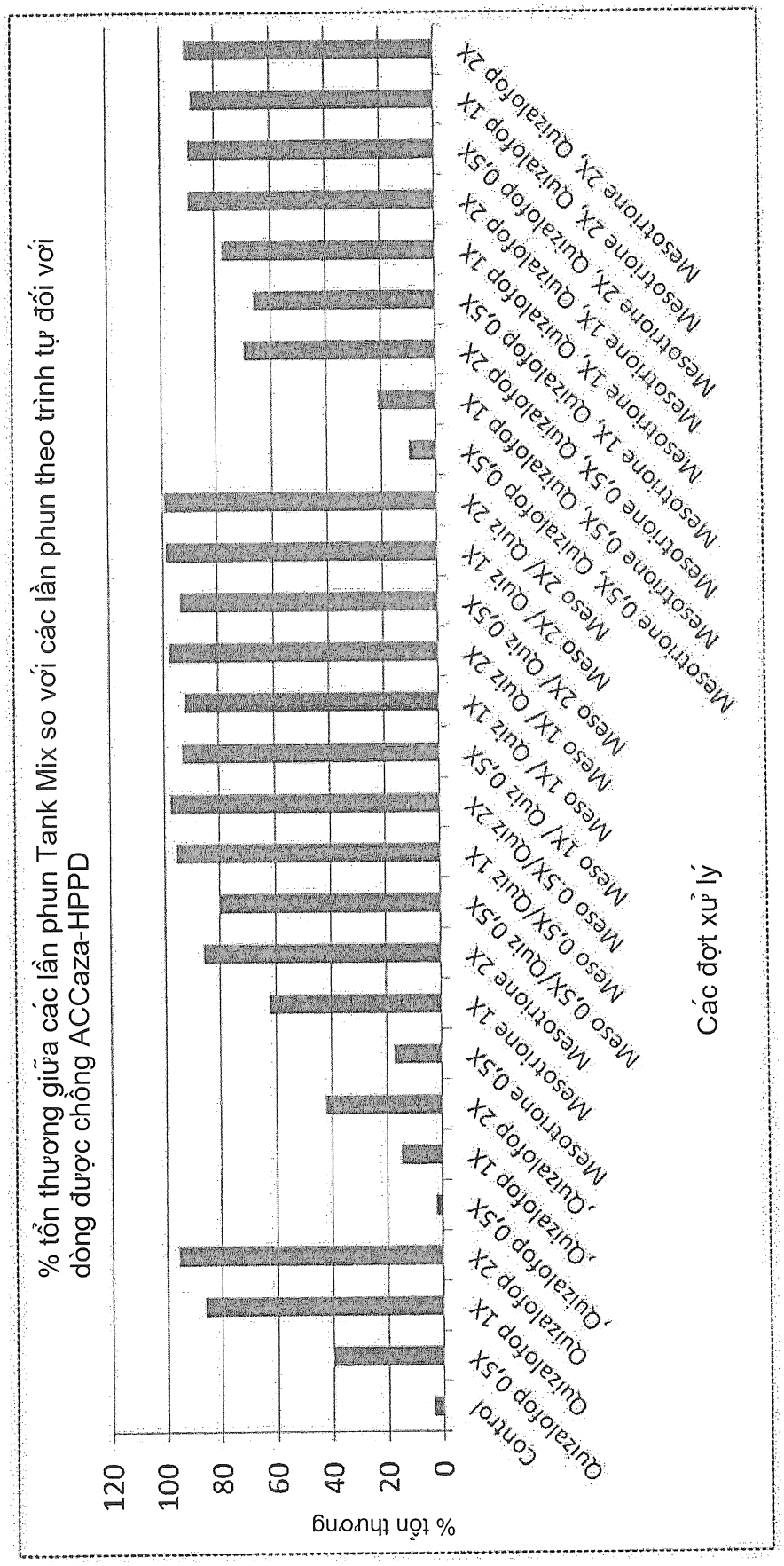

% tổn thương giữa các lần phun Tank Mix so với các lần phun theo trình tự đối với dòng được chồng ACCaza-HPPD
% tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
Control
Quizalofop 0,5x
Quizalofop 1x
Quizalofop 2x
Quizalofop 0,5x
Quizalofop 1x
Quizalofop 2x
Mesotrione 0,5x
Mesotrione 1x
Mesotrione 2x
Meso 0,5x/Quiz 0,5x
Meso 0,5x/Quiz 1x
Meso 0,5x/Quiz 2x
Meso 1x/ Quiz 0,5x
Meso 1x/ Quiz 1x
Meso 1x/ Quiz 2x
Meso 2x/ Quiz 0,5x
Meso 2x/ Quiz 1x
Meso 2x/ Quiz 2x
Mesotrione 0,5x, Quizalofop 0,5x
Mesotrione 0,5x, Quizalofop 1x
Mesotrione 0,5x, Quizalofop 2x
Mesotrione 1x, Quizalofop 0,5x
Mesotrione 1x, Quizalofop 1x
Mesotrione 1x, Quizalofop 2x
Mesotrione 2x, Quizalofop 0,5x
Mesotrione 2x, Quizalofop 1x
Mesotrione 2x, Quizalofop 2x
Các đợt xử lý

FIG. 17D

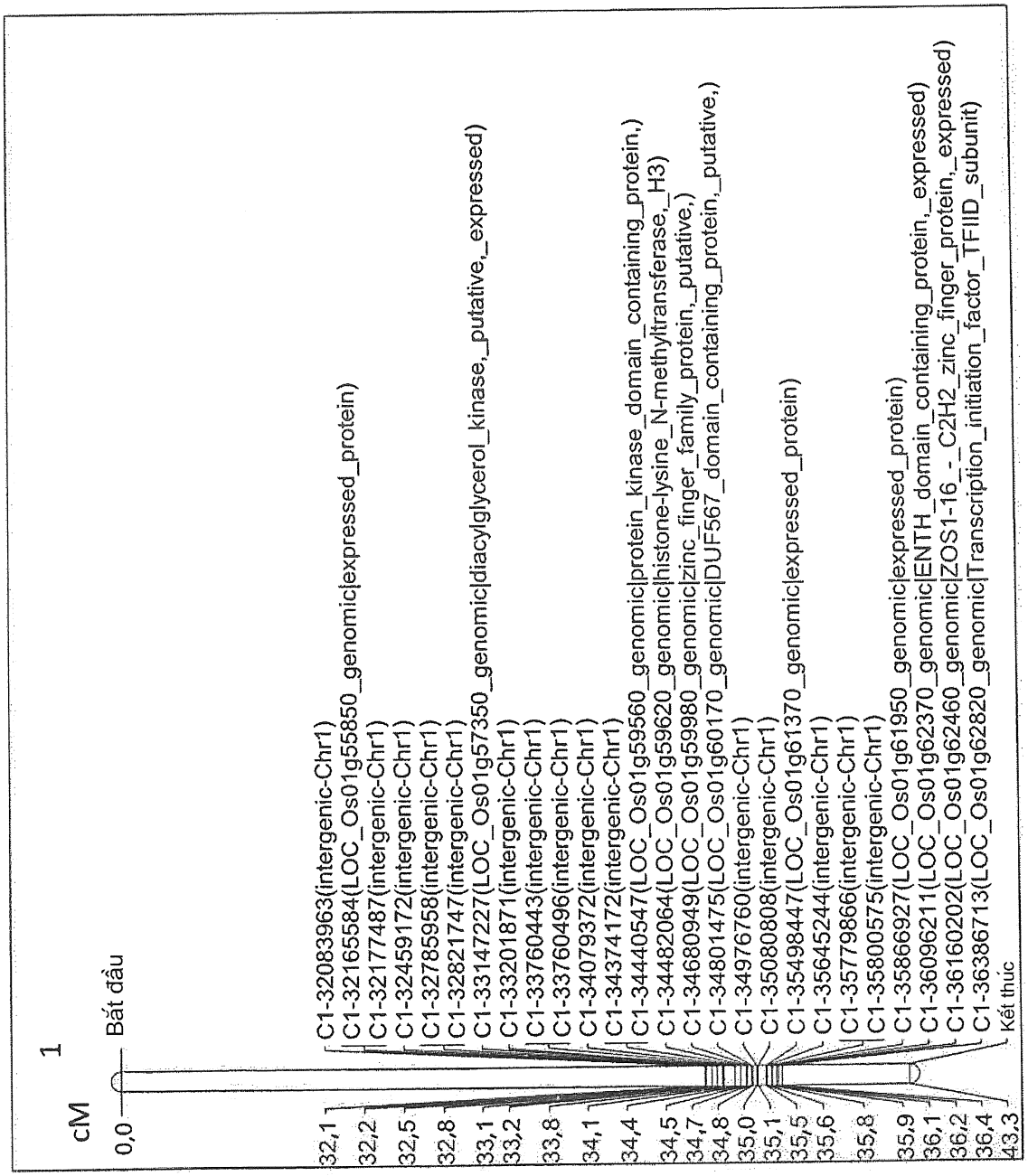

cM
1
0,0
Bắt đầu
32,1
32,2
32,5
32,8
33,1
33,2
33,8
34,1
34,4
34,5
34,7
34,8
35,0
35,1
35,5
35,6
35,8
35,9
36,1
36,2
36,4
43,3
C1-32083963(intergenic-Chr1)
C1-32165584(LOC_Os01g55850_genomic|expressed_protein)
C1-32177487(intergenic-Chr1)
C1-32459172(intergenic-Chr1)
C1-32785958(intergenic-Chr1)
C1-32821747(intergenic-Chr1)
C1-33147227(LOC_Os01g57350_genomic|diacylglycerol_kinase,_putative,_expressed)
C1-33201871(intergenic-Chr1)
C1-33760443(intergenic-Chr1)
C1-33760496(intergenic-Chr1)
C1-34079372(intergenic-Chr1)
C1-34374172(intergenic-Chr1)
C1-34440547(LOC_Os01g59560_genomic|protein_kinase_domain_containing_protein,)
C1-34482064(LOC_Os01g59620_genomic|histone-lysine_N-methyltransferase,_H3)
C1-34680949(LOC_Os01g59980_genomic|zinc_finger_family_protein,_putative,)
C1-34801475(LOC_Os01g60170_genomic|DUF567_domain_containing_protein,_putative,)
C1-34976760(intergenic-Chr1)
C1-35080808(intergenic-Chr1)
C1-35498447(LOC_Os01g61370_genomic|expressed_protein)
C1-35645244(intergenic-Chr1)
C1-35779866(intergenic-Chr1)
C1-35800575(intergenic-Chr1)
C1-35866927(LOC_Os01g61950_genomic|expressed_protein)
C1-36096211(LOC_Os01g62370_genomic|ENTH_domain_containing_protein,_expressed)
C1-36160202(LOC_Os01g62460_genomic|ZOS1-16_-_C2H2_zinc_finger_protein,_expressed)
C1-36386713(LOC_Os01g62820_genomic|Transcription_initiation_factor_TFIID_subunit)
Kết thúc

FIG. 18

Source#	id1019752	C1-32785958	C1-33147227	C1-33201871	C1-34374172	C1-34482064	C1-34680949	C1-35498447	C1-35779866	C1-36160202	C1-36386713	C1-36747244	id1023338	id1024223	id1024441	id1025751	id1025754
14USAV60021-113	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-822	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	C	T	A	C	T
14USAV60021-303	T	G	A	T	A	A	A	A	A	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-499	T	G	A	T	A	A	A	A	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-514	T	G	A	T	A	A	A	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A	C T	T C
14USAV60021-117	T	G	A	T	A	A	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-171	T	G	A	T	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-308	T	G	A	T	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-755	T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-284	G T	G A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	C	G	T	T	C
14USAV60021-492	G T	G A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	C	G	T	C T	T C
14USAV60021-888	G T	G A	A G	T C	A	A	A	A	A	A	A	A	C	G	T	T	C
14USAV60021-110	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A	A	A	A	C	G	T	C T	T C
14USAV60021-646	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A	A	A	C	G	A T	C T	T C
14USAV60021-655	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A	A	A	C	G	T	T	C
14USAV60021-457	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A	A	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-361	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A	C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-1113	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A	C	G	T	T	C
14USAV60021-263	T	A	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	C	G	T	T	C
14USAV60021-895	G	A	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	T	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-314	G	A	G	C	G	G	G	G	G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-332	G	A	G	C	G	G	G	G	G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-266	G	A	G	C	G	G	G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-416	G	A	G	C	G	G	G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	T	C
14USAV60021-735	G	A	G	C	G	G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T	A	C	T
14USAV60021-496	G	A	G	C	G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-115	G	A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-919	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-378	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-130	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C	T
14USAV60021-873	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A	C	T
14USAV60021-217	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T	A	C	T
14USAV60021-518	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	G	T	T	A	C	T
14USAV60021-712	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	G	G	T	T	A	C	T
14USAV60021-304	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	G	G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	C T	T C
14USAV60021-485	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	T	C
14USAV60021-1032	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	T G	A T	T	C
14USAV60021-931	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	T C	G	T	T	C
14USAV60021-853	G T	G A	A G	T C	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	A G	C	G	T	C T	T C

FIG. 19

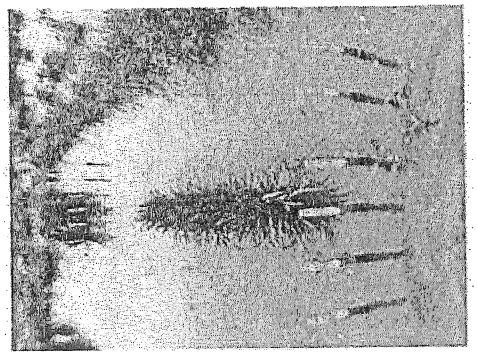


FIG. 20C

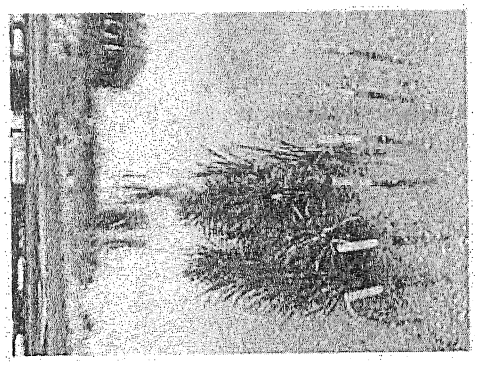


FIG. 20B

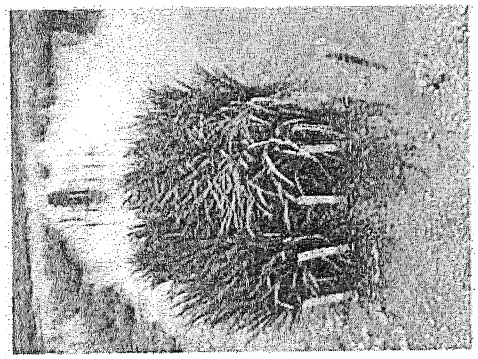


FIG. 20A

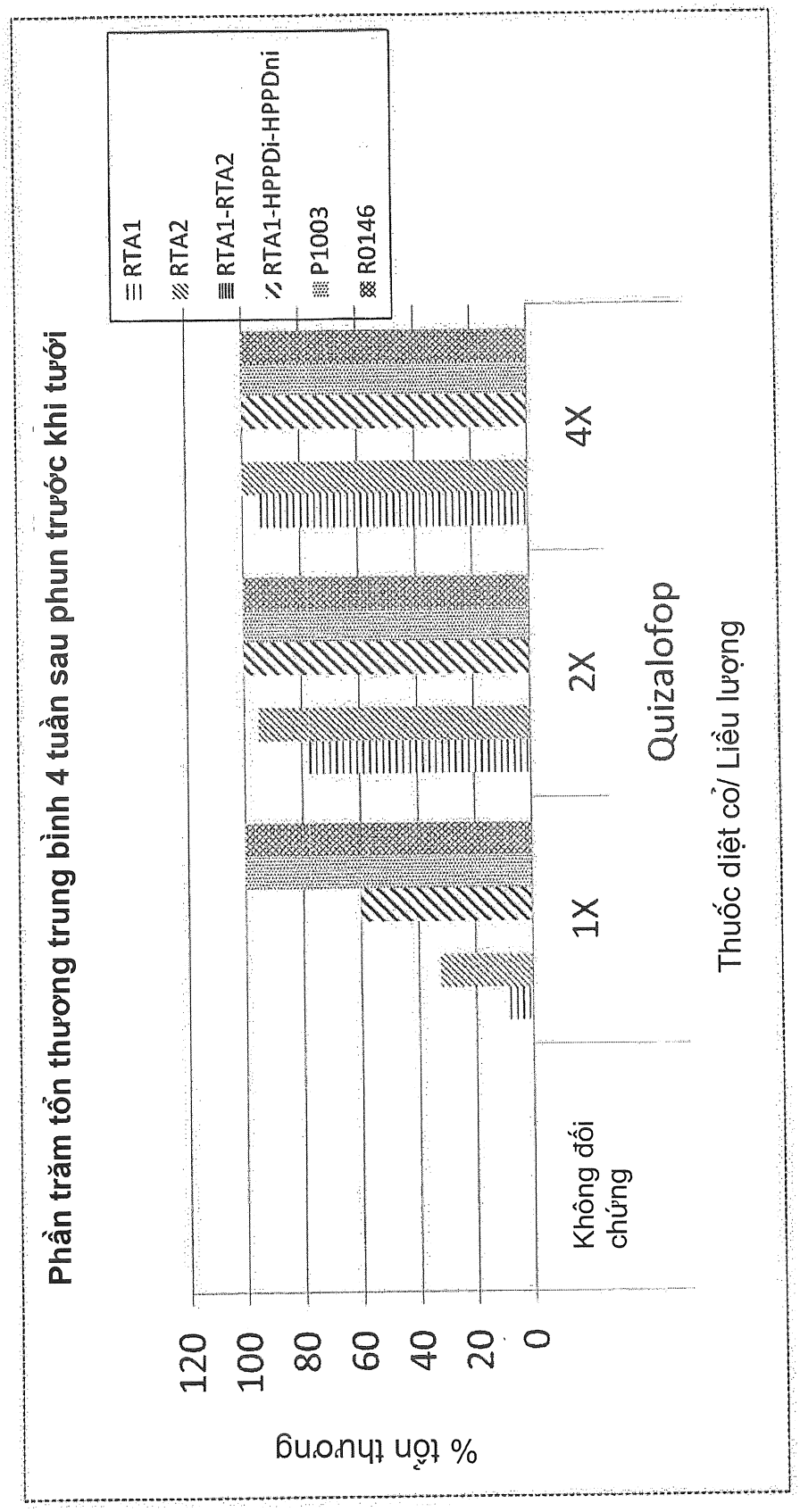

Phần trăm tổn thương trung bình 4 tuần sau phun trước khi tưới
RTA1
RTA2
RTA1-RTA2
RTA1-HPPDi-HPPDni
P1003
R0146
% tổn thương
120
100
80
60
40
20
0
Không đối chứng
1X
2X
4X
Quizalofop
Thuốc diệt cỏ/ Liều lượng

FIG. 20D

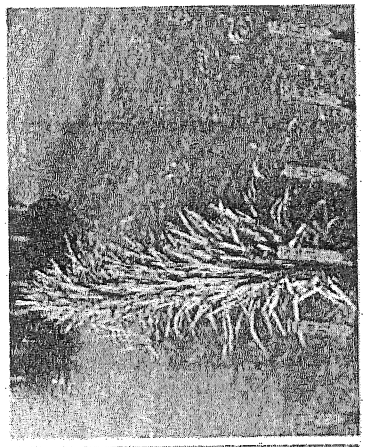


FIG. 21D

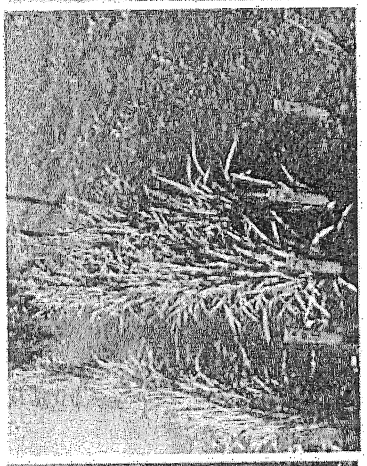


FIG. 21C

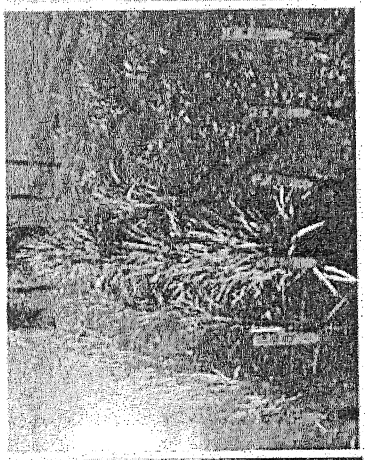


FIG. 21B

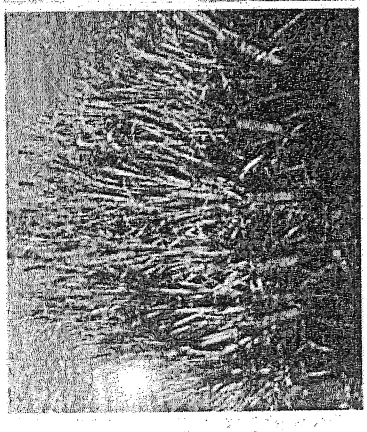


FIG. 21A

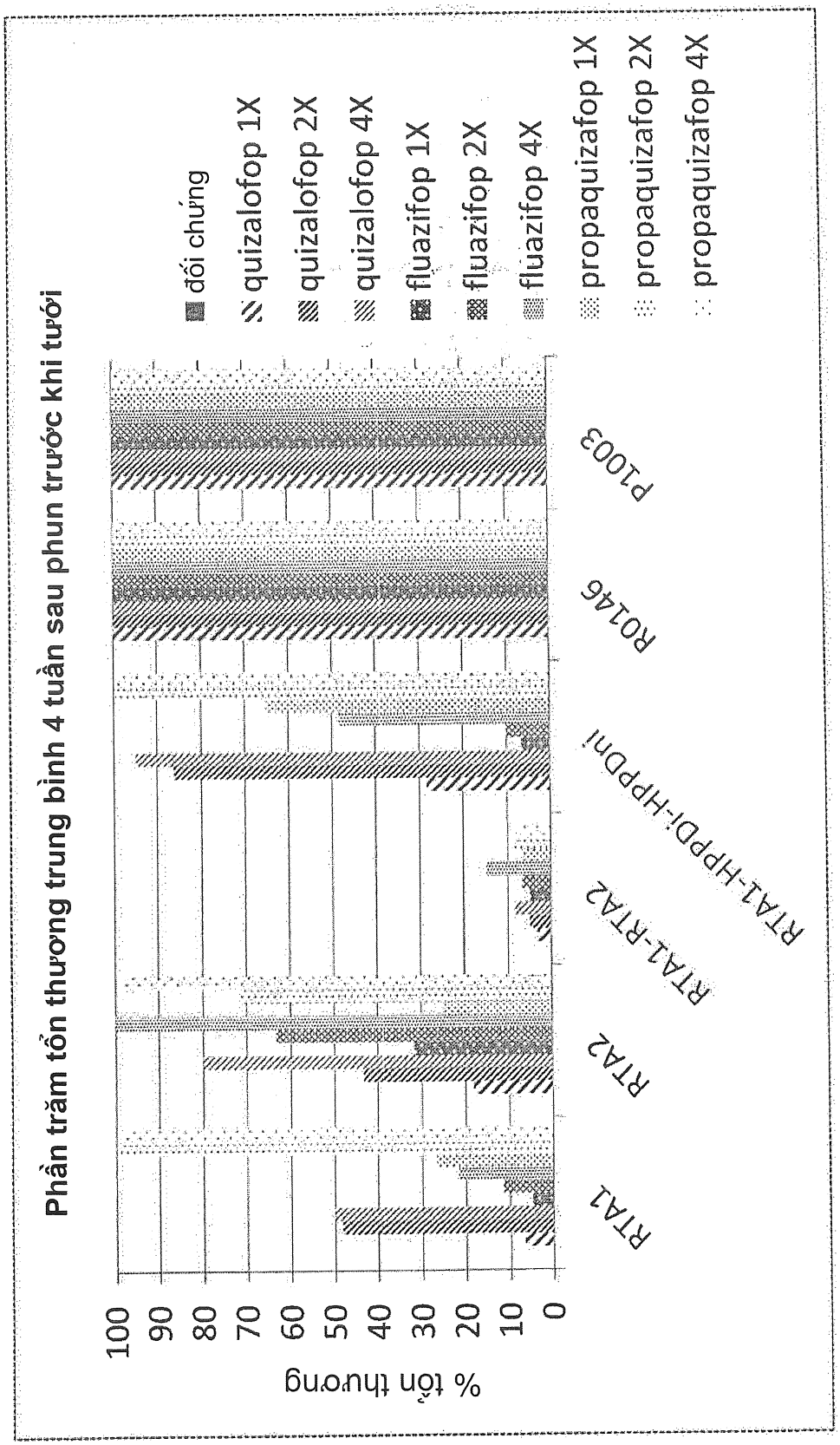

Phần trăm tổn thương trung bình 4 tuần sau phun trước khi tưới
% tổn thương
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
RTA1
RTA2
RTA1-RTA2
RTA1-HPPDi-HPPDni
R0146
P1003
đối chứng
quizalofop 1X
quizalofop 2X
quizalofop 4X
fluazifop 1X
fluazifop 2X
fluazifop 4X
propaquizafop 1X
propaquizafop 2X
propaquizafop 4X

FIG. 21E

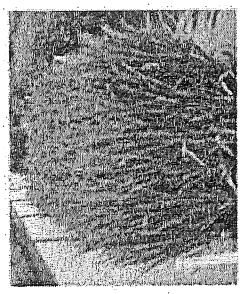


FIG. 22A

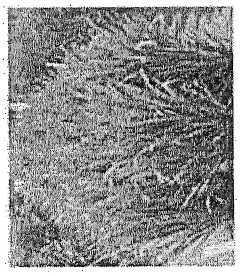


FIG. 22B

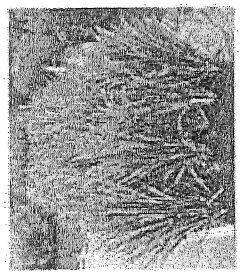


FIG. 22C

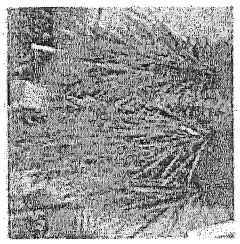


FIG. 22D

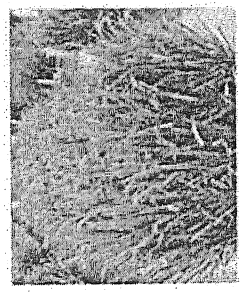


FIG. 22E

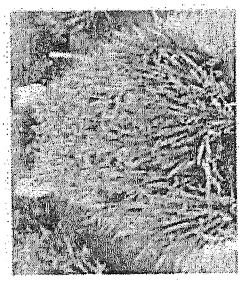


FIG. 22F

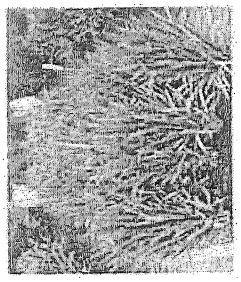


FIG. 22G

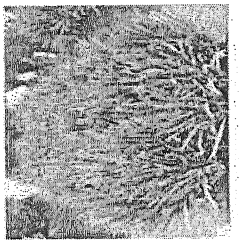


FIG. 22H

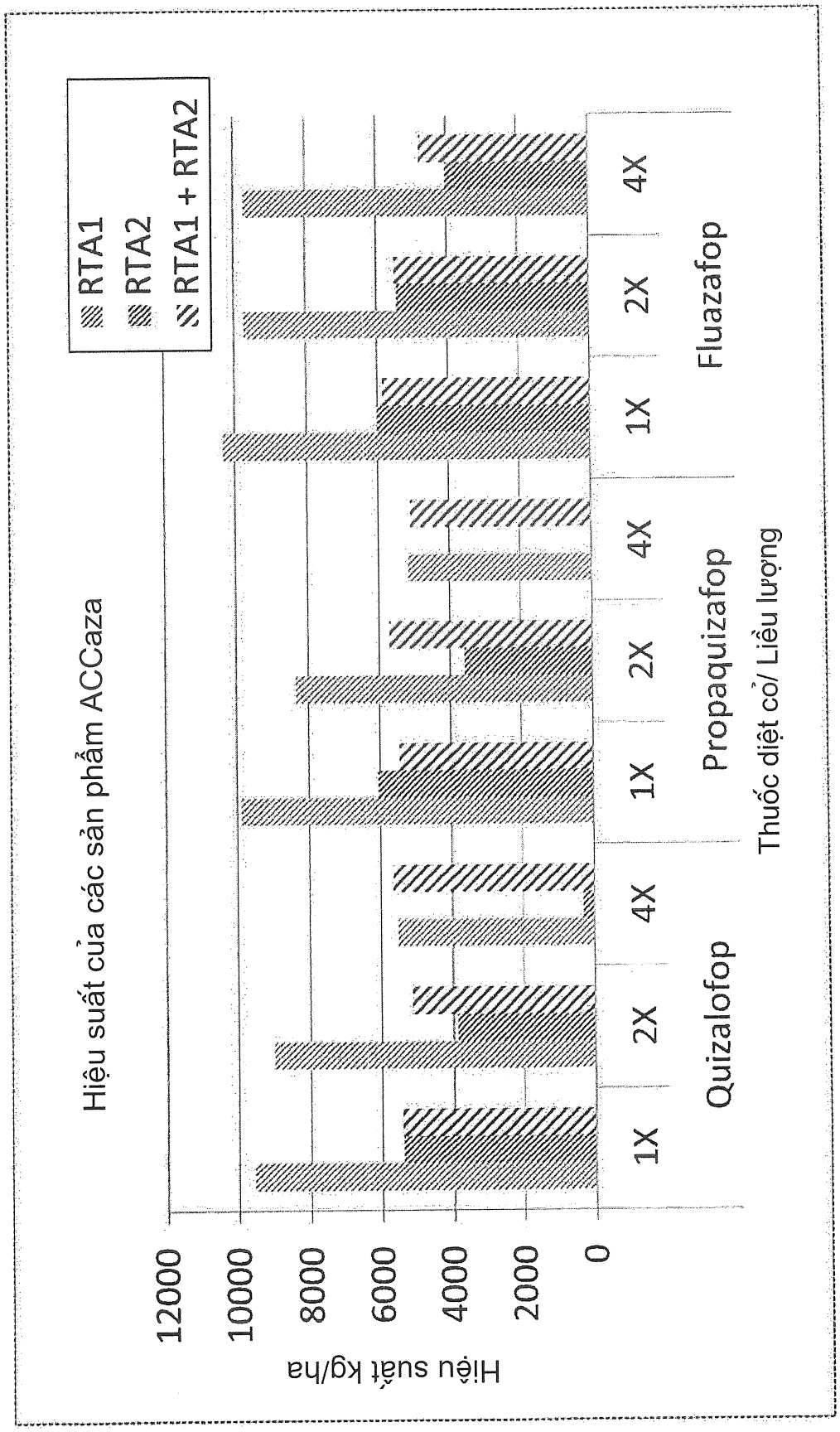

Hiệu suất của các sản phẩm ACCaza
RTA1
RTA2
RTA1 + RTA2
Hiệu suất kg/ha
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1X
2X
4X
Quizalofop
1X
2X
4X
Propaquizafop
1X
2X
4X
Fluazafop
Thuốc diệt cỏ/ Liều lượng

FIG. 23

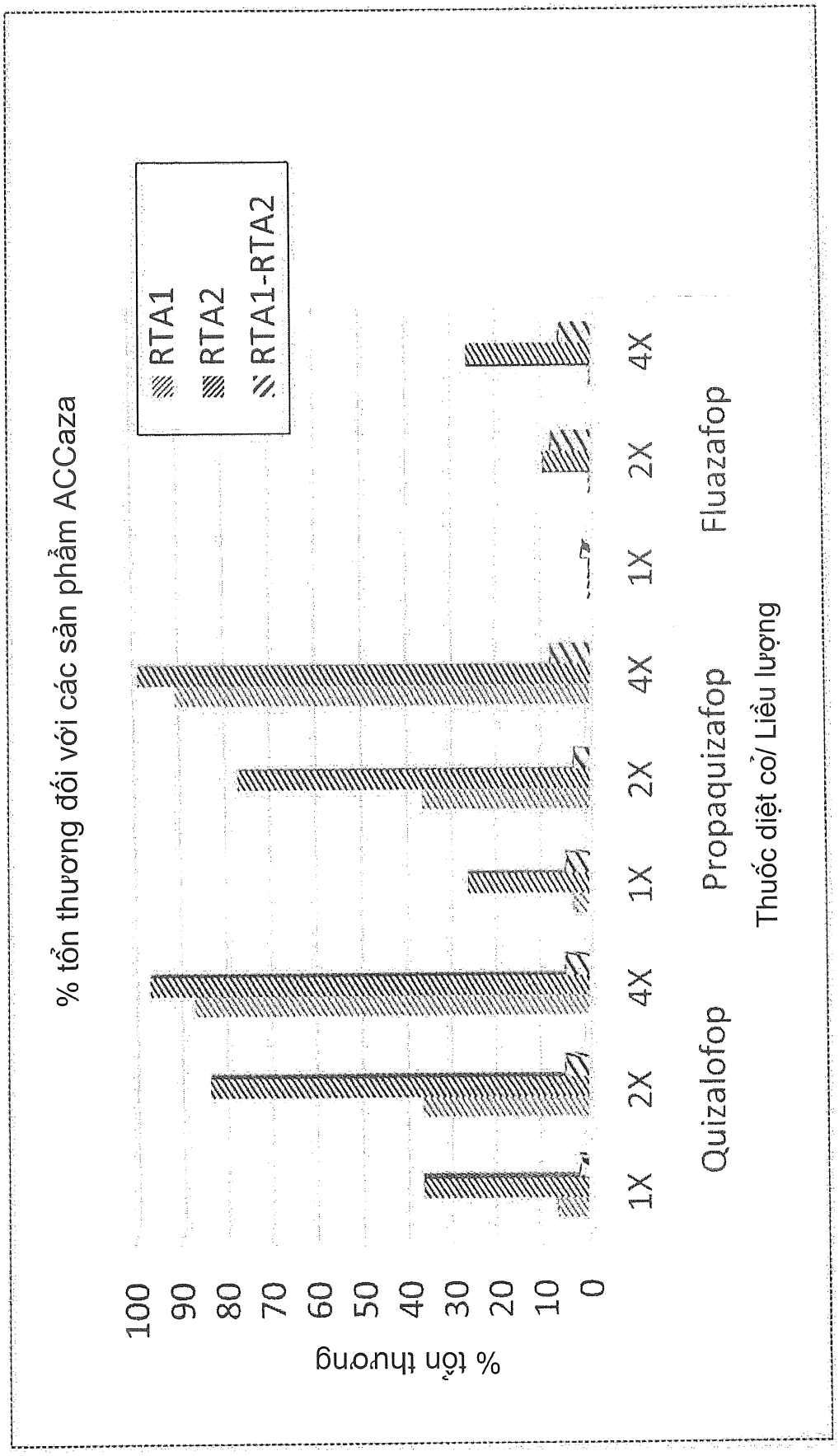

% tổn thương đối với các sản phẩm ACCaza
RTA1
RTA2
RTA1-RTA2
% tổn thương
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1X
2X
4X
1X
2X
4X
1X
2X
4X
Quizalofop
Propaquizafop
Fluazafop
Thuốc diệt cỏ/ Liều lượng

FIG. 24